

Obliczanie LD₅₀ na podstawie danych eksperymentalnych

1. Wprowadzenie

W celu określenia toksyczności występującej naturalnie lub stanowiącej zanieczyszczenie środowiska substancji chemicznej, z którą człowiek ma kontakt, konieczne jest przeprowadzenie wielu badań na zwierzętach, uwzględniających wszystkie kierunki jej ewentualnego działania toksycznego. Badania toksykologiczne najczęściej przeprowadza się, wykorzystując zdrowe i dojrzałe płciowo białe myszy, szczury, świnki morskie, koty, psy, lub kury. Podstawowym kryterium wyboru zwierząt jest metabolizm substancji najbardziej podobny do jej metabolizmu u człowieka. Przystępując do badań, należy określić płeć, wiek, masę ciała zwierzęcia oraz ustalić drogę wprowadzania substancji do ustroju. Daną substancję można wprowadzać do organizmu:

- doustnie (p.o. - *per os*),
- inhalacyjnie (inh. - *inhalation*),
- dożylnie (i.v. - *via intervenosa*),
- skórnie (*cutaneous, dermat*),
- podskórnie (s.c. - *via subcutanea*),
- naskórnie (p.c. - *via percutanea*),
- domięśniowo (i.m. - *via intramuscularia*),
- dootrzewnowo (i.p. - *via intraperitonealis*).

Doświadczenia na zwierzętach są długotrwałe i składają się z kilku etapów. Pierwszym z nich jest badanie toksyczności ostrej. Toksyczność ostra jest to zdolność substancji do wywołania efektu toksycznego po jej podaniu (wchłonięciu) do organizmu w dawce jednorazowej lub po jednorazowym narażeniu. Toksyczność ostrą określa się ilościowo, wyznaczając LD₅₀ powodującą śmierć 50% zwierząt użytych w doświadczeniu. Według Organizacji Współpracy Ekonomicznej i Rozwoju (OECD -Organization for Economic Cooperation and Development) wyróżnia się trzy sposoby badań toksyczności ostrej substancji i wyznaczania LD₅₀:

- 1) metodę klasyczną,
- 2) metodę ustalonej dawki (FD -Fixed Dose Procedure),
- 3) metodę klas ostrej toksyczności (ATC -Acute Toxic Class Method).

Podczas badania toksyczności ostrej substancji podanej drogą pokarmową preferuje się stosowanie metody ustalonej dawki lub metody klas ostrej toksyczności.

Metoda klasyczna

Polega na podawaniu grupie zwierząt składającej się z 5-10 samców i takiej samej liczby samic badanej substancji w 3-6 różnych dawkach. Jako graniczny

poziom dawkowania przyjmuje się 2000 mg/kg m.c. W doświadczeniu wykorzystuje się przynajmniej 3 gatunki zwierząt, z których nie więcej niż jedno powinno być gryzoniem i nie więcej niż jedno ptakiem. Substancje podawane są trzema drogami: p.o., i.v., s.c. Podczas eksperymentu systematycznie kontroluje się masę ciała, zauważone zmiany w zachowaniu, wygląd skóry, sierści, oczu. Szczególną uwagę zwraca się na czasy wystąpienia i trwania objawów toksycznych (wymioty, ślinotok, biegunki, senność, drżenie) oraz czas padnięć poszczególnych zwierząt. Eksperyment prowadzi się przez 14 dni. Po zakończeniu doświadczenia uśmierca się także zwierzęta, które przeżyły, w celu wykonania badań makro- i mikroskopowych narządów. Uzyskane dane zestawia się w tabelę, w których umieszcza się liczbę zwierząt na początku doświadczenia, liczbę zwierząt wykazujących objawy zatrucia oraz opis objawów toksycznych, liczbę i czas padnięć, wyniki sekcji. Dane powinny być wystarczające do opisanego zależności dawka - odpowiedź i obliczenia LD₅₀.

