

Słowa kluczowe: dawka – efekt toksyczny, toksyczność mieszaniny chemikalii, oddziaływanie toksyn, addytywność toksyn, synergia toksyn, antagonizm toksyn

Józef Grabowski*

ZALEŻNOŚĆ „DAWKA – EFEKT TOKSYCZNY” MIESZANINY CHEMIKALII

1. WSTĘP

Substancje, nazywane inhibitorami mogą spowalniać, a nawet wstrzymywać, procesy enzymatyczne. Ich efekt inhibicji charakteryzuje wielkość zwana toksycznością:

$$T(I) = \frac{E(0) - E(I)}{E(0)} = 1 - E_r(I) \quad (1)$$

gdzie $E(0)$ jest zmierzonym efektem biologicznym bez inhibitora (względna szybkością wzrostu biomasy, szybkością generacji dwutlenku węgla, szybkością konsumpcji tlenu, itp.),

$E(I)$ jest efektem biologicznym w obecności inhibitora,

I jest koncentracją inhibitora,

$E_r(I)$ jest względnym efektem biologicznym

Z definicji (1) wynika, że toksyczność może zmienić się w przedziale 0–1.

Ze względu na to, że nawet w pojedynczej komórce może znajdować się kilka tysięcy różnych enzymów, i dodatkowo, w pożywce, kilka milionów różnych związków chemicznych, wydawałoby się, że problem „toksyczności mieszaniny toksyn” jest nierozwiązywalny (tzn. nie da się przewidzieć toksyczności mieszaniny).

W literaturze światowej [1,2,3,4], jako podstawowe, dla dyskusji nad efektami mieszaniny (addytywność, synergizm, antagonizm oraz ewentualny wpływ związków chemicznych, które nie są inhibitorami na inhibitory) przyjmuje się: „Loewe concentration addition concept” [5,6] oraz „Bliss independent action concept” [7].

* Politechnika Poznańska, Instytut Fizyki, Nieszawska 13a St. 60-965 Poznań,
e-mail: jgrab@phys.put.poznan.pl

Wiele innych koncepcji, najczęściej, czysto matematycznych, nie ma nic wspólnego z „naturą biologii” (a przecież toksyczność, jest wielkością biologiczną).

Z prezentowanej teorii wynika, że obie, wyżej wspomniane koncepcje, nie stosują się do rzeczywistych problemów; bo pierwsza, jest szczególnym przypadkiem (rzadko występującym w rzeczywistości), a druga, wynika z rozważań probabilistycznych (wzory teorii prawdopodobieństwa stosują się do „wielkich liczb”, a w rzeczywistości seria pomiarów toksyczności, rzadko przekracza 10).

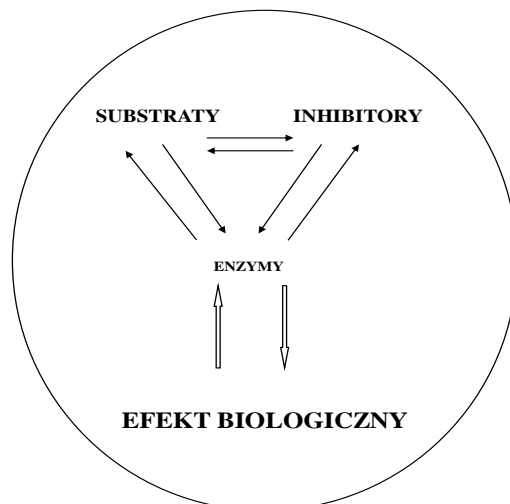
Niniejsza praca prezentuje teorię (wraz z weryfikacją – wyniki eksperymentalne badaczy zagranicznych [8,9]) „toksyczności mieszaniny chemicznej”. Teoria jest biologiczną, bo wynika z podstawowej cechy obiektów biologicznych, jaką są reakcje enzymatyczne.

Prezentowana teoria „toksyczności mieszaniny toksyn” („mixture toxicity”) pokazuje, że przewidywanie toksyczności mieszaniny związków chemicznych (z co najmniej jednym inhibitorem), jest możliwe – oczywiście, po wykonaniu odpowiednich pomiarów eksperymentalnych.

2. ZALEŻNOŚĆ DAWKA – EFEKT TOKSYCZNY

Obiekt biologiczny (model), będący przedmiotem analizy, prezentuje rysunek 1:

OBIEKT BIOLOGICZNY (komórka, tkanka, organizm, biocenoza)



Rys. 1. Obiekt biologiczny: substraty + enzymy oraz związki chemiczne (z których, co najmniej jeden, jest inhibitorem badanego efektu biologicznego)

Toksyczność (inhibicję) – w prezentowanej teorii (patrz również Dodatki) – charakteryzuje jeden, ogólny wzór (2) - ma on zastosowanie do każdego układu: „obiekt biologiczny w mieszaninie chemikalii, z co najmniej jednym inhibitorem.

$$T_{0123..n} = \frac{\frac{I_{0123..n}^{1/\Omega_{123..n}}}{k_{0123..n} I_{0_123_n}}}{1 + \frac{I_{0123..n}^{1/\Omega_{123..n}}}{k_{0123..n} I_{0_123..n}}} \quad (2)$$

$$T_{0123..n_add} = \frac{\frac{I_{0123..n}}{I_{0_123_n_add}}}{1 + \frac{I_{0123..n}}{I_{0_123..n_add}}} \quad (3)$$

Zależność (3) (charakteryzująca toksyczność addytywną) jest szczególnym przypadkiem zależności (2) – gdy $\Omega_{123..n} = 1$ oraz $k_{123..n} = 1$.

