

PŘÍSPĚVEK K VYHODNOCOVÁNÍ ZÁVISLOSTI MEZI DÁVKOU A ÚČINKEM LÉČIVA IN VITRO

C. Höschl, Výzkumný ústav psychiatrický, Praha*)

Při sledování vztahů mezi účinkem a dávkou léčiva se nyní vychází vesměs z receptorové teorie. Podle ní dochází k efektu přenosem stimulu, jenž vzniká obsazením receptoru léčivem, přičemž podle modelových představ jde o reakci mezi korespondujícími místy receptoru a léčiva. Vznik efektu nelze zatím jednoznačně vysvětlit, takže tato teorie má několik variant. U většiny pokusů nelze např. jednoznačně rozhodnout, zda je pro vznik efektu rozhodující akt obsazování receptoru (teorie frekvenční) anebo obsazení samo (teorie okupační). Dále je sporné, zda přenos stimulu, tj. závislost efektu na množství obsazených receptorů, je lineární, zda je maximálního efektu dosaženo obsazením všech receptorů či zda existuje tzv. receptorová rezerva apod. (1), (2). Každá varianta byla podepřena řadou pokusů, jimiž se zde nebudeme zabývat. Pro vyhodnocování závislosti mezi dávkou a účinkem léčiva v našich pokusech je však rozhodující prozatím zjednodušená základní představa, podle níž je velikost efektu lineárně závislá na množství komplexů léčivo—receptorových (dále RA). Tato závislost vyhovuje dosavadním zkušenostem:

$$E = \alpha [RA], \quad (1)$$

kde E značí efekt, [], vyjádření koncentrace, α je konstanta nazývaná obvykle vnitřní aktivitou léčiva, neboť při stejně afinitě různých léčiv k určitému receptoru nemusí být dosahováno stejněho efektu. Souvisí to s tím, co se komplexem vyvolává: s přenosem stimulu.

Přijmeme-li bez výhrad okupační receptorovou teorii v této podobě, smíme také použít matematický aparát, k němuž dospěli v biochemii r. 1913 MICHAELIS a MENTENO-VÁ při sledování kinetiky enzymatických reakcí [3]. Rychlosť enzymatické reakce závisí totiž na množství komplexů enzym-substrát obdobně jako efekt léčiva na množství komplexů léčivo-receptorových. K popisu kinetiky působení jednotlivých látek se proto používají matematické vztahy obdobné k rovnici Michaelise a Mentenové. Této rovnice můžeme použít i tehdy, nepovažujeme-li uvedenou analogii za dostatečně odůvodněnou. Lze ji totiž považovat též za rovnici empiricky nalezené regresní křivky, pro jejíž parametry můžeme získat z naměřených dat nestranný odhad. Tento způsob vyhodnocení pokusů umožní stanovit i odhad chyb, bez něhož nelze objektivně posoudit významnost experimentálních výsledků. Ve srovnání s vyhodnocováním pokusů pomocí ručně kreslených grafů, lze s použitím malého číslicového počítače tuto práci nejen objektivizovat, ale i podstatně urychlit.

Komplex RA je tvořen ve zvratné reakci



Symbolom R označujeme volné receptory, A agonistu (léčivo). Je-li dosaženo rovnováhy, platí, že rychlosť tvorby je rovna rychlosti rozpadu. Označíme je v_t a v_r ; podle Gulbergova-Waagova zákona dostaneme

$$v_t = k_1 [R] [A], \quad (3)$$

$$v_r = k_{-1} [RA] \quad (4)$$

Počet volných receptorů R je roven celkovému jejich množství R_t , zmenšenému o ty, které jsou už vázány v RA; proto napišeme

$$[R] = [R_t] - [RA],$$

Autor upřímně děkuje svým učitelům prof. MUDr. Maxmiliánu Wenkemu, DrSc., a doc. MUDr. Elfě Mühlbachové, CSc., z jejichž podnětu a pod jejichž vedením tato práce ve Farmakologickém ústavu FVL-UK v Praze vznikla.

