

AKUT TOKSİSITE YÖNTEMLERİ

İsmet DÖKMECİ

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji
Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Jondorf ve ark.⁸ çalışmalarında akut toksisiteyi, tek ya da bir kaç dozun 48 saat içinde deney hayvanlarında ve kaza sonucu insanlarda oluşturduğu karşıt etki olarak tanımlamaktadırlar. Akut toksisite saptanmasında başvurulan deneylerin amacı biyolojik sistemlerde kimyasal maddelerin toksik etkilerini belirlemek ve doz-yanıt ilişkisinde karakteristik veriler elde etmektir. Bu veriler yeni drogların kliniğe uygulanmasında olasılık derecesini sağlamaktadır.

Farmakolojide akut toksisite deneyleri ilaç olarak kullanılacak maddelerin değişik etkilerini ortaya çıkarmak için kalitatif ve kantitatif olarak yapılır. Kalitatif deneylerde doza bağımlı olarak etki güçleri ortaya çıkarılır. Bu deneylerle belirli bir biyolojik reaktife karşı drogların relativ aktivitelerini belirlemek için kendi aralarında toksik aktivite karşılaştırması yapma olanağı da sağlanmış olur.

Farmakodinamik deneyler öncelikle kimyasal bir maddenin toksik etkilerinin ve buna sebep olan dozların saptanmasına daha sonra fizyolojik aktivitelerinin bulunmasına yönlendirilmişlerdir. *Desplaces* ve *Jousse*⁹'un da önerdikleri gibi bir drogun tedâvi edici etkisinin yanında toksik etkilerinin de ortaya konulması gereklidir. Ancak bu şekilde bir drogun farmakolojik özellikleri tam olarak saptanabilir. Nasıl ki bir molekül drog tedâvi yönünden etkisizse yüksek dozları da organizma için zararlı olan toksik etkilerin oluşmasına neden olur. En sık kullanılan akut toksisite deneyleri, Minimal Mortal Doz (MMD) ve Letal Doz 50 (LD_{50}) dir.

1 — Minimal Mortal Dose (MMD)

1926 yılında *Knaffl - Lenz*⁹ tarafından kobayda digital toksik aktivitesinin gösterilmesinde tarif edilen MMD, damar içi yolla devamlı yavaş perfüzyonla bir ilâçın hayvanın ölmesine kadar verilmesiyle elde edilir. Tavşan, kedi ve köpek gibi hayvanlarda kolay uygulanabilir ve fizyolojik parametrelerdeki değişiklikler izlenebilir. Ancak çok sayıda hayvana uygulanmasının zorunluluğu yanında damar içi verilmesi nedeniyle drogün inert bir solvent içinde erimesi ve etkisini çabuk göstermesi gereklidir. Hayvana enjekte edilen total sıvı hacmi dolaşım kapasitesini geçmemelidir. Bu nedenle fazla kullanılan bir akut toksisite yöntemi değildir.

2 — Letal Doz 50 (LD_{50})

LD_{50} ya da bazı araştırmacıların da ifade ettiği gibi «Median Letal Doz», bir deney hayvan grubunun yüzde ellisini öldürebilen kimyasal bir maddenin tek bir dozunun istatistikî değerlendirmesidir. LD_{50} saptanmasında değişik matematik kurallar vardır. Deney hayvanlarındaki farklı metabolik tepkiler gözönüne alınırsa elde edilen LD_{50} değeri her zaman kesin bir rakam olmaya bilir. Bu nedenle LD_{50} standart sapması (LD_{50}) olarak adlandırılan olasılık sınırlarının bilinmesi ve bulunan sonucun aynı sayıda deney hayvan grubunda cebirsel sağlaması yapılmalıdır.

LD_{50} saptanmasında değişik yöntemlerden yararlanılır. *Litchfield* ve *Wilcoxon*¹⁰'un grafik yöntemi, *Thompson*¹⁶ ve *Weil*¹⁷'in değişen ortalamalar yöntemi, *Behrens* ve *Karber*²'in çift integral yöntemi ve çok sık kullanılan *Miller* ve *Tainter*¹²'in logaritmik probit yöntemleri başlıcalarıdır. Bu yöntemlerin karşılaştırmalı araştırması *Armitage* ve *Allen*¹ tarafından yapılmıştır.

Akut toksisite değerlendirilmesinde bir çok faktör rol oynamaktadır. Bunları hayvan faktörü, drogların veriliş yolu ve diğer faktörler diye ana bölgümlerde incelemek olasıdır.