Aby lepiej zrozumieć zależności (2) i (3), zapiszemy je kolejno dla mieszaniny 2 oraz 3 inhibitorów.

Mieszanina 2 inhibitorów:

$$T_{012} = \frac{\frac{I_{012}^{1/\Omega_{12}}}{k_{012} I_{0_12_add}}}{1 + \frac{I_{012}^{1/\Omega_{12}}}{k_{012} I_{0_12_add}}} \quad (4)$$

$$T_{012_add} = \frac{\frac{I_{012}}{I_{0_12_add}}}{1 + \frac{I_{012}}{I_{0_12_add}}} \quad (5)$$

gdzie:

$$I_{012} = \frac{I_{0_2} * I_1^{1/\kappa_1} + I_{0_1} * I_2^{1/\kappa_2}}{I_{0_1} + I_{0_2}} \quad (6a)$$

$$I_{0_{-12_add}} = \frac{I_{0_{-1}} * I_{0_{-2}}}{I_{0_{-1}} + I_{0_{-2}}} \quad (6b)$$

oraz:

I_1, I_2 : to koncentracje inhibitorów, pierwszego i drugiego, w mieszaninie, $\kappa_1, \kappa_2, I_{0_{-1}} \cdot I_{0_{-2}}$ są parametrami charakteryzującymi odpowiednio inhibitor 1 oraz inhibitor 2.

W przypadku jednego inhibitora ($\Omega_{12} = 1, k_{012} = 1$), zależności (2) i (3) redukują się do:

$$T_1 = \frac{\frac{I_1^{1/\kappa_1}}{I_{0_{-1}}}}{1 + \frac{I_1^{1/\kappa_1}}{I_{0_{-1}}}} \quad (7)$$

$$T_{1_add} = \frac{\frac{I_1}{I_{0_{-1}}}}{1 + \frac{I_1}{I_{0_{-1}}}} \quad (8)$$

Podobnie dla inhibitora 2.

Zależność (7) można przekształcić do postaci:

$$\frac{I_1^{1/\kappa_1}}{I_{0_{-1}}} = \frac{T_1}{1 - T_1} \Rightarrow \quad (9a)$$

$$\Rightarrow \log \frac{T_1}{1 - T_1} = \frac{1}{\kappa_1} \log I_1 - \log I_{0_{-1}} \Rightarrow \quad (9b)$$

$$\Rightarrow y = a * x + b \quad (9c)$$

Znając wartości pomiarowe T_1 , łatwo wyznaczyć drogą regresji liniowej (zależność (9c) jest równaniem prostej), wartości współczynników a oraz b, a następnie κ_1 i I_{0_1} . Podobnie można wyznaczyć κ_2 i I_{0_2} , dla drugiego inhibitora. Dla mieszaniny dwu inhibitorów mamy dwa niewiadome parametry: Ω_{12} oraz k_{012} . Można je wyznaczyć w sposób identyczny, jak dla pojedynczego inhibitora. Dla mieszaniny dwu inhibitorów, mamy:

$$T_{012} = \frac{\frac{I_{012}^{1/\Omega_{12}}}{k_{012} I_{0_12_add}}}{1 + \frac{I_{0123..n}^{1/\Omega_{12}}}{k_{012} I_{0_12_add}}} \quad (10a)$$

lub

$$\frac{I_{012}^{1/\Omega_{12}}}{k_{012} I_{0_12_add}} = \frac{T_{12}}{1 - T_{12}} \quad (10b)$$

skąd, po obustronnym zlogarytmowaniu ostatniego wyrażenia, uzyskuje się:

$$\log \frac{T_{12}}{1 - T_{12}} = \frac{1}{\Omega_{12}} \log I_{012} - \log [k_{012} * I_{012_add}] \quad (11)$$

co jest równaniem prostej: $Y = A * X + B$, z której (z pomiarów T_{12}), metodą regresji liniowej, łatwo wyznaczyć wartości A oraz B, a następnie Ω_{12} i k_{012} .