a tedy

$$k_1 ([R_t] - [RA]) [A] = k_{-1} [RA]. \quad (5)$$

Hranaté závorky budeme pro stručnost v dalším textu vynechávat. Úpravou rovnice (5) dostaneme

$$\frac{(R_t - RA) A}{RA} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_A. \quad (6)$$

K_A je rovnovážná, v tomto případě disociační konstanta. Její převrácená hodnota značí vlastně afinitu agonisty k receptoru. Úpravou rovnice (6) získáme vztah

$$RA = \frac{R_t}{\frac{K_A}{A} + 1}, \quad (7)$$

Z rovnice (7) dosadíme za RA do rovnice (1) a dostaneme

$$E = \frac{\alpha R_t}{\frac{K_A}{A} + 1}. \quad (8)$$

Rovnici (8) zjednodušíme tím, že zavedeme bezrozměrový relativní efekt

$$E_r = \frac{E}{E_{max}} = \alpha_r \frac{RA}{R_t}. \quad (9)$$

Vnitřní aktivita léčiva α_r je v tomto případě rovněž bezrozměrová a značí maximální relativní efekt, kterého dosahujeme při obsazení všech receptorů léčivem, tj. při $R_t = RA$. Srovnáním (1) a (9) dostaneme závislost

$$\alpha_r = \frac{R_t}{E_{max}} \alpha. \quad (10)$$

Dosazením (9) a (10) do (8) vyjde základní rovnice

$$E_r = \frac{\alpha_r}{\frac{K_A}{A} + 1}. \quad (11)$$

V souřadnicích E_r , A je to rovnice hyperboly. V semilogaritmickém znázornění jsou to typické esovité křivky, známé ve farmakologii jako DRC (dose-response curve). Transformují se v přímky vynášením převrácených hodnot E_r^{-1} , popř. A^{-1} na osy souřadnic podle Lineweavera a Burka:

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1}{A} \frac{K_A}{\alpha_r} + \frac{1}{\alpha_r}. \quad (12)$$

Je-li $\lim A \rightarrow \infty$, je $\lim E_r \rightarrow E_{r,\infty} = \alpha_r \leq 1$. V případě, že efekt získaný při hypothetické nekonečné koncentraci léčiva je zároveň největším dosažitelným efektem, jak budeme nadále předpokládat, je $\alpha_r = E_{r,\infty} = E_{r,max} = 1$. Tehdy získáme hodnotu K_A jako koncentraci A při polovičním relativním efektu, tj. při $E_r = 0,5$. Záporně vzatý dekadický logaritmus této konstanty definuje parametr pD₂, charakterisující afinitu látky k receptoru. Je tedy

$$pD_2 = -\log K_A. \quad (13)$$

Existují nyní dvě možnosti. Buď považujeme rovnici (11) popř. (12) za ideálně platnou a odchylky od ní považujeme za chyby, nebo považujeme tuto rovnici za empirický popis daného děje, tj. za jednu z možných regresních křivek, jejíž parametry hledáme užitím statistických metod. Praktický postup vyhodnocování pokusů je v obou těchto případech stejný. Rozdíl je jen v tom, že v druhém případě nevylučujeme možnost existence jiných, byť složitějších rovnic, které by daný děj popisovaly lépe.

Metodu ukážeme na příkladu vyhodnocení pokusů, kterými se zjišťoval vliv nepřímých sympatolytik na adrenergní relaxaci hladkého svalu telecí trachey *in vitro* [4].

Odvození metody

Předpokládáme tedy, že hledanou závislost lze vyjádřit rovnicí (12). Pokusně nalezené body však nebudou tuto rovnici přesně splňovat. Poněvadž těchto bodů bývá více než dva, je jimi přímka (12) přeuročena. Je tedy třeba najít regresní přímku, která co nejpřesněji vystihuje závislost, charakterizovanou pokusně nalezenými body. O pokusných podmínkách pojednává [4].

