

DENEY NO: 10

AKUT TOKSİSİTE TAYİNİ (LD₅₀ TAYİNİ)

A) Genel Bilgi:

Akut toksisite ölçüsü olarak kullanılan başlıca 3 değer vardır. Bunlar:

I-Öldürücü Doz (Letal Doz₅₀): LD₅₀ kısaltması ile gösterilir. Solunum yolu dışında diğer bütün yollar ile organizmaya girerek etki gösteren katı veya sıvı haldeki kimyasal maddelerin akut toksisite ölçüsüdür. Belli koşullarda, bir defada verilmekle bir gruptaki deney hayvanlarının %50'sini öldüren kimyasal madde miktarı olup birimi **mg/kg**'dir.

II-Öldürücü Konsantrasyon₅₀ (Letal Konsantrasyon₅₀): LC₅₀ kısaltması ile gösterilir. Solunum yoluyla organizmaya girerek etki gösteren gaz halindeki kimyasal maddelerin akut toksisite ölçüsüdür. Belirli koşullarda, solunum yolu ile bir gruptaki deney hayvanlarının %50'sini öldüren kimyasal maddenin solunan havadaki konsantrasyonu olup birimi **ppm** veya **mg/m³** havadır.

III-En Küçük Öldürücü Doz (Minimal Letal Doz): MLD kısaltması ile gösterilir. Bir hayvanı öldüren en az kimyasal madde miktarıdır.

Burada özellikle LD₅₀ tayini üzerinde durulacaktır.

Akut toksisite tayinlerinde geçerli sonuçlara ulaşabilmek için belirli koşullara uymak gerekir. Bunları şöyle sıralayabiliriz:

- **Deney hayvanının türü:** Akut toksisite tayinlerinde en çok kullanılan hayvan türleri; fare, rat (sıçan), kobay gibi kemiriciler ile köpeklerdir. Bir kimyasal maddenin toksisitesi organizmadaki metabolizması ile ilgilidir. Türler arasındaki metabolizma farklılıkları toksisitenin türlere göre farklı olmasına neden olur. Türe bağlı hassasiyet ve dayanıklılıktan kaynaklanan yanılmalardan kaçınmak için akut toksisite tayinini ikinci bir türde tekrarlamak gereği vardır.
- **Deney hayvanlarının özellikleri:** Deney hayvanlarının cinsiyet, yaş, ağırlık gibi özellikleri akut toksisite tayininde önemlidir.
Doz grupları mümkün olduğunca %50 dişi, %50 erkek bireylerden oluşturulmalı, gebe olan dişiler kullanılmamalıdır.
Denemede kullanılacak hayvanlar, duruma göre genç veya ergin olmalı, ağırlıkları arasında büyük farklar bulunmamalıdır.
Ayrıca denemeye alınan hayvanlar sağlıklı olmalı ve daha önceden hiçbir ilaç uygulanmamış olmalıdır.
- **Deney hayvanlarının sayısı:** Sağlıklı bir istatistiksel sonuca ulaşabilmek için, her doz grubunda yeterli sayıda hayvan bulunmalıdır. Bu sayı, genellikle her doz grubu için 8 veya 10'dur.
- **Deney koşulları:** Denenecek kimyasal bileşik, ilk olarak özelliğine ve veriliş yoluna göre çözelti, süspansiyon veya emülsiyon yapılarak deney hayvanına verilecek hale getirilir. Çözelti, süspansiyon veya emülsiyon yapmak için kullanılan yardımcı maddelerin toksisitesi olmamalı ve ne şekilde olursa olsun denemeyi etkilememelidir.

İlacın verilme hızı ve hacmi, belli sınırlar içinde olmalıdır.

Deney hayvanları deney öncesinden hazırlanmalı, örneğin denenecek madde ağız yolu ile verilecekse hayvanlar bir gün öncesinden aç bırakılmalı fakat istedikleri kadar su içebilmeleri sağlanmalıdır.

Akut toksisite tayini, ilaçların veriliş yollarından herhangi biri ile (per-os, ip, iv, sc) yapılabilir. Doğal olarak, kullanılan veriliş yolu da bulunan değerlerle birlikte gösterilmelidir. Örneğin, kokain hidroklorat LD₅₀: 26 mg/kg (iv fare) şeklinde gösterilir.

LD₅₀ tayininde doz gruplarının saptanması için bir grup hayvana değişik dozlar verilerek denenecek maddenin toksisitesi hakkında bir fikir sahibi olunur. Daha sonra, bu yaklaşık değere göre doz grupları saptanır.

SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Kokain klorhidrat ile belirtilmiş olan şartlara uygun olarak yapılan bir LD₅₀ tayini çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda gösterilmiştir.