Mieszanina 3 inhibitorów:

$$T_{0123} = \frac{\frac{I_{0123}^{1/\Omega_{123}}}{k_{0123} I_{0_123_add}}}{1 + \frac{I_{0123..n}^{1/\Omega_{12}}}{k_{0123} I_{0_123_add}}} \quad (12)$$

$$T_{0123_add} = \frac{\frac{I_{0123}}{I_{0_123_add}}}{1 + \frac{I_{0123}}{I_{0_123_add}}} \quad (13)$$

gdzie:

$$I_{0123} = \frac{I_{0-2} * I_{0-3} * I_1^{1/\kappa_1} + I_{0-3} * I_{0-1} * I_2^{1/\kappa_2} + I_{0-1} * I_{0-2} * I_3^{1/\kappa_3}}{I_{0-2} * I_{0-3} + I_{0-3} * I_{0-1} + I_{0-1} * I_{0-2}} \quad (14a)$$

$$I_{0-12-add} = \frac{I_{0-1} * I_{0-2} * I_{0-3}}{I_{0-1} * I_{0-2} + I_{0-1} * I_{0-3} + I_{0-2} * I_{0-3}} \quad (14b)$$

Wartości parametrów Ω_{123} oraz k_{0123} , wyznacza się w sposób identyczny, jak opisano powyżej. Podobnie postępuje się dla mieszaniny o dowolnej ilości inhibitorów (4,5,6 itd.).

Może się zdarzyć, że wpływ na wynikową toksyczność (inhibicję) ma związek chemiczny, który sam nie jest inhibitorem. Wówczas należy wyznaczyć wartości parametrów dla kilku koncentracji tego związku, po czym wykreślić zależności parametrów od jego koncentracji.

Mając te wykresy, można przewidywać toksyczność (efekt inhibicji) dla mieszaniny identycznych toksyn i związków chemicznych o innych koncentracjach.

W przypadku mieszaniny toksyn (inhibitorów), zasadniczym jest pytanie, czy dana mieszanina jest addytywna, synergistyczna, czy może antagonistyczna.

Odpowiedzią jest:

$$R = \frac{T_{exp}}{T_{0123..n_add}} = \frac{T_{exp}}{\frac{I_{0123..n}}{\frac{I_{0-123..n_add}}{1 + \frac{I_{0123..n}}{I_{0-123..n_add}}}}} \quad (15)$$

gdzie T_{exp} jest mierzoną wartością toksyczności danej mieszaniny (czy pojedynczego inhibitora). Gdy wyznaczone wartości $\Omega_{123..n}$ oraz $k_{0123..n}$ są bliskie jedności, to dana mieszanina jest jakby „automatycznie” addytywną. Gdy $R \cong 1$, mieszanina jest addytywna; gdy $R > 1$ wówczas mieszanina jest synergistyczna; natomiast, gdy $R < 1$, wówczas mieszanina jest antagonistyczna.

3. DYSKUSJA I WERYFIKACJA TEORII

Teoria biologiczna może być logiczną, a mimo to nie sprawdzać się w rzeczywistości.

Ze względu na to, że przedstawiona powyżej teoria „toksyczności mieszaniny toksyn” bierze się z rzeczywistości, tj. rozważa „obiekt biologiczny” (patrz rys. 1) jakim on jest w rzeczywistości, to już z samej definicji, musi być praktyczną. Sprawa jest

podobna do zależności Michaelis'a – Menten oraz zależności Monod'a. Zależność Michaelis'a – Menten przedstawia szybkość generacji produktu w reakcji enzymatycznej z jednym substratem i jednym enzymem. Dla tak prostej reakcji, nie jest trudnym, wyprowadzić zależność na szybkość generacji produktu:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} * S}{K_S + S} \quad (16)$$

gdzie μ_{\max} , S , K_S są odpowiednio maksymalną (dla $S \rightarrow \infty$) względną szybkością generacji produktu, koncentracją substratu, oraz stałą określającą koncentrację substratu, dla której $\mu = \mu_{\max} / 2$.

Zależność Monod'a określa względną szybkość wzrostu biomasy, np. osadu czynnego (osad czynny zawiera w sobie kilka tysięcy różnych rodzajów mikroorganizmów, których pożywką są substancje organiczne z wieloma związkami chemicznymi) i ma postać:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} * S}{K_M + S} \quad (17)$$

Wzór Monod'a potwierdza się w pomiarach eksperymentalnych. Oczywiście K_M , w tym przypadku, nie jest wielkością daną, a jedynie parametrem wyznaczonym, wcześniej, eksperymentalnie. Cała złożoność rzeczywistego układu, zawiera się w wartościach pomiarowych μ_{\max} oraz K_M . Nie trzeba znać wszystkiego o układzie – wystarczy znać wartości μ_{\max} oraz K_M .

Podobnie jest z zależnością „dawka – efekt toksyczny”. Dla pojedynczego inhibitora (plus pojedynczy enzym, plus pojedynczy substrat), słuszna jest (i to niezależnie od rodzaju mechanizmu inhibicji – co wynika z wyprowadzenia) zależność:

$$T_1 = \frac{\frac{I_1^{1/\kappa_1}}{I_{0_1}}}{1 + \frac{I_1^{1/\kappa_1}}{I_{0_1}}} \quad (18)$$

Gdy parametry: κ_1 oraz I_{0_1} , wyznaczymy dla danego „obiektu biologicznego” i inhibitora, to wzór (18) pozostaje poprawnym dla tego obiektu i danego inhibitora, niezależnie od koncentracji tego inhibitora.

Zależność (18) sprawdza się [patrz poniżej] w rzeczywistych pomiarach (złożoność procesów jest zawarta w wartościach κ_1 oraz I_{0_1} , a te są parametrami eksperymentalnymi (a więc charakteryzującymi rzeczywisty obiekt biologiczny).