Regresní přímku lze získat buď metodou nejmenších čtverců (součet čtverců od chylek od přímky je co nejmenší), nebo transformací matice přeurovené soustavy rovnic (nalezením tzv. pirozené inversní maticy). Omezíme se na prvu metodu.

Proměnnou E_r v rovnici (12) nelze přímo měřit. Při pokusu měříme zdvih pisátka kymografu v závislosti na koncentraci agonisty v lázni. Relativní efekt je pak určován poměrem

$$E_r = \frac{l_0 - 1}{l_0 - 1_\infty}, \quad (14)$$

kde l_0 značí zdvih pisátka při nulové koncentraci agonisty (tj. při $A = 0$) a l_∞ značí hypotetický zdvih pisátka při nekonečně velké koncentraci $A = \infty$. Zdvih l_∞ nelze z praktických důvodů přesně změřit. Určíme jej proto výpočtem. Z rovnice (14) dosadíme za E_r do rovnice (12) a upravíme do tvaru

$$\alpha_r \frac{l_0 - 1_\infty}{l_0 - 1} - \frac{K_A}{A} - 1 = 0. \quad (15)$$

Definujeme-li relativní efekt vztahem (14), je jeho maximální dosažitelná hodnota $E_{r\max} = \alpha_r = 1$. Předpokládáme tedy, že zdvih pisátka při nekonečně velké koncentraci farmaka je roven maximálně možnému účinku; kdyby tomu tak nebylo, bylo by platilo, že $\alpha_r < 1$, jak plyne z (15), pro $\lim A \rightarrow \infty$.

Pro stručnost označíme rozdíl $l_0 - 1$ symbolem L a po úpravě rovnice (dělením L) dostaneme

$$\frac{1}{l_0 - 1} - \frac{K_A}{L} \cdot \frac{1}{A} - \frac{1}{L} = 0. \quad (16)$$

Budeme předpokládat, že koncentraci roztoku jsme schopni vytvořit s absolutní přesností. K tomu nás vede zkušenost, že hlavním zdrojem chyb je nahodilá odezva preparátu (v našem případě tracheálního svalu) na danou koncentraci roztoku agonisty; chyba ve stanovení koncentrace roztoku je proti tomu nevýrazná. V rovnici (16) představuje tedy výraz

$$\frac{1}{l_0 - 1} = \frac{1}{\lambda} = y$$

nahodilou proměnnou, která závisí na přesně známé nezávisle proměnné

$$\frac{1}{A} = x.$$

Po označení konstant

$$a = \frac{1}{L}, \quad b = \frac{K_A}{L}$$

nabývá rovnice (16) tvaru

$$y - bx - a = 0. \quad (17)$$

Budeme nyní zkoumat, jak se ve výpočtu projeví chyba v určení kontrakce, popř. relaxace preparátu. Je-li střední kvadratická chyba hodnoty $\lambda = l_0 - 1$ rovna ε , je chyba v určení nahodile proměnné $y = 1/\lambda$ rovna*)

$$\frac{1}{\lambda} - \frac{1}{\lambda + \varepsilon} = \frac{\lambda + \varepsilon - \lambda}{\lambda^2 (1 + \frac{\varepsilon}{\lambda})} = \frac{\varepsilon}{\lambda^2 (1 + \frac{\varepsilon}{\lambda})} = \frac{\varepsilon}{\lambda^2}. \quad (18)$$

Je zřejmé, že tato chyba bude při malém λ podstatně větší, než při velkém λ . Veličině $1/\lambda$ je třeba proto přisoudit určitou váhu w , která bude větší při větším λ . Ve vyrovnávacím počtu se váha definuje jako veličina nepřímo úměrná rozptylu (tj. čtverci střední kvadratické chyby) náhodné veličiny. Při hledání regresní přímky (17) je tedy třeba přisoudit náhodné veličině $y = 1/\lambda$ podle (18) váhu $w = \lambda^4 = 1/y^4$. Tím se vyrovná zkreslení, jež by jinak vzniklo užitím převrácené hodnoty $1/\lambda$ jako nezávisle proměnné. Při odvození této váhy jsme mlčky předpokládali, že ε , a tedy ani rozptyl ε^2 veličiny λ , nezávisí na koncentraci roztoku agonisty. To nemusí být přesně splněno, avšak není zároveň známá žádná jiná zákonitost, která by měla větší opodstatnění.