Hayvan faktörü :

Deneysel akut toksisite saptanmasında hangi tür hayvan kullanılması gerektiği *Brodie*⁴ ve *Rumke*¹⁵ nin çalışmalarında belirtilmektedir. Bu araştırmacılar akut toksisite deneylerinde en çok fare, sincan, kobay, tavşan ve köpek kullanılmasını önermektedirler. Fare ve sincanlar LD_{50} saptanmasında co-

günlük birlikte kullanılmaktadır. Çünkü bu iki tür kemiricide bazı droglar için farklı farmakolojik yanıtlar elde edilebilmektedir. Aşağıdaki Tablo 1 de fare ve siçanlarda bazı drogların farklı LD₅₀ değerleri görülmektedir.

Tablo 1

D R O G L A R	LD ₅₀ mg/kg (s.c)	
	Fare	Siçan
Asetilkolin	170	250
Alfaprodin	98	23
Amitriptilin	328	1290
Amfetamin	270	160
Anileridin	100	163
Benzatropin	103	353
Deksamfetamin	84	200
Disenhidramin	127	475
Epinefrin	1.47	5
Fluoroasetik asid	16	2.5
Gallamin	17.4	25
Kafein	185	250
Klordiazepoksid (Librium)	530	800
LSD 25	46	76
Mekamilamin	93	145
Methadon	33	12
Neostigmin	0.8	0.37
Fenilefrin	1000	28
Probenesid	1156	611
Prokain	800	2100
Prometazin	750	225
Striknin	0.85	1.2

Erkek ve dişi hayvanların karaciğer metabolizmalarının farklılığı, seks hormonları, barbitüratlar gibi drogların sonuçlarını etkileyebilmektedir. LD₅₀ değerleri hayvanların yaşlarıyla da değişmektedir. Drogları metabolize eden enzimlerin farklı seks hormonları taşıyan hayvanlarda sinir sisteminde değişik etkilere sebep olduğu gösterilmiştir.

Deneylerde kullanılacak hayvanların daha önce drog verilmemiş dişilerden türetilmiş olmasına dikkat etmek gereklidir. Weinberg ve ark.¹⁸ gebelik esnasında ilaç almış analardan doğan yavruların oral akut toksisitelerinin farklı olduğunu bildirmektedirler.

Deneylerde kullanılacak hayvan sayısı, istatistik analiz ve LD_{50} saptanmasında kullanılacak yöntemle bağlı olarak yeterli sayıda olması gerekmektedir. Her doz grubu için genellikle her iki seksten 4-6 hayvan olacak şekilde toplam 8-10 hayvan alınmalıdır. *Diechmann* ve *Leblanc*⁶ total 6 hayvan kullanılacak bir yöntem tarif etmişlerdir.

Hayvanlarda yapılan farmakolojik deneylerin amaçlarını ve yararlarını aşağıda olduğu gibi özetleyebiliriz :

- a. Yeni bir drogun toksisite ve fizyolojik aktivitesini ortaya çıkarmak.
- b. Drogların etki mekanizmalarının etüd edilmesi için çok sayıda hayvan deneyi gerekmektedir. Böylece canlı organizmalardaki fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerin belirlenmesi.
- c. İlaç metabolizması ve farmakokinetik incelemeler yapılabılır.
- d. Yeterli ölçüde fizik ya da kimyasal dozajı yapılamayan digital ve insülin gibi preparatların aktivite kontrollerinin yapılmasında hayvan deneyleri önemlidir.

Hayvanların tür farkı ve insanlara göre bazı biyolojik değişiklikler göstermesi nedeniyle bunlardan elde edilecek sonuçları doğrudan kliniğe uygulamak olanaksızdır. Laboratuarlarda elde edilen bilgiler klinik farmakoloji için ön bilgi ve dayanak olmaktadır. Buna karşılık hiç bir hayvan deneyi yapılmadan bir drogun klinik deneylerinin yapılmayıcağının da bilinmesi gereklidir. Toksisite tayinlerinde elde edilen sonuçların kliniğe uygulanmasıyla ilgili yöntem ve sonuçlar *Hagan*⁷ ve *Litchfield*¹⁰'in çalışmalarıyla belirtilmiştir.

Aşağıdaki tablolarda (2 ve 3) bazı droglara ve farmakolojik parametrelerce çeşitli hayvan türlerinin ve insanın gösterdiği farklı yanıtlar görülmektedir.

Tablo 2. İnsan ve hayvanlarda bazı drogların yarılanma süresi.

H A Y V A N	Biyolojik Yarı Ömür (dakika)		
	Hekzobarbital	Antipirin	Anilin
Fare	19	11	35
Şıcan	140	141	71
Kobay	—	110	45
Tavşan	60	63	35
Köpek	260	107	167
İnsan	360	600	—

Tablo 3. Hekzobarbitalın değişik hayvanlardaki farklı etkileri.