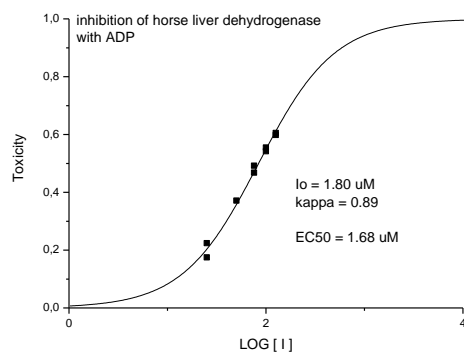
Zależność Monod'a jest słuszna (praktyczna), mimo, że nie mogła być wyprowadzona, (przewidywanie oddziaływań w przypadku tysięcy enzymów i milionów różnych związków chemicznych nie jest możliwe) bo potwierdza się w eksperymencie.

Czy zależności (4) i (12) i (18) są słuszne (praktyczne) pozostaje to zweryfikować eksperymentalnie. Poniżej, przedstawiono weryfikację prezentowanej teorii, do czego – z braku wyników krajowych – wykorzystano wyniki eksperymentalne badaczy zagranicznych [8,9].

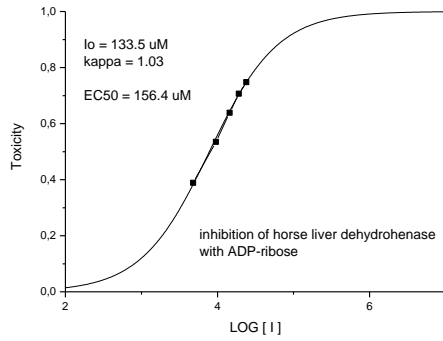
Obecne teorie „mixture toxicity” (ich wartość) dobrze charakteryzują Hertzberg et al. [10] w pracy o wiele mówiącym tytule „Synergy and other ineffective mixture risk definitions”. W obecnych teoriach, a raczej “koncepcjach” nawet nie jest jasnym, co rozumie się przez „mieszanie addytywną”. Prace [11] i [12] poświęcają temu problemowi po kilkadziesiąt stron, gdy tymczasem, definicja jest prosta (patrz DODATEK A).

Gdy „niejasna” jest definicja addytywności (jej kryterium) to automatycznie wnioski o synergizmie lub antagonizmie mogą być błędne [13,14]. Terminy występujące w obecnych koncepcjach „mixture toxicity” są różnie rozumiane przez różnych badaczy i, jak to wynika z prezentowanej teorii, są zbędne. Wystarczy kilka słów: mieszanina, addytywność, synergizm, antagonizm. To co obecnie nazywa się „complex mixture” [15], w prezentowanej teorii, traktuje się jako jeden inhibitor (mieszanina związków w cieczy, lub ciecz (np. benzyna, coca cola, itp.)).

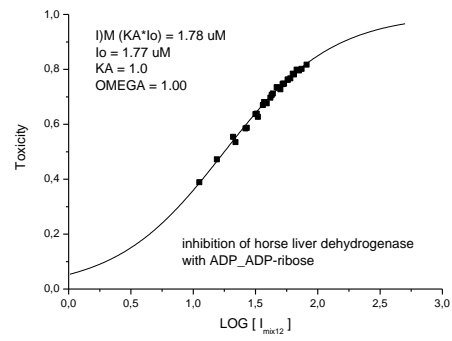
(a)



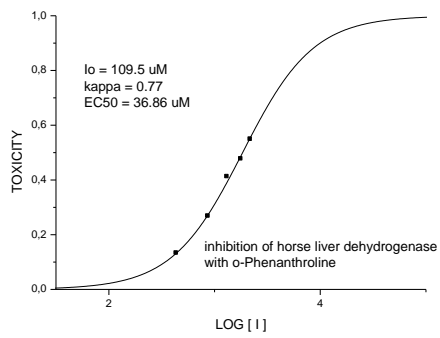
(b)



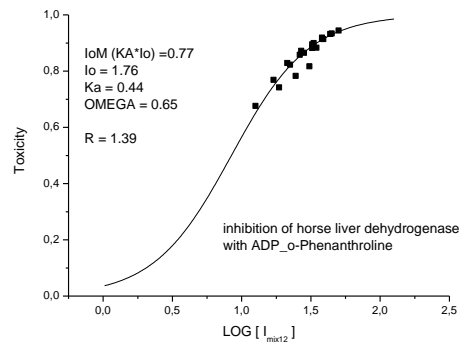
(c)



(d)