*) Budeme předpokládat, že $|\varepsilon/\lambda|$ je mnohem menší než 1.

Měřením zjišťujeme jednotlivé hodnoty y_i a x_i , přičemž hodnotě y_i přisuzujeme váhu w_i . Dosadíme-li získané hodnoty do (17), nebude pravá strana většinou rovna nule, nýbrž nějakému zbytku r_i (vlivem nahodilých chyb). Jelikož měřením získáváme více než dva body, je přímka soustavou rovnic (17) přeuročena. Neznámé součinitele a b vybereme tak, aby soustava byla splněna „co nejlépe“, tj. aby residuální hodnota

$$R = \sum_{i=1}^n w_i r_i^2 = \sum_{i=1}^n w_i (y_i - bx_i - a)^2 \quad (19)$$

byla minimální. To je podstata známé metody nejmenších čtverců. R je minimální, jestliže

$$\frac{\partial R}{\partial a} = 0, \quad \frac{\partial R}{\partial b} = 0. \quad (20)$$

Podmínky (20) dávají pak soustavu tzv. normálních rovnic ve tvaru

$$\begin{aligned} k_{11}a + k_{12}b &= c_1, \\ k_{21}a + k_{22}b &= c_2, \end{aligned} \quad (21)$$

kde

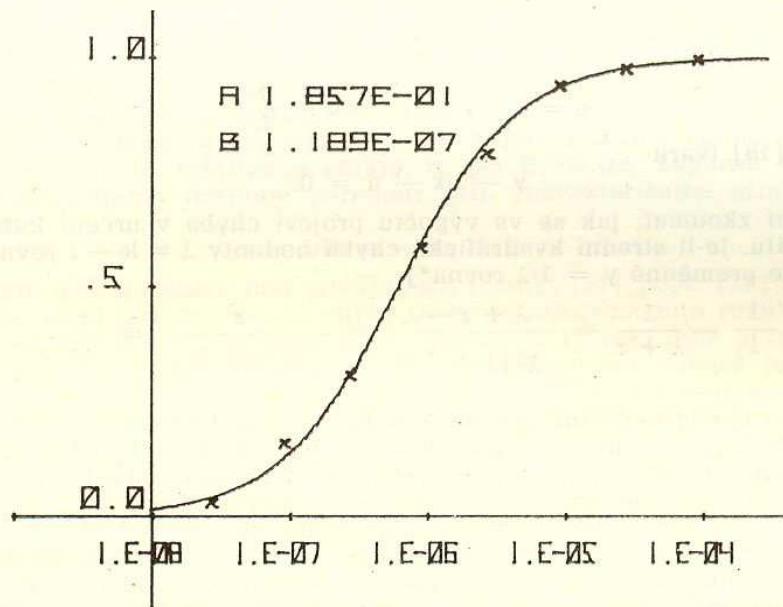
$$\begin{aligned} k_{11} &= \sum_{i=1}^n \lambda^4_i, & k_{12} = k_{21} &= \sum_{i=1}^n \frac{\lambda^4_i}{A_i}, & k_{22} &= \sum_{i=1}^n \frac{\lambda^4_i}{A_i^2}, \\ c_1 &= \sum_{i=1}^n \lambda^3_i, & c_2 &= \sum_{i=1}^n \frac{\lambda^3_i}{A_i}. \end{aligned}$$

Z rovnic (21) vyplynou konstanty a, b.

Další vzorce pro výpočet uvádíme bez odvození v dodatku. Byly zčásti převzaty z literatury [5] a [6].