Metoda ustalonej dawki (podanie drogą pokarmową)

Badanie metodą ustalonej dawki składa się z dwóch etapów: wstępnego i właściwego. W badaniu wstępnym bada się skutki różnych dawek (5, 50, 500, 2000 mg/kg m.c.) podawanych kolejno pojedynczym zwierzętom, preferowanym gatunkiem jest szczur. Badanie to dostarcza informacji o zależności objawów toksycznych od zastosowanej dawki i pozwala na oszacowanie minimalnej dawki letalnej. Zazwyczaj w badaniu wstępnym nie przewiduje się użycia więcej niż 5 zwierząt.

W badaniu właściwym substancję należy podać drogą pokarmową grupie 5 samców i 5 samic w jednej spośród 4 dawek: 5, 50, 500 i 2000 mg/kg m.c. Dawkę powinno się dobrać tak, aby wywołała objawy widocznej toksyczności, ale nie śmierć zwierzęcia. Po podaniu substancji trzeba dokonywać obserwacji występujących objawów. Obserwacje powinny obejmować zachowanie, zmiany masy ciała, skóry, sierści, oczu, błon śluzowych, jak również układu oddechowego, krążenia i nerwowego. Szczególną uwagę zwraca się na występowanie drgawek, ślinotoku, biegunki, letargu, senności, śpiączki. Jeżeli początkowa dawka wywoła wyraźne objawy toksyczne, ale nie śmierć zwierzęcia, nie ma potrzeby prowadzenia dalszych badań. Jeżeli nie zaobserwowano wyraźnych objawów toksycznych przy danym poziomie dawkowania, przechodzi się do badań z użyciem wyższej dawki substancji, natomiast w razie śmierci zwierząt, substancję bada się, podając w kolejnej, niższej dawce. Taka procedura umożliwia wyznaczenie dawki różnicującej, tj. najwyższej spośród wstępnie ustalonych, którą można podać bez obawy wywołania śmierci zwierząt. W metodzie tej jako parametr końcowy zamiast śmierci zwierząt, przyjmuje się wyniki obserwacji wyraźnych objawów toksycznych. Zarówno u zwierząt, które padną w czasie doświadczenia, jak i u tych, które przeżyją, należy wykonać sekcję. Po zakończeniu badań sporządza się sprawozdanie,

a uzyskane wyniki powinny być przedstawione w formie tabel. Ocena i interpretację wyników podano w tab. 1.

Tabela 1. Ocena i interpretacja wyników w metodzie ustalonej dawki

Dawka [mg/kg m.c.]	Wyniki	Interpretacja
-	mniej niż 100%	substancje , które mogą być bardzo toksyczne
5	100% przeżycia, lecz widoczna toksyczność	substancje, które mogą być toksyczne
-	100% przeżycia, brak widocznej toksyczności	należy ocenić wynik po podaniu 50 mg/kg
-	mniej niż 100% przeżycia	substancje , które mogą być bardzo toksyczne lub toksyczne; wynik należy ocenić po podaniu 5 mg/kg
50	100% przeżycia, lecz widoczna toksyczność	substancje , które mogą być szkodliwe
-	100% przeżycia, brak widocznej toksyczności	należy ocenić wynik po podaniu 50 mg/kg
-	mniej niż 100% przeżycia	substancje, które mogą być bardzo toksyczne lub toksyczne; wynik należy ocenić po podaniu 50 mg/kg
500	100% przeżycia, lecz widoczna toksyczność	należy rozważyć, czy substancja nie stwarza ryzyka wystąpienia istotnych objawów ostrego zatrucia
-	100% przeżycia, brak widocznej toksyczności	wynik należy ocenić po podaniu 2000 mg/kg
2000	mniej niż 100% przeżycia	wynik należy ocenić po podaniu 500 mg/kg
-	100% przeżycia, z widoczna lub niewidoczna toksycznością	substancja nie stwarza ryzyka ostrego zatrucia

Metoda klas ostrej toksyczności (podanie drogą pokarmową)

W metodzie tej grupie zwierząt podaje się dożołądkowo substancję w jednej z ustalonych dawek. Dawkę początkową wybiera się spośród trzech ustalonych poziomów, tj. 25, 200 i 2000 mg/kg m.c. Substancję bada się etapowo, wykorzystując na każdym etapie troje zwierząt jednej płci. Występowanie śmiertelności lub jej brak na jednym etapie decyduje o etapie następnym, tzn. o tym, że:

- nie ma potrzeby dalszego badania,
- następny etap należy przeprowadzić z tą samą dawką, lecz na zwierzętach innej płci,
- następny etap należy przeprowadzić na kolejnym wyższym lub niższym poziomie dawkowania.