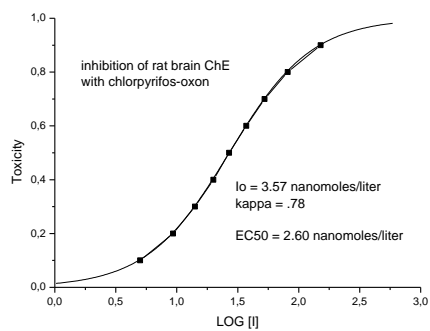


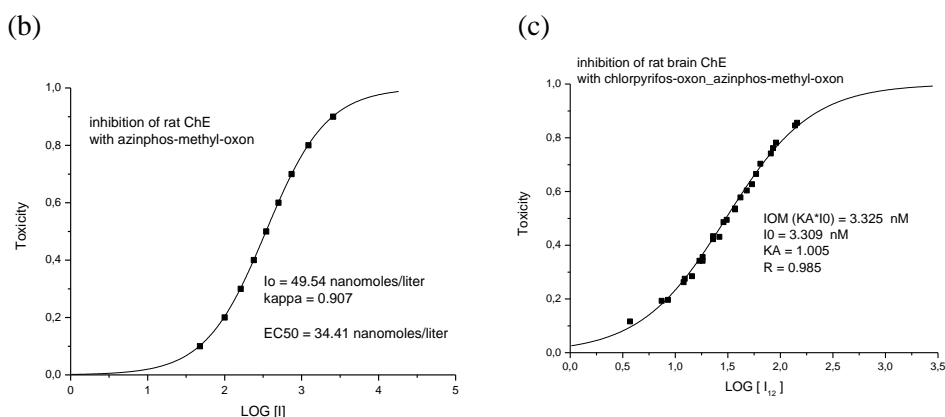
(e)



Rys. 2. Inhibicja dehydrogenazy („horse liver alcohol dehydrogenase”) przez: (a) ADP; (b) ADP – ribose; (c) mieszaninę ADP_ADp-ribose oraz (d) o-Phenantren i mieszaninę ADP_o-Phenantren (wyniki eksperymentalne z pracy [8])

(a)





Rys. 3. Inhibicja cholinesterazy przez (a) chlorpyrifos-oxon; (b) azinphos-methyl-oxon oraz ich mieszaninę (c) chlorpyrifos-oxon_azinphos-methyl-oxon (wyniki eksperymentalne z pracy [9])

Jak widać z krzywych przedstawionych na rysunkach 2, 3; prezentowana teoria powyżej (krzywe ciągłe), dobrze zgadza się z wynikami eksperymentalnymi (punkty). Przewidywaną toksyczność (inhibicję) mieszaniny dwu toksyn (inhibitorów) T_{12} (zgodnie z prezentowaną teorią) można wyliczyć z poniższego związku:

$$\frac{T_{12}}{1-T_{12}} = \frac{1}{k_{12}} \left[\frac{I_{o-1} * I_{o-2}}{I_{o-1} + I_{o-2}} \right]^{\frac{1-\Omega_{12}}{\Omega_{12}}} \left[\frac{T_1}{1-T_1} + \frac{T_2}{1-T_2} \right]^{\frac{1}{\Omega_{12}}}$$

który w przypadku mieszaniny addytywnej ($k_{12}=1$; $\Omega_{12}=1$) redukuje się do postaci:

$$\frac{T_{12}}{1-T_{12}} = \frac{T_1}{1-T_1} + \frac{T_2}{1-T_2} \Rightarrow T_{12} = \frac{T_1 + T_2 - 2T_1T_2}{1-T_1T_2}$$

Powyższe związki są zależnościami iteracyjnymi, co oznacza, że można je wykorzystać w przypadku mieszanin z większą ilością toksyn (inhibitorów). Wówczas T_{12} , k_{12} , Ω_{12} należy traktować jako pierwsze wartości, tzn. z indeksami: „1”, te same parametry trzeciej toksyny będą miały wówczas indeks: „2”.

Trzeba pamiętać, że graniczną wartością toksyczności jest „1”, stąd toksyczność T_{12} staje się bliska tej wartości wraz ze wzrostem T_1 i T_2 (co oznacza, że wzrosty T_{12} przy kolejnych wzrostach, stają się coraz mniejsze). Oznacza to, że „efekty synergistyczne” tracą znaczenie (wartość praktyczną) w przypadku mieszaniny więcej niż 3 składnikowej – mieszanina więcej składnikowa może mieć sens, w przypadku gdy „mierzymy kilka różnych efektów biologicznych jednocześnie” – co ma szczególne znaczenie w medycynie).

W związku z powyższym, próba przepowiadania toksyczności mieszaniny 16 toksyn, jak to jest w pracy Faust et al. [16], traci sens, bo już z góry można

powiedzieć, że będzie bliska 1, prócz tego przy błędzie pomiarowym około 5%, nie jest możliwym weryfikacja takiego „przewidywania”.

4. WNIOSEK KOŃCOWY

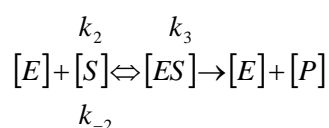
Problem „toksyczności mieszaniny toksyn”, nie jest już problemem. Prezentowana teoria dotyczy wszystkich sensownych przypadków mieszanin toksyn (czy inhibitorów).