H A Y V A N	Uyku Süresi (dakika)	Biyolojik Yarı Ömür (dakika)	Enzimatik Aktivite ($\mu\text{g/g/sn}$)
Fare	12	19	598
Sıçan	95	140	134
Tavşan	49	60	294
Köpek	315	260	36

Quinn ve Brodie¹⁴'nin çalışmalarına göre hayvanlarda hekzobarbitalın sebep olduğu uyku süresi biyolojik yarı ömrle doğru orantılı fakat bu maddeinin oksidatif parçalanmasından sorumlu olan karaciğer mikrozomal enzimlerinin aktivitesiyle ters orantılı olduğu görülmektedir.

İlaçların hayvan türlerinde farklı bir şekilde metabolize edilmelerine daha bir çok örnekler gösterilebilir. Bilindiği gibi köpekler Arilamin asetilaz enziminden yoksundur. İnsanlarda asetilasyonla parçalanan maddeler köpeklerde parçalanamadığı için yukarıda Hekzobarbital örneğinde olduğu gibi daha aktiftir. Tromeksan (Etil biskumoasetat)'ın insan ve tavşanlardaki biyolojik yarı ömrü aynıdır; fakat yararlandıkları metabolik yol farklıdır. İnsanlarda aromatik bir çekirdeğin hidroksilasyonu, tavşanlarda ise ester hidroliziyle gerçekleşmektedir¹¹.

Hayvan deneylerinde yukarıda saydığımız avantajların yanında insanlardaki bazı etkileri gözlememiz olanaksızdır. Bu gibi belirtiler ancak klinik farmakoloji deneyleriyle ortaya çıkarılabilir. Deney hayvanlarında gözlenmesi olanaksız olan bu durumlar şunlardır:

- a. Rahatsız edici bazı duygular (mide yanması, bulantı, baş ağrısı, ağrılı miksyon),
- b. Hematopoetik fonksiyonda bazı bozukluklar (kloramfenikol, pramidon gibi droglardan ileri gelen agranülositoz).
- c. Allerjik reaksiyonlar.

Drogların Veriliş Yolu :

LD_{50} değeri saptanacak kimyasal maddelerin genellikle insanların o maddeyi kullanırken yeğlediği yoldan verilmesiyle daha stabil sonuçların alınması sağlanır. Oral yolla kimyasal madde verilmesinde gavaj yöntemi

uygulanır. Bu şekilde ilâçın tümünün yutulması sağlanır. *Bein*³, *Worden* ve *Harpek*²⁰ bazı gıdalarla birlikte kimyasal madde verilmesinin deney hayvanlarında toksisiteyi artırdığını göstermişlerdir.

Enjeksiyon yoluyla kimyasal madde verilmesinde en çok baş vurulan yolların deri altı ve periton için olduğu bilinmektedir. Damar içi yavaş perfüzyon daha çok LD_{50} değeri ile birlikte hayvanlarda değişik farmakolojik parametrelerin etüd edildiği durumlarda kullanılmaktadır.

İlâçların veriliş yollarına göre toksisitelerinde önemli değişiklikler olabilmektedir. Örneğin Edrofonyum'un farelerde değişik yollardan verilmesiyle elde edilen LD_{50} değerleri *Barnes* ve *Eltherington*³'a göre aşağıda olduğu gibidir :

p.o.	600 mg/kg
s.c.	130 mg/kg
i.p.	37 mg/kg
i.v.	9 mg/kg

Göründüğü gibi i.v. yolla LD_{50} değeri minimal düzeydedir. Edrofonyum için i.v. yol p.o. yola oranla yaklaşık 66 defa daha toksiktir. Damar içi yolla ilaçların rezorbsiyonu çok daha hızlı ve tamdır. Karaciğerin detoksikasyon yapıcı etkisi devre dışı kalmıştır. Damar içi ilaç verilişlerinde enjekte edilen solüsyonun veriliş hızı farelerde yaklaşık 0,2 ml/10 sn ve hacmi 10 ml/kg vücut ağırlığı olarak hesaplanması gereklidir.

Diger faktörler :

Droglar genellikle solüsyon şeklinde hayvanlara verilmektedirler. Bu şekilde verilişlerde rezorbsiyon hızlı ve düzenlidir. Ancak toz ve süspansiyon şeklinde drog verildiğinde rezorbsiyon düzenli olmadığı için farmakolojik etkileri değiştirmektedir. Drogun metabolize edilmesiyle temas yüzeyi oldukça arttırdıdan rezorbsiyonu hızlı olur ve etkisi de artar.