Kolejne etapy postępowania (stosowanie dawek wyższych lub niższych) zależą od liczby padłych i przeżywających zwierząt przy pierwszej dawce. Na podstawie wyników badań nie wylicza się dokładnie LD₅₀, a jedynie zakres narażenia, w którym spodziewane są zejścia śmiertelne, ponieważ padnięcia części zwierząt są zasadniczym parametrem ocenianym w tym badaniu. Metoda ostrej toksyczności dostarcza informacji służących zarówno do szacowania zagrożenia, jak i do klasyfikacji, a jej zaletą jest mała liczba zwierząt wykorzystanych w eksperymencie.

Dokładne postępowanie w badaniach toksyczności ostrej jest opisane w Załączniku do Rozporządzenia Ministra Zdrowia z 2003 roku, w którym czytamy "badania na zwierzętach przeprowadza się w sposób humanitarny, zgodnie z przepisami dotyczącymi zwierząt laboratoryjnych oraz zgodnie z międzynarodowymi zaleceniami w tej dziedzinie. W przypadku istnienia kilku równoważnych metod badań wybiera się spośród nich tę, która wymaga użycia najmniejszej liczby zwierząt".

Po zakończeniu badań laboratoryjnych na zwierzętach i tabelarycznym zestawieniu danych oblicza się LD₅₀. W celu wyliczenia LD₅₀ stosuje się metody: Behrensa, Kraebera, Thompsona. Wartość LD₅₀ jest podstawą do klasyfikacji substancji chemicznych (tab. 2).

Tabela 2. Klasyfikacja substancji na podstawie toksyczności ostrej

Metoda klasyczna, metoda klas toksyczności ostrej (dawka p.o. dla szczura)	Metoda ustalonej dawki (dawka różnicująca)	Klasa toksyczności (symbol)*	
[mg/kg m.c.]			
LD ₅₀ < 25	<5	bardzo toksyczna (T+)	I
25 < LD ₅₀ < 200	5	toksyczna (T)	II
200 < LD ₅₀ < 2000	50 lub 500	szkodliwa (Xn)	III
2000 < LD ₅₀	2000**	mało szkodliwa	IV

* stosowany na opakowaniach i kartach charakterystyki substancji

** substancja nie stwarza ryzyka ostrego zatrucia

Drugim etapem jest określenie toksyczności podostrej (test 28-dniowy). W teście tym bada się substancje o spodziewanej małej toksyczności, produkowane w małych ilościach i mające ograniczone przeznaczenie. Badaną substancję podaje się doustnie codziennie w zróżnicowanych dawkach kilku grupom zwierząt, stosując jeden poziom dawkowania na grupę przez 28 dni. Należy testować na przynajmniej 10 zwierzętach (5 samcach i 5 samicach) na każdym etapie dawkowania, zalecanym gatunkiem jest szczur. Powinno się badać przynajmniej 3 grupy narażenia i grupę kontrolną. Przez okres podawania substancji prowadzi się dokładne obserwacje

ogólne zwierząt w celu uchwycenia objawów toksycznych. Na zakończenie badania przeprowadza się oznaczenia hematologiczne, biochemiczne, makroskopowe i histopatologiczne. Zarówno zwierzęta, które padną w czasie doświadczenia, jak i te, które przeżyły, po uśmierceniu poddaje się sekcji. Uzyskane wyniki zbiera się w formie tabeli i poddaje się ocenie statystycznej. Na zakończenie badania sporządza się dokładne sprawozdanie. Specyficznym parametrem kontrolnym w tej metodzie są zmiany neurologiczne. Za pomocą tej metody można wykazać zmiany immunologiczne oraz toksyczność wobec narządów rozrodczych.