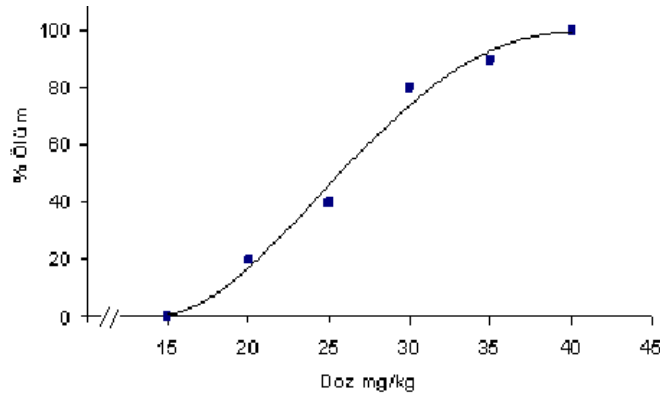
Deney hayvanı: Fare
İlacın veriliş yolu : iv

Grup	Gruptaki hayvan sayısı	Dozlar(mg/kg)	Ölüm sayısı	% Ölüm
A	10	15	0	0
B	10	20	2	20
C	10	25	4	40
D	10	30	6	80
E	10	35	8	90
F	10	40	10	100

Bu denemede, 6 doz grubu ve her doz grubunda 10'ar olmak üzere, toplam 60 adet deney hayvanı kullanılmıştır.

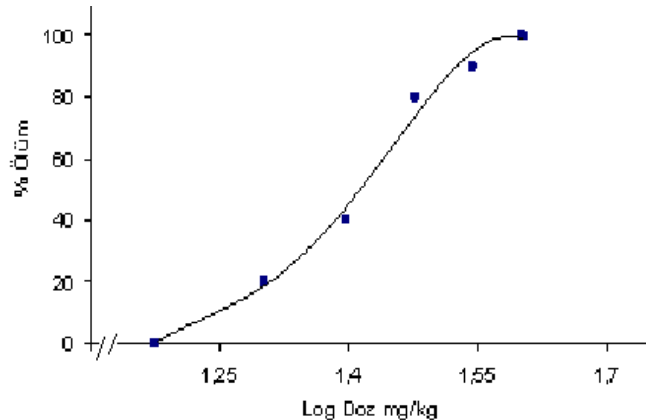
Sonuçların değerlendirilmesi için değişik yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler arasında en çok kullanılanlar, aşağıda ele alınmıştır.

I. Traven yöntemi: Grafik kağıdında, dozlar x-eksenine, bu dozlara karşılık gelen ölüm yüzdeleri ise y-eksenine işlenirse, karakteristik sigmoidal eğri elde edilir. Grafikte, %50 ölüm oranının x-eksenindeki karşılığının bulunması ile LD₅₀ değeri bulunur.



II. Aynı amaçla kullanılan bir diğer grafiksel yöntem: Bu yöntemde x-eksenine **log doz** (mg/kg), y- ekstenine ölüm yüzdesi işaretlenir. Değerler grafiğe geçirildiğinde;

Log Doz	% Ölüm
Log 15: 1,17609	0
Log 20: 1,30103	20
Log 25: 1,39794	40
Log 30: 1,47712	80
Log 35: 1,54407	90
Log 40: 1,60206	100



Bu grafikten LD₅₀ değerlerinin bulunması, Traven yönteminde olduğu gibidir. Grafikten bulunan değer, Log Doz cinsindedir ve buna karşılık olan dozun bulunması için, değerın antilog'u hesaplanmalıdır.

III. Reed-Muench yöntemi: Grafıksel bir yöntemdir. Açıklanan diğler iki yöntemden farkı, %ölümlerin değışik bir şekilde hesaplanmasıdır.

Dozlar Mg/kg	Her grupta gözlenen ölüm sayısı	Her grupta canlı kalan hayvan sayısı	Toplam ölüm	Toplam canlı	Genel toplam	Ölüm oranı	% Ölüm
15	0	10	0	27	27	0/27	0
20	2	8	2	17	19	2/19	10,5
25	4	6	6	9	15	6/15	40
30	8	2	14	3	17	14/17	82,4
35	9	1	23	1	24	23/24	95,8
40	10	0	33	0	33	33/33	100

Yukarıdaki tabloda **toplam ölüm**, o doz grubundaki ve o doz grubundan daha küçük doz gruplarındaki ölüm sayılarının toplamını, **toplam canlı** ise o doz grubundaki ve o doz grubundan daha büyük doz gruplarındaki canlı sayılarının toplamını gösterir. **Genel toplam** ise, "Toplam ölüm+Toplam canlı"dır. Böyle bir hesaplama hangi düşünce yolu izlenerek yapılır? Bunu bir örnekle açıklayalım.

