

УДК 577.15/17 : 545

## Пробит-метод в оценке эффектов физиологически активных веществ при низких уровнях воздействия

Доктор медицинских наук, профессор Н. А. Лошадкин, доктор медицинских наук В. Д. Гладких, кандидат химических наук В. А. Голденков, кандидат химических наук, профессор А. Н. Сеницын, кандидат биологических наук Л. В. Дарьина, кандидат биологических наук Л. П. Буланова

### Значение пробит-анализа для исследований малых доз физиологически активных веществ

При анализе риска, обусловленного поступлением токсичных веществ в окружающую среду, ставится задача прогнозирования воздействия их на организм в различных концентрациях и токсодозах. Важное значение имеет оценка последствий действия малых концентраций при длительных экспозициях, а также изучение особенностей токсикологических эффектов на фоне неблагоприятных факторов окружающей среды. Большую роль в подобных исследованиях играет пробит-анализ и изучение зависимостей поглощенной ингаляционной токсодозы от концентрации и экспозиции токсиканта.

Еще в середине 1930-х годов было показано, что зависимости «доза—эффект», выраженные в координатах «концентрация (доза) вещества—процент лабораторных животных, у которых наблюдался биоэффект», не подчиняются закону нормального распределения. При таком представлении экспериментальной зависимости отсутствует возможность оценки эффективности вещества и прогноза его действия в малых концентрациях.

Специалисты в области статистических и вероятностных методов анализа (Блисс, Гэддон, Фишер и другие) разработали статистический способ обработки результатов наблюдений, так называемый пробит-анализ [1], который базируется на следующих положениях.

Зависимость строится в следующих координатах: на оси абсцисс — логарифм дозы, а не доза  $D$ , как это делалось ранее, на оси ординат вместо процентов пораженных животных — вероятностные величины «пробиты» (*probability unites* — *probites*, сокращенно  $Pr$ , отсюда и название «пробит-анализа»). Перевод процентов в пробиты осуществля-

ется с помощью аналитических функций и таблиц [1]. В координатах « $\ln(\lg)D$  —пробиты» получаются линейные зависимости, которые описывают экспериментальные данные в широком интервале биоответов (от 0,1 до 99,9% откликов):

$$Pr = a + b \ln D \quad (1)$$

Одновременно была разработана система количественных вероятностных оценок статистического веса  $i$  отдельных экспериментальных точек. Величины  $i$  рассчитываются аналитически или с помощью таблиц [1]. Статистический вес точек зависит от степени их «удаленности» от медианных токсодоз (по мере «удаленности» он снижается). Так, например, экспериментальная точка, соответствующая эффективной токсодозе  $ED_{16}$  ( $Pr=4,0$ ), имеет статистический вес в 1,45 раза меньший, чем экспериментальная точка на уровне медианных токсодоз, а точка, отвечающая токсодозе  $ED_5$  ( $ED_{0-10}$ ), имеет статистический вес в 3,6 раза меньший и соответственно значительно больший доверительный интервал, что имеет важное значение для прогноза эффектов воздействия токсикантов в низких концентрациях и токсодозах. Статистический вес экспериментальных точек зависит также от количества лабораторных животных, использованных для получения отдельных точек [1].

Данный подход ознаменовал создание принципиально нового метода анализа зависимостей «доза—эффект» на различных уровнях биоответов. Пробит-метод получил признание и стал внедряться в практику передовых фармакологических и токсикологических лабораторий мира. Однако не все было просто. Дело в том, что один из важнейших постулатов пробит-анализа, связанный с оценкой статистического веса каждой экспериментальной точки, требовал сложных расчетов. Это привело к тому, что до реализации пробит-

анализа с помощью вычислительной техники стали появляться более «простые» и «удобные» для работы экспериментаторов варианты пробит-метода [2]. Такие модификации, позволяющие рассчитывать медианные токсодозы, а также величины  $ED_{16}$  и  $ED_{84}$ , ограничивают возможности пробит-анализа и они не могут быть использованы для оценки токсозффектов на уровне  $ED_{0-10}$ ,  $LD_{0-10}$ ,  $ECt_{0-10}$ ,  $LCt_{0-10}$  и их доверительных интервалов, что важно для оценки эффектов токсикантов в малых дозах и концентрациях.