Z teoretycznego punktu widzenia, problem przestał istnieć. Oznacza to, że o takich modelach (będącymi próbą „wymyślenia zależności matematycznych zgodnych jakotako z wynikami eksperymentalnymi”) jak : Logit, Weibull , Generalized Logit, Box-Cox-Logit, Box-Cox – Weibull czy Box-Cox-Probit wykorzystywane w [16] należy „zapomnieć”. Pozostaje problem pomiaru toksyczności – te pomiary (wykonywane na „obiekcie biologicznym”) są zwykle obarczone znacznymi błędami eksperymentalnymi. Przy pomiarach trzeba niewątpliwie zadbać o to, aby warunki, w jakich znajduje się „obiekt biologiczny”, w czasie pomiaru i w czasie stosowania (np. lekarstwa wieloskładnikowego), były w miarę możliwości zbliżone.

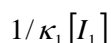
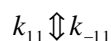
Obecna teoria prosi się o zastosowania wszędzie tam gdzie „bio” odgrywa istotną rolę, a więc np. w medycynie, farmakologii, biotechnologii, biochemii, ekologii, ochronie środowiska.

DODATEK A: Geneza teorii

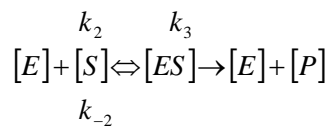
a)

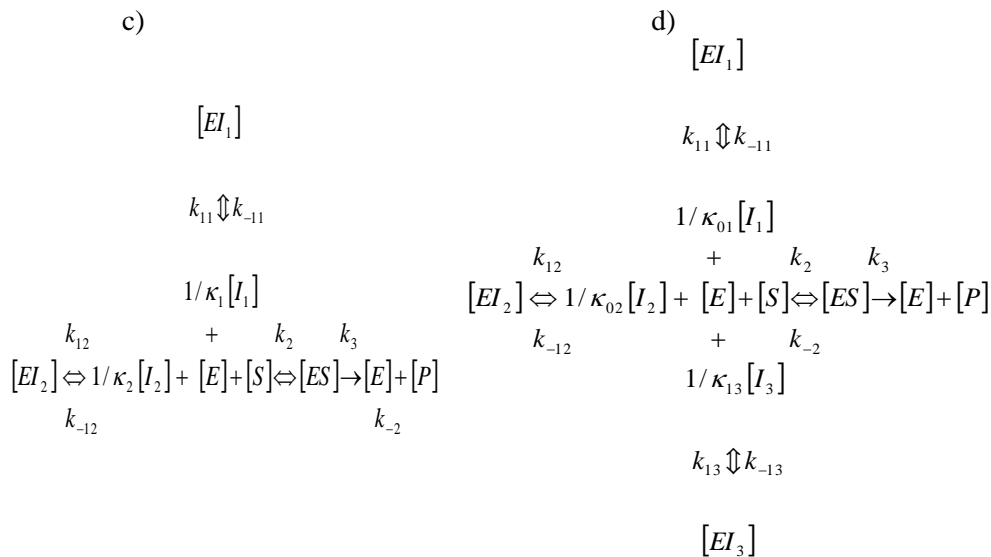


b)



+





Schemat 1

Schematy reakcji enzymatycznych: A1: bez inhibitora; A2: z jednym inhibitorem; A3: z dwoma inhibitorami; A4: z trzema inhibitorami.

W schemacie 1, stałe szybkości reakcji, w przypadku 3 inhibitorów (d) oraz 2 inhibitorów (c), pozostawiono bez zmiany w stosunku do inhibicji z 1 inhibitorem (b). Oznacza to, że założono, że każdy następny inhibitor nie wpływa na oddziaływanie poprzednich inhibitorów, z enzymem (czy enzymu z substratem). Charakteryzuje to mieszaninę addytywną (i stanowi, zarazem, jej definicję).

Analiza schematu z 1 inhibitorem (1b) prowadzi do zależności na toksyczność:

$$(A1) \quad T_1 = \frac{\frac{I_1^{1/\kappa_1}}{I_{0_1}}}{1 + \frac{I_1^{1/\kappa_1}}{I_{0_1}}} \quad \Rightarrow \quad (A2) \quad T_{1_add} = \frac{\frac{I_1}{I_{0_1}}}{1 + \frac{I_1}{I_{0_1}}}$$

Podobnie, analiza schematu (1c), prowadzi do zależności:

(A2)

$$\begin{aligned}
T_{12_add} &= \frac{\frac{I_1^{1/\kappa_1}}{I_{o-1}} + \frac{I_2^{1/\kappa_2}}{I_{o-2}}}{1 + \frac{I_1^{1/\kappa_1}}{I_{o-1}} + \frac{I_2^{1/\kappa_2}}{I_{o-2}}} = \frac{\frac{I_{o-2} I_1^{1/\kappa_1} + I_{o-1} I_2^{1/\kappa_2}}{I_{o-1} I_{o-2}}}{1 + \frac{I_{o-2} I_1^{1/\kappa_1} + I_{o-1} I_2^{1/\kappa_2}}{I_{o-1} I_{o-2}}} = \frac{\frac{\frac{I_{o-2} I_1^{1/\kappa_1} + I_{o-1} I_2^{1/\kappa_2}}{I_{o-1} + I_{o-2}}}{\frac{I_{o-1} I_{o-2}}{I_{o-1} + I_{o-2}}}}{1 + \frac{\frac{I_{o-2} I_1^{1/\kappa_1} + I_{o-1} I_2^{1/\kappa_2}}{I_{o-1} + I_{o-2}}}{\frac{I_{o-1} I_{o-2}}{I_{o-1} + I_{o-2}}}}} = \\
&= \frac{\frac{I_{12}}{I_{o-12_add}}}{1 + \frac{I_{12}}{I_{o-12_add}}}
\end{aligned}$$