Trzecim etapem jest określenie toksyczności podprzewlekłej (test 90-dniowy). Badanie to dostarcza informacji o możliwym zagrożeniu dla zdrowia, mogącym być następstwem powtarzanej, przedłużonej ekspozycji obejmującej okres dojrzewania i wzrostu, aż do okresu dojrzałości. Badaną substancję podaje się doustnie codziennie w stopniowanych dawkach kilku grupom zwierząt przez 90 dni; jedna dawka dla każdej grupy. Należy testować na przynajmniej 20 zwierzętach (10 samcach i 10 samicach) na każdym etapie dawkowania; zalecanym gatunkiem jest szczur. Powinno się stosować przynajmniej 3 grupy narażenia i grupę kontrolną. Podczas trwania eksperymentu prowadzi się ogólne obserwacje zwierząt, kontroluje się ich masę ciała, zmiany w wyglądzie i zachowaniu. Prowadzi się także systematycznie badania krwi, moczu, a także wybranych narządów i tkanek. Na zakończenie badania przeprowadza się oznaczenia hematologiczne, biochemiczne oraz histopatologiczne. Zarówno zwierzęta, które padną w czasie doświadczenia, jak i te, które przeżyły, po uśmierceniu poddaje się sekcji. Otrzymane wyniki powinny być zebrane w formie tabeli i poddane ocenie przy użyciu odpowiedniej metody statystycznej, następnie sporządza się sprawozdanie z badań. Test 90-dniowy powinien wskazać narządy krytyczne i możliwość kumulacji oraz pozwolić na oszacowanie najwyższej dawki lub poziomu ekspozycji, przy którym nie obserwuje się szkodliwych objawów wynikających z podawania substancji testowanej (NOAEL - No Observed Adverse Effect Level). Badanie powinno pozwolić na identyfikację substancji chemicznych mogących wywoływać efekty neurotoksyczne, immunologiczne i reprodukcyjne oraz na uzyskanie informacji na temat wielkości dawek, które powinny być stosowane w następnym etapie badań.

Kolejnym etapem jest określenie toksyczności przewlekłej. Celem tych badań jest poznanie działania toksycznego w wyniku długotrwałej ekspozycji, określenie narządów krytycznych, w których substancja jest kumulowana oraz wstępne określenie ewentualnego działania rakotwórczego badanej substancji. Eksperyment prowadzi się przez przynajmniej 12 miesięcy, a w wypadku łącznego badania toksyczności przewlekłej i działania rakotwórczego 2 lata na 3 grupach zwierząt; równocześnie powinna być stosowana grupa kontrolna. Każdej grupie podaje się inną dawkę substancji badanej. Zakres systematycznych obserwacji i badań jest podobny do badań prowadzonych podczas ustalania toksyczności podprzewlekłej.

Obliczanie LD₅₀ na podstawie danych eksperymentalnych

Metoda Behrensa

Założeniem tej metody jest łączne traktowanie zwierząt ze wszystkich grup, mimo podawania im różnych dawek substancji. Przyjmuje się, że: jeżeli zwierzę przeżywa wyższą dawkę, to przeżyłoby wszystkie niższe dawki; jeżeli zwierzę pada przy niższej dawce, to padałoby przy wszystkich wyższych dawkach. Obliczenia zestawia się tabelarycznie (tab. 1). Następnie oblicza się śmiertelność (%) po podaniu każdej dawki. Śmiertelność wylicza się, dzieląc wyliczoną liczbę zwierząt padłych przy danej dawce i niższych przez całkowitą liczbę zwierząt poddanych działaniu danej dawki i mnoży przez 100. LD₅₀ przedstawia się graficznie.