Solventin bileşimi de LD_{50} değerini değiştirebilmektedir. Alkol, gliserin v.b. gibi solventlerin kendi farmakolojik etkileri yanında rezorbsiyon hızını da değiştirdiklerinden etkili olabilmektedirler. Sulu solüsyonlarda rezorbsiyon hızlı, yağlı ve süspansiyon şeklindeki solüsyonlarda yavaştır.

Temperatür, ortamın higroskapisitesi, hayvanlara verilen gıda rejimi, mevsimler, deney yeri, hayvan barınakları gibi faktörler de ilaçların toksitesini değiştirmektedir. Örneğin aynı kafesten alınmış 10 faredeki Amfetaminin LD_{50} değeri tek başına kafeste tutulan farelerdekine oranla 10 defa daha az olduğu *Mercier*¹¹ tarafından gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- 1 — ARMITAGE, P. and ALLEN, I. : *Methods of estimating the LD₅₀ in quantal response data.* J.Hyg. (London) **48** : 298, 1950.
- 2 — BEHRENS, N. und KARBER, C. : *Wie sind Reihenversuche für biologische Auswertungen am zweckmässigsten Anzuordnen.* Arch. exp. Path. Pharmak., **177**: 379, 1935.
- 3 — BEIN, H.J.: *Rational and irrational numbers in toxicology.* Proc. Euro. Soc. Drug. Toxicity **2**: 15, 1963.
- 4 — BRODIE, B.B. : *The difficulties of transposing experimental results obtained in animals to man.* Actual. Pharmacol., **17** : 1, 1964.
- 5 — DESPLACES, A. and JOUSSE, S.: *Differentiation entre toxicité spécifique et toxicité non spécifique de différents corps hypoglycémiants.* Ann. Pharmac. Frç. **23**: 6, 411, 1965.
- 6 — DIECHMANN, W.B. and LEBLANC, T.J. : *Determination of the approximate lethal dose with about six animals.* J. Ind. Hyg. Toxicol., **25** : 415, 1943.
- 7 — HAGAN, J.M. : *Acute toxicity.* In : *Appraisal of the safety of chemical in food, drug and cosmetics.* Assoc. Food and Drug Officials of USA, p. 17, 1959.
- 8 — JONDORF, F.R., MAICKEL, R.P. and BRODIE, B.B. : *Instability of newborn mice and guinea pigs to metabolize drugs.* Biochem. Pharmacol., **1**: 312, 1959.
- 9 — KNAFFL-LENZ, E.: *The physiological assay of preparations of Digitalis.* J.Pharmacol. exp. Ther., **29** : 407, 1926.
- 10 — LITCHFIELD, J.T. and WILCOXON, F.A. : *A simplified method of evaluating dose-effect experiments.* J. Pharmacol. exp. Ther., **95** : 99, 1947.
- 11 — MERCIER, M. : *L'évaluation de la toxicité de nouvelles substances medicamenteuses.* J. Pharmac. Belge, **21** : 5-6, 299, 1966.
- 12 — MILLER, L. and TAINTER, M.L. : *Estimation of the LD₅₀ and its error by means of logarithmic-probit graph paper.* Proc. soc. exp. Biol. Med., **57**: 261, 1944.
- 13 — PLUME, C. : *L'étude pharmacologique des toxicites.* Ann. Med. Vet., **114** : 481, 1970.
- 14 — QUINN, G.P., AXELROOD, J. and BRODIE, B.B.: Biochem. Pharmacol., **1**: 152, 1958. In : MERCIER, M. *L'évaluation de la toxicité de nouvelles substances medicamenteuses.* J. Pharmac. Belge, **21**: 5-6, 299, 1966.
- 15 — RUMKE, C.L. and BOUT, J.: *The influence of previously introduced drugs on hexobarbital narcosis.* Arch. exp. Path. Pharmacol., **240**: 223, 1960.
- 16 — THOMPSON, W. : *Use of moving averages and interpolation to estimate median effective dose.* Bac. Rev., **11** : 115, 1947.
- 17 — WEIL, C.S. : *Relationship between short and long term feeding studies in designing an effective toxicity test.* Agric. Food. Chem. **486**, 1952.
- 18 — WEINBERG, M.S., GOLDHAMEN, R.E. and CARSON, S. : *Acute oral toxicity of various drug in newborn rats after treatment of the dam during gestation.* Toxicol. appl. Pharmacol., **9**: 234, 1966.
- 19 — WEPIERRE, J. : *Abrege de pharmacodynamie generale,* Masson Ed. Paris, 1977.
- 20— WORDEN, A.N. and HARPEK, K.H. : *Oral toxicity as influenced by method of administration,* Proc. Eur. soc. Studied Drug Toxicity, **2**: 15, 1963.