Параметры, определяемые пробит-методом, позволяют получать важную информацию об эффективности физиологически активного вещества. Коэффициенты  $a$  и  $b$  в уравнении (1) характеризуют чувствительность биообъекта к веществу при данном виде его воздействия, а также соотношения различных категорий токсодоз. Так, различия в отношениях  $ED_{95}/ED_5$  в зависимости от тангенса угла наклона пробит-линии ( $b$ ) могут достигать нескольких порядков. Например, если  $b=10$ , то отношение  $ED_{95}/ED_5$  составляет 2,3, а при  $b=1$  оно равно 1950, т.е. на три порядка больше. По данным зарубежной литературы, первый случай ( $b=10$ ) характерен для фосфорорганических веществ (ФОВ) при внутривенном (внутримышечном) введении и ингаляции. В случае действия «обычных» биологических агентов тангенсы углов наклона пробит-линии имеют более низкие значения [3]. Время проявления токсозффектов при действии указанных соединений различное: для ФОВ — минуты, для биологических агентов — сутки.

В первых вариантах пробит-метода фактор времени в зависимостях «доза—эффект» не учитывался. Между тем он играет важную роль для характеристики взаимодействия вещества с организмом, даже при однократном введении вещества. Поясним это на примере. В опытах на белых мышах при внутримышечном введении иприта были получены следующие значения величины  $LD_{50}$ :  $24,5 \pm 2,7$  мг/кг при наблюдении в течение суток,  $15,3 \pm 2,1$  мг/кг — через двое суток,  $9,7 \pm 1,7$  мг/кг — через трое суток и т.д.,  $3,6 \pm 0,4$  мг/кг — через девять суток наблюдения. Отметим, что это были отдельные серии опытов и в каждом из них для расчета результатов применялся пробит-метод [4].

В случае веществ с замедленным проявлением биоэффектов, как правило, указывают время возникновения и фиксации наблюдаемых эффектов или приводят зависимости изменения медианных токсодоз от сроков наблюдения. В приведенном примере опыта на мышах временная зависимость токсодозы  $LD_{50}$  иприта имеет вид:

$$LD_{50} = a^b$$

где  $a=58,12$ ;  $b=-1,53$ ;  $t$  - время в сутках [4].

Таким образом, пробит-анализ является в настоящее время наиболее компетентным и полноценным методом количественной оценки зависимостей «доза—эффект». Особенно важное значение этот метод имеет для оценки эффектов токсикантов при низкоинтенсивном их воздействии на организм. Метод позволяет рассчитывать величины токсодоз на уровне 5%-ных откликов ( $ED_{0-10}$ ,  $LD_{0-10}$ ,  $ECt_{0-10}$ ,  $LCt_{0-10}$ ) и их доверительные интервалы, что важно для прогноза риска в случае низких концентраций токсикантов и их смесей при длительных экспозициях.

### Роль факторов времени и концентрации при ингаляции токсикантов

При оценке общерезорбтивного действия токсикантов, поступающих в организм через органы дыхания, используются различные подходы к расчету ингаляционных токсодоз, учитывающие концентрацию и продолжительность воздействия вещества.

В свое время немецким химиком Габером было сформулировано положение, что поглощенная ингаляционная токсодоза (произведение концентрации вещества на время воздействия) является постоянной величиной:

$$Ct = C \cdot t = \text{const} \quad (2)$$

где  $Ct$  — ингаляционная токсодоза, мг·мин/л, мг·мин/м<sup>3</sup>;  $C$  — концентрация токсиканта, мг/л, мг/м<sup>3</sup>;  $t$  — экспозиция, минуты, секунды.