20 mg/kg doz grubunu ele alalım: Bu grupta, 4 ölüm ve 6 canlı vardır.

- 20 mg/kg'dan daha büyük doz gruplarında canlı kalan hayvanlar eğer 20 mg/kg doz grubunda olsalardı, doğal olarak canlı kalacaklardı. O halde, daha büyük doz gruplarında canlı kalan hayvan sayısının toplamını, 20 mg/kg doz grubunda canlı kalan hayvan sayısına ekleyebiliriz.
- Aynı düşünce yolu ile 20 mg/kg'dan küçük doz gruplarında ölen hayvanlar, eğer 20 mg/kg doz grubunda olsalardı, bu doz ile öleceklerdi. O halde, daha küçük doz gruplarındaki ölüm sayısının toplamını 20 mg/kg doz grubundaki ölüm sayısına ekleyebiliriz.

Bu hesaplama biçimi ile her doz grubundaki populasyon, dolaylı yoldan artırılmakta ve daha güvenilir % ölüm değerlerinin bulunması sağlanmaktadır.

Sonuçta bulunan % ölüm değerleri, doz veya Log doz'a karşı grafiğe geçirildiğinde, sigmoid bir eğri elde edilir. Bu eğriden, LD₅₀ yukarıda belirtildiği gibi saptanır. Unutulmamalıdır ki, yukarıda belirtilen üç yöntemde de, bulunan noktalardan geçen sigmoid eğrinin el ile çizimi ancak belli oranda hata ile mümkündür.

I. Karber-Behrens yöntemi: En sık kullanılan yöntemler arasındadır.

$$LD_{50} = LD_{100} - \frac{\Sigma(ab)}{n} \quad \text{formülü ile bulunur.}$$

İstatistiksel hesaplamalar sonucu çıkartılmış bir formüldür.

Bu formülde;

LD₁₀₀ : Denemede %100 ölüm oluşturan doz,

n : Her gruptaki hayvan sayısı,

a : Birbirini takip eden iki doz arasındaki fark,

b : Birbirini takip eden iki dozdan ileri gelen ölümlerin aritmetik ortalamasıdır.

Örneğimizi bu yöntemle değerlendirebilirsek;

Dozlar	15	20	25	30	35	40
Ölüm	0	2	4	8	9	10
n	10	10	10	10	10	10
a	5	5	5	5	5	5
b	$\frac{0+2}{2}$	$\frac{2+4}{2}$	$\frac{4+8}{2}$	$\frac{8+9}{2}$	$\frac{9+10}{2}$	
ab	5	15	30	42,5	47,5	

$$LD_{50} = 40 - \frac{5 + 15 + 30 + 42,5 + 47,5}{10} \Rightarrow LD_{50} = 40 - 14 = 26 \text{ mg/kg olarak hesaplanır.}$$

V- Probit-Analiz Yöntemi: En geçerli yöntemler arasındadır. Bu yöntemin kullanılabilmesi için, istatistiksel hesaplamalar sonucu düzenlenmiş Probit-Analiz cetveli ile özel olarak hazırlanmış Logaritmik-Probit grafik kağıdına gereksinim vardır. Logaritmik-Probit grafik kağıdının, x-eksenine dozlar, y-eksenine ise %ölümlerin probit cetvelinden bulunan probit karşılıkları işaretlenir.

Sonuçta $y = ax + b$ denklemi ile ifadelendirilebilen bir doğru elde edilir ki, bu çalışma kolaylığı sağlar. Biz pratik çalışmalarımızda öncelikle ilk 4 yöntemi kullanacağız.

B) Deneyin Yapılışı:

LD₅₀ Tayini yapılacak ilaç: Striknin Sülfat

Deney hayvanı: Fare

Veriliş yolu: İntra-peritoneal (ip)

Ön hazırlık:

- Ön denemeler yapılarak yaklaşık bir toksisite ve buna bağlı olarak doz gruplarının saptanması,
- Deney hayvanlarının, deneyin yapılacağı ortama hazırlanması,
- Deney hayvanlarının doz gruplarına ayrılması ve tartılması,
- Deney hayvanı olarak fare kullanıldığında ip yolla verilecek en fazla hacmin 0.5 mL olduğu göz önüne alınarak, doz değişimlerinde hacim artmayacak şekilde, çeşitli konsantrasyonlarda Striknin Sülfat çözeltilerinin serum fizyolojik içinde hazırlanması.

Sonuçların değerlendirilmesi:

İlk 1 saat ve 24 saat sonunda, her doz grubundaki ölüm sayılacak ve kaydedilecektir. İlk 24 saatin sonundaki ölüm sayısına göre LD₅₀ değeri, yukarıda açıklanan yöntemler ayrı ayrı kullanılarak saptanacaktır.