Identycznie, analizując schemat (1d), uzyskuje się:

$$\begin{aligned}
T_{123_add} &= \frac{\frac{I_1^{1/\kappa_1}}{I_{o-1}} + \frac{I_2^{1/\kappa_2}}{I_{o-2}} + \frac{I_3^{1/\kappa_3}}{I_{o-3}}}{1 + \frac{I_1^{1/\kappa_1}}{I_{o-1}} + \frac{I_2^{1/\kappa_2}}{I_{o-2}} + \frac{I_3^{1/\kappa_3}}{I_{o-3}}} = \frac{\frac{I_{o-2} I_{o-3} I_1^{1/\kappa_1} + I_{o-3} I_{o-1} I_2^{1/\kappa_2} + I_{o-1} I_{o-2} I_3^{1/\kappa_3}}{I_{o-1} I_{o-2} I_{o-3}}}{1 + \frac{I_{o-2} I_{o-3} I_1^{1/\kappa_1} + I_{o-3} I_{o-1} I_2^{1/\kappa_2} + I_{o-1} I_{o-2} I_3^{1/\kappa_3}}{I_{o-1} I_{o-2} I_{o-3}}} = \\
&= \frac{\frac{I_{o-2} I_{o-3} I_1^{1/\kappa_1} + I_{o-3} I_{o-1} I_2^{1/\kappa_2} + I_{o-1} I_{o-2} I_3^{1/\kappa_3}}{I_{o-2} I_{o-3} + I_{o-3} I_{o-1} + I_{o-1} I_{o-2}}}{1 + \frac{I_{o-1} I_{o-2} I_{o-3}}{I_{o-2} I_{o-3} + I_{o-3} I_{o-1} + I_{o-1} I_{o-2}}} = \frac{\frac{I_{123}}{I_{0_123_add}}}{1 + \frac{I_{123}}{I_{0_123_add}}}
\end{aligned} \tag{4}$$

$$T_{123..n_add} = \frac{\frac{I_{123..n}}{I_{0_123..n_add}}}{1 + \frac{I_{123..n}}{I_{0_123..n_add}}} \tag{5}$$

Można pokazać, że zależności dawka – efekt toksyczny (A1, A2 i A3) nie zależą od mechanizmu inhibicji (tj., czy to jest inhibicja konkurencyjna – jak to przedstawiają schematy – czy akonkurencyjna, niekonkurencyjna czy też mieszana.

Ze tego, że zależności (ich ogólna postać) nie zależą, ani od ilości inhibitorów, ani od mechanizmu inhibicji, można przyjąć, że charakteryzują one inhibicję mieszaniny (pojedynczy inhibitor można traktować jako najprostszą mieszaninę, np. próbka o koncentracji inhibitora 500 mg/l jest mieszaniną koncentracji 200 i 300 mg/l – i stąd może taki inhibitor być: addytywny – zachowywać się, jakby był zwykłą mieszaniną 200 + 300 mg/l ; synergistyczny (o większej toksyczności niż efekt od zwykłej sumy koncentracji) lub antagonistyczny (o mniejszej toksyczności niż efekt od zwykłej sumy koncentracji)).

DODATEK B: Od ogólności (pojedynczy inhibitor) do addytywności oraz od addytywności do ogólności (mieszanina inhibitorów).

$$T_1 = \frac{\frac{I_1^{1/\kappa_1}}{I_{0_1}}}{1 + \frac{I_1^{1/\kappa_1}}{I_{0_1}}} \Rightarrow T_{1_add} = \frac{\frac{I_1}{I_{0_1}}}{1 + \frac{I_1}{I_{0_1}}}$$

⇓

$$T_{12_add} = \frac{\frac{I_{12}}{I_{o_12_add}}}{1 + \frac{I_{12}}{I_{o_12_add}}}$$

⇓

$$T_{123_add} = \frac{\frac{I_{123}}{I_{0_123_add}}}{1 + \frac{I_{123}}{I_{0_123_add}}}$$

..... itd.