Правило Габера соблюдается для веществ, обладающих кумулятивным действием (иприт и др.), и не выполняется в случае веществ, не обладающих таким действием (синильная кислота, хлорциан и др.). Для величины  $Ct$  Габер использовал термин «показатель относительной ингаляционной токсичности», имея ввиду, что поглощенная ингаляционная токсодоза зависит от многих факторов [5—11]. Модифицированная формула Габера, показывающая соотношение между токсодозами при ингаляции и внутривенном поступлении вещества, имеет вид:

$$ECt_{50} = \frac{ED_{50(B/B)} \cdot P}{k_1 \cdot k_2} \quad (3)$$

где  $ECt_{50}$  — медианная ингаляционная токсодоза, мг·мин/л;  $ED_{50(B/B)}$  — медианная токсодоза при внутривенном введении, мг/кг;  $P$  — вес животных (человека), кг;  $k_1$  — объем легочной вентиляции, л/мин, зависит от физической нагрузки, температуры, влажности воздуха и других факторов,  $k_2$  — коэффициент поглощения токсикантов легочной тканью,

для газов и паров  $k_2 \approx 1,0$ , для аэрозолей  $k_2$  зависит от степени дисперсности и физико-химических свойств вещества (липидофильность, летучесть и пр.).

Приняв  $k_2 \approx 1,0$  и обозначив  $Pr/k_1$  через  $K$ , получим:

$$LCt_{50} = LD_{50} \cdot K$$

Величины  $K$  (кг·мин/л) равны для мышей  $\sim 1,0$ , для крыс, морских свинок и кроликов  $\sim 2,0$ — $2,5$ , для кошек и собак  $\sim 3,0$ — $4,0$ , для человека  $\sim 5,0$  (при  $P = \sim 75$  кг,  $k_1 = 15$  л/мин).

Таким образом, имеются выраженные видовые различия в соотношении между токсодозами при ингаляции и внутривенном введении токсиканта.

Относительность ингаляционных токсодоз проявляется и в сроках наблюдения за подопытными животными. В приведенном выше примере показано, что величины  $LD_{50}$  иприта в опытах на мышах колеблются почти в 7 раз. В соответствии с уравнением (3) это означает, что величины  $LCt_{50}$  иприта при ингаляции будут также меняться в зависимости от сроков наблюдения и фиксации гибели животных при различных токсодозах.

Большое значение при ингаляции имеет время воздействия токсиканта. В ранних исследованиях изучались зависимости  $Ct$  от  $t$  и  $C$  для хлора, фосгена, иприта и др. (отравляющие вещества Первой мировой войны). Пары этих отравляющих веществ оказывают воздействие на организм в течение десятков секунд (минут), поэтому изучение эффектов токсичных веществ на организм при длительном воздействии не было актуальным. Впоследствии было выявлено, что при увеличении экспозиции до 1 ч и более величины  $Ct$  возрастают, что обусловлено «детоксикационными» свойствами организма. В связи с этим было предложено внести поправочный коэффициент  $\alpha$  в формулу Габера:

$$Ct = \alpha \cdot C \cdot t \quad (4)$$

Коэффициент  $\alpha > 1,0$  зависит от свойств вещества (для менее устойчивых он больше), от экспозиции и концентрации [5—7].

По мере развития исследований эффектов физиологически активных веществ стали накапливаться факты, свидетельствующие о том, что «классическое» правило Габера (2) при длительных экспозициях и низких концентрациях не соблюдается. Были предложены модифицированные формулы:

$$Ct = C^n \cdot t \quad (5.1)$$

$$Ct = C^n \cdot t^l \quad (5.2)$$

где  $n$  и  $l$  — эмпирические коэффициенты.