Program pro výpočet

Program byl vypracován pro stolní číslicový počítač Hewlett-Packard 9820 A a zahrnuje kromě vlastního výpočtu také instrukce pro nakreslení DRC křivek v semilogaritmických souřadnicích. Do obrázků zakreslil počítač pomocí křížků také experimentálně získané body. Hodnoty konstant a, b z rovnice (17) jsou na obrázcích vypsány a označeny velkými písmeny. Na výstupu z tiskárny jsou pro kontrolu uvedeny vkláda-



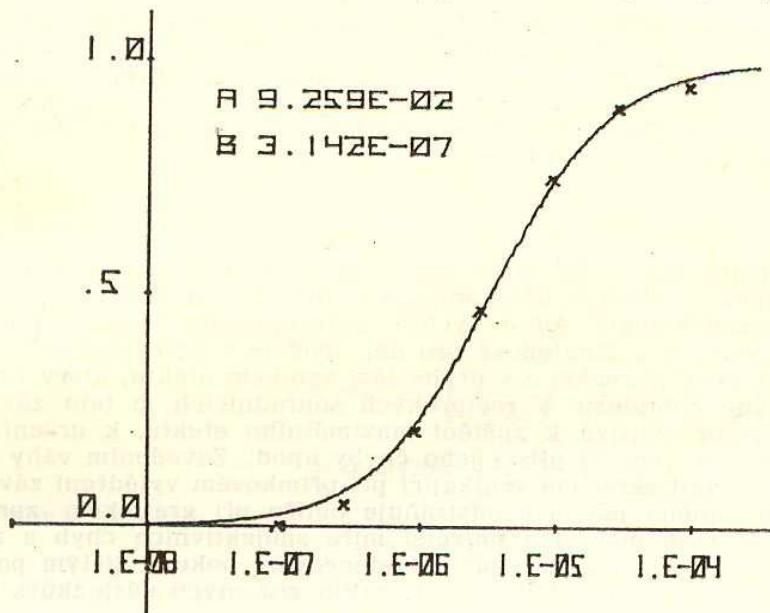
Obr. 1. Ukázka DRC křivky. Na vodorovné ose se vynáší koncentrace v logaritmické stupnici, na svislou osu se vynáší velikost relativního efektu. Hodnota $pD_2 = 6,193$, pravděpodobná chyba $pD_2 = 0,587$. Jde o reprodukci obrázku nakresleného počítačem.

né měřené hodnoty, dále rovnice přímky a její konstanty, hodnoty pD₂ a příslušná pravděpodobná chyba. Obrázky kreslí souřadnicový zapisovač; program umožňuje nakreslení libovolného množství obrázků ke každému měření. Výpočet byl proveden v Ústavu termomechaniky ČSAV.

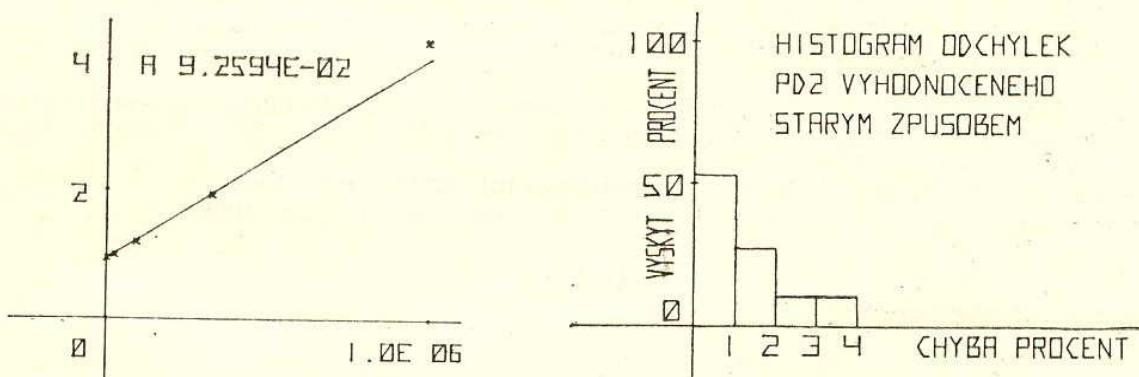
Numerický výpočet pro vložení hodnot trvá stroj asi 7 vteřin, nakreslení jednoho obrázku včetně popisu trvá asi 50 vteřin.