Tabela 1. Sposób obliczania LD₅₀ metodą Behrensa

Dawka	Liczba zwierząt w doświadczeniu		Wyliczona liczba zwierząt			Śmiertelność [%]
	przeżywających	padłych	przeżywających daną dawkę i wyższe	padłych przy danej dawce i niższych	Całkowita dla danej dawki	

Metoda Kraebera

Założeniem tej metody jest łączne traktowanie zwierząt ze wszystkich grup, mimo podawania im różnych dawek substancji, wśród których powinna być dawka powodująca śmierć wszystkich zwierząt oraz dawka nie działająca. Wyniki obserwacji zestawia się tabelarycznie (tab. 2), a następnie wylicza się LD₅₀ ze wzoru:

$$LD_{50} = D_{\max} - \frac{\sum z \cdot d}{n},$$

gdzie:

D_{max} - dawka, po podaniu której padły wszystkie zwierzęta,

z - połowa sumy padłych zwierząt przy dwóch następujących po sobie dawkach,

d - różnica wartości liczbowych dwóch następujących po sobie dawek,

n - liczba zwierząt w grupie.

Tabela 2. Sposób obliczania LD₅₀ metodą Kraebera

Dawka	Liczba zwierząt przeżywających	Liczba zwierząt padłych	z	d	z·d
Suma					

Metoda Thompsona

W metodzie tej bada się 4 grupy zwierząt, po 5 lub 6 sztuk w każdej i stosuje się 4 poziomy dawki. Zwierzęta z każdej grupy otrzymują wzrastającą w postępie geometrycznym dawkę substancji. Obliczenia wykonuje się według wzoru:

$$\log LD_{50} = \log D_{\min} + (\log M)(f + 1),$$

gdzie:

D_{\min} – najmniejsza stosowana dawka,

M - mnożnik różnicujący poziom dawki (liczba wskazująca, ile razy kolejna dawka jest większa od poprzedniej),

f - współczynnik odczytany z tabel Weila zależny od liczby zwierząt w grupie i śmiertelności po podaniu poszczególnych dawek (tab. 3).

Tabela 3. Współczynniki służące do wyliczenia LD_{50} ze wzoru Thompsona

n=5		n=6			
r	f	r	f	r	f
0,0,4,5	0,70000	0,1,5,4	0,75000	1,3,4,5	0,25000
0,1,3,4	0,87500	0,2,3,5	0,80000	1,4,4,4	0,00000
0,2,4,5	0,30000	0,2,3,4	1,00000	2,0,6,5	0,33333
1,0,4,5	0,62500	0,2,5,6	0,16667	2,2,3,5	0,66667
1,1,5,5	0,12500	1,0,6,6	0,40000	2,3,3,5	0,33333
1,1,3,4	0,83333	1,1,4,4	1,00000	3,1,5,5	0,00000
1,2,3,3	0,75000	1,2,4,4	0,66667	3,2,4,5	0,00000
1,2,3,4	0,50000	1,2,4,6	0,40000	3,3,3,4	0,00000
2,0,4,4	0,75000	1,2,5,4	0,33333	3,2,2,4	1,00000
2,1,4,4	0,25000	1,2,5,6	0,20000	4,2,2,6	0,50000

n - liczba zwierząt w grupie, r - liczba zwierząt padłych po podaniu kolejnych dawek

Przebieg ćwiczenia

Podczas ćwiczenia należy wykonać następujące czynności:

1. Na podstawie danych otrzymanych od prowadzącego zajęcia obliczyć trzema metodami LD_{50} wskazanej substancji. Uzyskane wyniki przedstawić w formie tabelarycznej dla metody Behrensa (tab. 1) i dla metody Kraebersa (tab. 2).
2. Wyniki otrzymane przez poszczególne grupy zestawić tabelarycznie.
3. Wyjaśnić następujące pojęcia: dawka różnicująca, ksenobiotyki, efekt subletalny.
4. Uzupełnij zdanie: Gdy istnieje wyraźna różnica między wartościami LD_{50} dwóch różnych substancji, to ta, która ma wartość, jest uważana za potencjalnie silniejszą truciznę.