Эти и другие зависимости в рамках пробит-анализа дают следующие линейные уравнения [12—14]:

$$Pr = \alpha + \beta \ln D + \gamma \ln t \quad (6)$$

$$Pr = a + b \ln(C^n \cdot t) = a + b \ln(C^n \cdot t^{l-n}) \quad (7)$$

Введенные в эти уравнения дополнительные коэффициенты направлены на сохранение постоянства  $Ct$ .

В работе [15] осуществлен иной подход к оценке ингаляционной токсичности, основанный на предпосылке, что величины  $Ct$  не являются постоянными. Исследования изменения  $Ct$  во времени и в зависимости от концентрации токсиканта, проведенные на относительно большом литературном материале (23 соединения с различными категориями ингаляционных токсодоз —  $PCt_{50}$ ,  $ECt_{50}$  и  $LCt_{50}$ ), показали, что во всех случаях при больших экспозициях (до 24 ч) правило Габера не соблюдается. Выявленные зависимости имеют вид:

$$Ct = a \cdot t^b \quad (8.1)$$

$$Ct = a + bt \quad (8.2)$$

$$Ct = aC^b \quad (8.3)$$

В уравнениях (8.1) и (8.2) коэффициент  $b > 0$ , в (8.3)  $b < 0$ .

Зависимости (8.1) и (8.3) нелинейные. Для большинства проанализированных токсикантов изменение ингаляционных токсодоз от экспозиции описывается формулой (8.1) (в интервале экспозиции от 1 до 24 ч). При этом значения токсодоз при экспозиции 24 ч выше токсодоз при одночасовой экспозиции. Так, в случае синильной кислоты, аммиака и фосгена отношения  $PCt_{50}^{(24ч)}/PCt_{50}^{(1ч)}$  равны 3,0; 3,95 и 6,2, соответственно [15]. В целом, найденные зависимости свидетельствуют о том, что величины  $Ct$  возрастают с увеличением экспозиции и уменьшением концентрации токсиканта. Проиллюстрируем это на примере эффекта воздействия низких концентраций паров зарина при длительных экспозициях, 3—4 суток (одна из возможных причин «синдрома войны в Персидском заливе», см. статью Н. А. Лошадкина, В. А. Голденкова, В. В. Дикого и др. «Случаи массовых заболеваний «неясной этиологии.....» в этом номере журнала).

В работе [15] показано, что изменение во времени медианных пороговых ингаляционных токсодоз зарина  $PCt_{50}$  (мг·мин/м<sup>3</sup>) описывается уравнением (8.2), коэффициент  $b$  в интервале экспозиции 1—24 ч равен 0,0032 мг/м<sup>3</sup>, с увеличением экспозиции (в указанном интервале времени) величины  $PCt_{50}$  зарина возрастают в 4,3 раза (от 1,5 до 6,55 мг·мин/м<sup>3</sup>).

Что касается зависимости  $PC_{50}$  от концентрации зарина ( $PC_{50}$ , мг/м<sup>3</sup>), то она описывается формулой (8.3). Зависимость носит двухфазный характер. В интервале концентраций 0,013—0,025 мг/м<sup>3</sup> величина  $PC_{50}$  уменьшается (с увеличением  $PC_{50}$ ) в 1,3 раза, а в интервале 0,0045—0,013 мг/м<sup>3</sup> — в 3,3 раза. Полученные данные свидетельствуют о том, что при низких концентрациях зарина и больших экспозициях токсичность зарина при ингаляции снижается (возрастают величины  $PC_{50}$ ). Эти данные лишней раз подтверждают справедливость подходов, отраженных в уравнениях (5)—(7).

Рассмотренные выше подходы к оценке токсичных доз имеют не только теоретическое значение. В последнее время при изучении причин «синдрома Персидского залива» обсуждается вопрос о возможном действии низких концентраций зарина на фоне действия других физиологически активных веществ.