Docílené výsledky

Hlavním cílem této práce bylo odstranit chyby a obtíže při grafickém znázorňování a vyhodnocování pokusních výsledků. Použitím váhy jsme skutečně odstranili zkreslení výsledků vzniklé v převrácených hodnotách při malých koncentracích a vyhodnocování pokusů jsme v největší míře zbavili subjektivních chyb. Vyhodnocování pokusů



Obr. 2. Jiný příklad DRC křivky s hodnotou pD₂ = 5,469, pravděpodobná chyba pD₂ = 0,110.



Obr. 3. Křivka z obr. 2, zakreslená v reciprokých souřadnicích podle Lineweavera a Burkova. Vzhledem k rozsahu reciprokové stupnice nemohou být na obrázku zakresleny všechny měřené body. Průsečík přímky se svislou osou udává maximální efekt. Jde o reprodukci obrázku nakresleného počítačem.

Obr. 14. Histogram. Na vodorovné ose je relativní rozdíl mezi hodnotami pD₂, získanými na počítači a klasickou metodou. Na svislé ose je četnost výskytu takové chyby. Histogram vznikl ze souboru asi 30 měření. Obrázek byl rovněž nakreslen pomocí počítače.

tímto způsobem je velmi přehledné, objektivní, neobyčejně rychlé, a usnadňuje další statistické zpracování. Příklady DRC křivek nakreslených počítačem jsou uvedeny na obr. 1 a obr. 2*). Výsledky pokusu z obr. 2 jsou pro srovnání zakresleny též v reciprokových souřadnicích na obr. 3; jde o přímkovou závislost podle rovnice (12).

Diskuse

Přímkové znázornění (17) umožňuje použít jednoduchý matematický aparát. Dále umožňuje extrapolaci určit limítní ideální hodnotu efektu při nekonečně velké koncentraci, a tak spolehlivě stanovit základnu pro relativní vyjádření velikosti efektu. Metoda je exaktní, použití váhy pro jednotlivá měření vychází z logické úvahy. Strojové zpracování známená značnou úsporu lidské práce a času při rutinním vyhodnocování pokusů. Hodnoty pD_2 získané na počítači se přitom jen velmi málo liší od hodnot získávaných klasickým způsobem, tj. odečítáním ze semilogaritmického grafu, z křivky subjektivně proložené naměřenými body. Téměř 60 % výsledků se liší o méně než 1 %, jak je zřejmo z histogramu na obr. 4. Použitá metoda též umožňuje pro každý pokus výpočet pravděpodobné chyby pD_2 , která je mírou věrohodnosti jednotlivých pokusů a umožňuje jejich objektivní statistické zpracování. Samozřejmě, že při řešení složitějších problémů receptorologie bude nutno použítou matematickou základnu rozšířit, zdokonalit a přizpůsobit novým nárokům na vyhodnocování pokusů.

Souhrn

Práce je příspěvkem ke kvantitativnímu rozboru charakteristických křivek, znázorňujících vztah mezi dávkou a účinkem látky, tedy k jedné z nejzákladnějších otázek experimentální farmakologie. Autor vychází z receptorové teorie s poukazem na platnost rovnice Michaelise a Mentenové pro děj, jenž je v prvé fázi charakterisován tvorbou komplexu ve zvratné reakci a v druhé fázi vznikem efektu, který lineárně závisí na množství vzniklého komplexu. V reciprokových souřadnicích je tato závislost vyjádřena přímkou. Toho autor využívá k zjištění maximálního efektu, k určení a minimalizaci chyb, ke stanovení parametru pD_2 a jeho chyby apod., Zavedením váhy odvozené z teoretické úvahy odstranil zkreslení vznikající při přímkovém vyjádření závislosti.