⇓

$$T_{123} = \frac{\frac{I_{123}^{1/\Omega_{123}}}{k_{123} I_{0_123_dd}}}{1 + \frac{I_{123}^{1/\Omega_{123}}}{k_{123} I_{0_123_add}}} \Leftarrow T_{123_add} = \frac{\frac{I_{123}}{I_{0_123_add}}}{1 + \frac{I_{123}}{I_{0_123_add}}}$$

Co w ogólności można zapisać:

$$T_{123..n} = \frac{\frac{I_{123..n}^{1/\Omega_{123..n}}}{k_{123..n} I_{0_123..n_add}}}{1 + \frac{I_{123..n}^{1/\Omega_{123..n}}}{k_{123..n} I_{0_123..n_add}}} \Rightarrow T_{123..n} = \frac{\frac{I_{123..n}^{1/\Omega_{123..n}}}{I_{0_123..n}}}{1 + \frac{I_{123..n}^{1/\Omega_{123..n}}}{I_{0_123..n}}}$$

$$R_{12_measured}(I_{12}) = \frac{T_{12_measured}(I_{12})}{T_{12_additive}(I_{12})} = \frac{\frac{\frac{I_{12}^{1/\Omega_{12}}}{I_{o_12}}}{1 + \frac{I_{12}}{I_{o_12}}}}{\frac{I_{12}}{I_{o_12_add}} \left(1 + \frac{I_{12}}{I_{o_12_add}} \right)}$$

LITERATURA

- [1] J. Topaly, S Fruehauf, AD Ho and AJ Zeller: "Rationale for combination therapy of chronic myelogenous leukaemia with imatinib and irradiation or alkylating agents: implications for pretransplant conditioning"; British Journal of Cancer 86, 1487-1493, (2002).
- [2] A. E. Engel-Kofoed: "Single substance and mixture toxicity of three toxicants with similar and dissimilar modes of action to Daphnia magna"; Master Thesis in Environmental Biology, Roskilde University, Denmark (2005).
- [3] A.A. Adjei, Ch. Erlichman, J. A. Sloan, J.M. Reid, H.C. Pitot, R.M. Goldberg, P. Peethambaram, P. Atherton, L.J. Hanson, S.R. Alberts and J. Jett: "Phase I and Pharmacologic Study of Sequence of Gemcitabine and the Multitargeted Antifolate Agent in Patients with Advanced Solid Tumors"; J. Clin. Oncol. Vol 18, Issue 18, 1748-1757 (2000).
- [4] Tallarida R.J.: "Drug Synergism: Its Detection and Applications"; J. Pharmacol. Exp. Ther, 298, pp. 865-872 (2001).
Loewe S.: "Die Quantification Probleme der Pharmacologie"; Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exp. Pharmacol. 27, pp. 47-187 (1928).
- [5] Loewe S.: "The problem of synergism and antagonism of combined drugs"; Arzneimittelforschung 3, pp. 285-290 (1953).
- [6] Bliss C.I.: "The toxicity of poisons applied jointly"; Ann. Appl. Biol. 26, pp. 585-615 (1939).
- [7] T.C. Chou and P. Talalay: "Generalized Equations for the Analysis of Inhibitions of Michaelis-Menten and Higher-Order Kinetic Systems with Two or More Mutually Exclusive and Nonexclusive Inhibitors"; Eur. J. Biochem. 115, pp. 207-216 (1981).

- [8] R.L. Carr, H.W. Chambers, J.E. Chambers, S.F. Oppenheimer and J.R. Richardson: "Modelling the interactions of mixtures of organophosphorus insecticides with cholinesterase"; *Electron. J. Diff. Eqns. Conf.* 10, pp. 89-99 (2002).
- [9] Hertzberg R.C. and M.M. MacDonell: "Synergy and other ineffective mixture risk definitions"; *Sci. Total Environm.* 288, pp. 31-42 (2002).
- [10] Berenbaum M.C.: "What is Synergy?"; *Pharmacol. Rev.*, No. 41, pp. 93-141 (1989).
- [11] Greco B. and J.C. Parsons: "The Search for Synergy: A Critical Review from a Response Surface Perspective"; *Pharmacol. Rev.* Vol. 47, pp. 331-385 (1995).
- [12] Afeltra J., E. Dannaoui, J.F.G.M. Meis, J.L. Rodriguez-Tudela, P.E. Verweij and E. Network: "In Vitro Synergistic Interaction between Amphotericin B and Pentamidine against *Scedosporium prolificans*"; *J. Antimicrob. Chemother.* Vol. 46, No. 10, pp. 3323-3326 (2002).
- [13] Kortenkamp A. and R. Altenburger: "Synergisms with mixtures of xenoestrogens: A reevaluation using the method of isoboles"; *Sci. Total Environm.* 221, pp. 59-73 (1998).
- [14] Groten J.P., V.J. Feron and J. Suhnel: "Toxicology of simple and complex mixtures"; *TRENDS in Pharmacological Sciences* Vol. 22, No. 6, pp. 316-322 (2001).
- [15] Faust M., R. Altenburger, T. Backhaus, H. Blanck, W. Boedeker, P. Gramatica, V. Hamer, M. Scholze, M. Vighi and L.M. Grimme: "Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action"; *Aquatic Toxicity* 63, pp. 43-63 (2003).

THE "DOSE – TOXIC EFFECT" RELATIONSHIP FOR A CHEMICAL MIXTURE

Mixture toxicity problem has been solved. The developed theory applies to any chemical mixture with, at least, one inhibitor. Single, general, relationship for a dose – toxic effect' holds for both single inhibitor or a mixture of inhibitors (with additional chemicals). With the theory joint effects: additivity, synergism, antagonism and potentiatioon can be easily studied for any mixtures. The presented theory is biologically motivated.