#### Применение пробит-анализа для оценки комбинированного действия токсикантов в малых дозах

Рассмотрим возможности количественной оценки совместного действия веществ с позиции пробит-анализа [1]. В том случае, если тангенсы углов наклона зависимостей в координатах  $Pg - \ln(\lg)D$  (уравнение 1) для двух веществ А и В одинаковы (параллельные прямые), то для оценки медианной эффективной токсодозы смеси может быть использовано следующее уравнение:

$$\frac{1}{ED_{50}(\text{смеси})} = \frac{A}{ED_{50}(A)} + \frac{B}{ED_{50}(B)} \quad (9)$$

где  $ED_{50}(\text{смеси})$  — медианная эффективная токсодоза (расчетная);  $A, B$  — относительное содержание веществ А и В в смеси,  $ED_{50}(A), ED_{50}(B)$  — медианные эффективные токсодозы веществ А и В.

Отношение расчетной токсодозы  $ED_{50}(\text{смеси})$  к экспериментальному значению  $ED_{50}(\text{смеси})$  характеризует вид взаимного влияния веществ в смеси: если это отношение равно 1,0, то имеет место аддитивное действие веществ, если больше 1,0, то это свидетельствует о синергизме, если меньше 1,0 — об антагонизме.

Использование уравнения (9) имеет определенные ограничения, особенно в случае оценки комбинированных эффектов веществ при низких уровнях воздействия. При расчете по (9) необходимо учитывать среднеквадратичные ошибки ( $S_{ED_{50}}$ ) и доверительные интервалы доз исследуемых веществ и их смесей [1], а при оценке эффектов при низких уровнях воздействия — соответствующие величины

$S_{ED_{50}}$ . Ввиду того, что токсодозы на уровне  $ED_{0-10}$ , имеют низкий статистический вес, доверительные интервалы этих величин возрастают и статистическая оценка результатов усложняется [1].

При комбинированном воздействии веществ с различными механизмами действия тангенсы углов наклона в пробитных зависимостях (величины  $b$  в формуле 1), как правило, не одинаковы. В этом случае сравнение эффективности веществ в смеси проводится на разных уровнях биоответов ( $ED_{16}, ED_{50}, ED_{84}$  и др.), а также на уровне величин  $ED_{0-10}$  и их доверительных интервалов.

В случае, если вещества вводятся не в смеси, а раздельно и в разные сроки, формула (9) не применима, и для оценки совместного токсического эффекта используется «коэффициент изменения токсичности» (КИТ), который отражает изменение  $ED_{50}$  одного вещества на фоне предварительного введения другого (подробное обсуждение методов такой оценки дано в монографии [1]; исследования, в которых оценивается совместное действие пестицидов и других физиологически активных веществ с использованием величин КИТ, описаны в [16]).

В последние годы в связи с обсуждением причин «синдрома Персидского залива» изучаются эффекты, проявляемые при совместном присутствии зарина, пестицидов и других веществ. Напомним, что в свое время в работе [17] было исследовано изменение токсичности зарина на фоне предварительного введения триортокрезилфосфата, который является специфическим ингибитором карбоксилэстераз крови и печени. После введения триортокрезилфосфата «расход» меченого зарина (<sup>32</sup>P) в крови крыс уменьшался, зарин поступал в мозг с более высокими скоростями, что приводило к повышению токсичности зарина — снижению  $LD_{50}$  в шесть раз [17].

Явление отрицательного влияния неблагоприятных факторов окружающей среды (наличие пестицидов, растворителей и др.), которые повышают чувствительность организма к различным химическим веществам, получившее название «феномен множественной химической чувствительности», или «болезнь окружающей среды», привлекает все большее внимание токсикологов и других специалистов. В этом отношении представляют интерес данные по совместному действию хлорофоса, триортокрезилфосфата и нитрофениловых эфиров кислот фосфора (НЭФ) — аналогов пестицидов. Показано, что медианные токсодозы НЭФ ( $LD_{50}, ED_{50}$ ) снижаются в 3,3—4,7 раза в случае предварительного ве-

дения триортокрезилфосфата или хлорофоса, причем в большей степени при введении триортокрезилфосфата. И что важно, — изменяются тангенсы углов наклона в пробитных зависимостях. Так, если по результатам опытов на интактных лабораторных животных (белые мыши) величины  $b$  (формула 1) при введении НЭФ составляли, как правило, 7,6—8,5, то после предварительного введения триортокрезилфосфата и хлорофоса они уменьшались в 1,5—1,75 раза.