Použití samočinného počítače odstraňuje obtíže při grafickém zpracování pokusních výsledků, zbavuje měření v největší míře subjektivních chyb a známená neobyčejnou úsporu lidské práce a času při vyhodnocování pokusů. Jistým potvrzením správnosti této moderní metody je dobrá shoda takto získaných výsledků s výsledky metod klasických.

Literatura

1. Ariens E. J.: Molecular pharmacology. Academia Press, New York-London, 1964.
2. Goldstein A. aj.: Principles of drug action. Harper & Row, New York, 1968.
3. Michaelis D., Menten M. L.: Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem. Z., 49: 333—369, 1913.
4. Havlík V., Höschl C.: Vliv nepřímých sympatolytik na adrenergní relaxaci hladkého svalu telecí trachey in vitro. Předneseno na XVII. studentské vědecké konference FVL-UK, duben 1974.
5. Kladivo B.: Měřické chyby a jejich vyrovnaná. JČMF, Praha 1943.
6. Rektorys K. aj.: Přehled užité matematiky. 2. vyd., SNTL, Praha 1968.

Dodatek

Vzorce použité k výpočtu:

Pomocné veličiny:

$$\tilde{A} = \sum w_i x_i^2 - \frac{(\sum w_i x_i)^2}{\sum w_i}$$

$$\tilde{B} = \sum w_i y_i^2 - \frac{(\sum w_i y_i)^2}{\sum w_i}$$

$$\tilde{C} = \sum w_i x_i y_i - \frac{(\sum w_i x_i)(\sum w_i y_i)}{\sum w_i}$$

*) $1.0E-06$ značí $1,0 \cdot 10^{-6}$ ap.

Konstanty v rovnici [17]:

$$a = \frac{\sum w_i y_i}{\sum w_i} - \frac{\sum w_i x_i}{\sum w_i} \cdot b$$

$$b = \frac{\tilde{C}}{\tilde{A}}$$

Residuální součet čtverců:

$$R = \tilde{B} - b \tilde{C}$$

Odhady směrodatných chyb konstant a, b:

$$s_a = \sqrt{\frac{\sum w_i x_i}{\tilde{A} \sum w_i}} \cdot s, \quad s_b = \sqrt{\frac{s}{\tilde{A}}}$$

Nestranný odhad rozptylu:

$$s^2 = \frac{R}{n-3}$$

(n značí počet měření, n - 1 počet měřených bodů vstupujících do výpočtu)*)

Hodnota pD₂:

$$pD_2 = -\log K_A = \log \frac{a}{b} = f$$

Střední kvadratická chyba hodnoty pD₂:

$$\begin{aligned} s_{pD_2} &= \sqrt{\left(\frac{\partial f}{\partial b}\right)^2 s_{b^2} + \left(\frac{\partial f}{\partial a}\right)^2 s_{a^2}} = \\ &= 0,434294 \sqrt{\left(\frac{s_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{s_a}{a}\right)^2} \end{aligned}$$

Pravděpodobná chyba pD₂:

$$\varepsilon_p = 0,6745 s_{pD_2}$$

Pravděpodobná chyba průměru hodnot pD₂:

Jsou-li jednotlivé hodnoty pD₂ označeny p₁, p₂, ..., p_n, je jejich průměr

$$\bar{p} = \frac{1}{n} (p_1 + p_2 + \dots + p_n)$$

a pravděpodobná chyba tohoto průměru je

$$\bar{m} = \frac{1}{n} \sqrt{\varepsilon_{p1}^2 + \varepsilon_{p2}^2 + \dots + \varepsilon_{pn}^2}$$

*) Do rovnice (14) nevstupují totiž měřené délky, kterých je n, ale jen jejich rozdíly, kterých je n - 1.