Обработка экспериментальных данных пробит-методом показала, что на фоне предварительного введения триортокрезилфосфата и хлорофоса, помимо изменения токсодоз НЭФ и тангенсов угла наклона, возрастают различия в индивидуальной чувствительности лабораторных животных. Об этом косвенно свидетельствует увеличение статистических характеристик совокупности экспериментальных данных  $S_0$  и  $\chi^2$ , изменяются отношения  $ED_{95}/ED_5$  и  $LD_{50}/LD_5$  — они становятся значительно большими, чем при введении только НЭФ. Важно также, что на уровне 5%-ных откликов при действии НЭФ на фоне триортокрезилфосфата и хлорофоса величины  $ED_5$  и  $LD_5$  имеют значительно большие доверительные интервалы, причем они перекрываются. Практически это означает, что препараты НЭФ в сублетальных дозах на фоне предварительного введения триортокрезилфосфата и хлорофоса на уровне 5%-ных откликов могут вызывать интоксикацию и даже гибель отдельных животных.

\* \* \*

Рассмотренные подходы могут быть использованы в работах по оценке степени риска при аварийных ситуациях на химических предприятиях с учетом возможного воздействия низких концентраций токсикантов и при длительных экспозициях, а также при разработке модельных опытов по изучению влияния неблагоприятных факторов окружающей среды на воздействие малых и сверхмалых доз токсикантов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Finney D.J.* Probit analysis. 3 ed. Cambridge: University Press, 1980, p. 333.
2. *Беленький М.Л.* Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Рига, 1959, 114 с.
3. Медико-санитарные аспекты применения химического и бактериологического (биологического) оружия. Женева, ВОЗ, 1972.
4. *Абнизов С.С., Лошадкин Н.А.* Токсикологический вестник, 1994, № 3, с. 35—39.
5. *Meyer Zulius.* Der Gaskampf und die chemischen Kampfstoffe, 1926.
6. *Флюри и Виланд.* Фармакологическое действие дихлордиэтилсульфида, 1931.
7. *Franke S., e. a.* Lehrbuch der Militärchemie. Militärverlag, DDR, Berlin, 1977.
8. *Groehler O.* Der laut lose Tod. Verlag der Nation, Berlin, MV, 1984.
9. Количественная токсикология. Л.: Медицина, 1973, с. 288.
10. *Александров В.Н., Емельянов В.И.* Отравляющие вещества. М.: Воениздат, 1990.
11. *Сошественский Н.А.* Боевые отравляющие вещества. М.: Сельхозиздат, 1933, с. 150—152.
12. *Маршалл В.В.* Основные опасности химических производств. М.: Мир, 1989, с. 671.
13. *Petersen C.M.* Loss Rev. Process Ind., v. 3, 1990, p. 136—141.
14. *Исоев В.С., Корзунов С.Н. и др.* Защита населения при авариях на химически опасных объектах. Проблемы безопасности при чрезвычайных ситуациях, № 10, 1991, с. 46—76.
15. *Батырев В.В., Лошадкин Н.А., Беженарь Г.В.* Тезисы конференции «Медицина катастроф». Санкт-Петербург, 1995, с. 67.
16. *О'Брайн Р.* Токсичные эфиры кислот фосфора. М.: Мир, 1964.
17. *Polak R.L., Cohen E.N.* Biochem. Pharmacol., 1969, v. 18, p. 86.