

## AKUT TOKSİSİTE YÖNTEMLERİ

İsmet DÖKMECİ

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji  
Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

*Jondorf ve ark.*<sup>8</sup> 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 ilâç 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 relatif 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*<sup>5</sup> un da önerdikleri gibi bir drogun tedâvi edici etkisinin yanında toksik etkilerinin de ortaya konulması gerekir. 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<sub>50</sub>) dir.

## 1 — Minimal Mortal Doz (MMD)

1926 yılında *Knaffl - Lenz*<sup>9</sup> tarafından kobayda digital toksik aktivitesinin gösterilmesinde tarif edilen MMD, damar içi yolla devamlı yavaş perfüzyonla bir ilâcın 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 drogun inert bir solvent içinde erimesi ve etkisini çabuk göstermesi gerekir. Hayvana enjekte edilen total sıvı hacmi dolaşım kapasitesini geçmemelidir. Bu nedenle fazla kullanılan bir akut toksisite yöntemi değildir.

## 2 — Letal Doz 50 (LD<sub>50</sub>)

LD<sub>50</sub> 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<sub>50</sub> saptanmasında değişik matematik kurallar vardır. Deney hayvanlarındaki farklı metabolik tepkiler gözönüne alınırsa elde edilen LD<sub>50</sub> değeri her zaman kesin bir rakam olmayabilir. Bu nedenle LD<sub>50</sub> standart sapması (LD<sub>50</sub>) olarak adlandırılan olasılık sınırlarının bilinmesi ve bulunan sonucun aynı sayıda deney hayvan grubunda cebirsel sağlaması yapılmalıdır.

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

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

### Hayvan faktörü :

Deneyisel akut toksisite saptanmasında hangi tür hayvan kullanılması gerektiği *Brodie*<sup>4</sup> ve *Rumke*<sup>15</sup> nin çalışmalarında belirtilmektedir. Bu araştırmacılar akut toksisite deneylerinde en çok fare, sıçan, kobay, tavşan ve köpek kullanılmasını önermektedirler. Fare ve sıçanlar LD<sub>50</sub> saptanmasında ço-

ğunlukla birlikte kullanılmaktadır. Çünkü bu iki tür kemiricide bazı droglar için farklı farmakolojik yanıtlar elde edilebilmektedir. Aşağıdaki Tablo 1 de fare ve sıçanlarda bazı drogların farklı LD<sub>50</sub> değerleri görülmektedir.

Tablo 1

| DROGLAR                   | LD <sub>50</sub> mg/kg (s.c) |       |
|---------------------------|------------------------------|-------|
|                           | Fare                         | Sıçan |
| Asetilkolin               | 170                          | 250   |
| Alfaprodin                | 98                           | 23    |
| Amitriptilin              | 328                          | 1290  |
| Amfetamin                 | 270                          | 160   |
| Anileridin                | 100                          | 163   |
| Benzatropin               | 103                          | 353   |
| Deksamfetamin             | 84                           | 200   |
| Difenhidramin             | 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. LD<sub>50</sub> 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 gerekir. *Weinberg* ve ark.<sup>18</sup> gebelik esnasında ilâç almış analardan doğan yavruların oral akut toksisitelerinin farklı olduğunu bildirmektedirler.

Deneylerde kullanılacak hayvan sayısı, istatistikî analiz ve LD<sub>50</sub> 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*<sup>6</sup> 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. Droglara etki mekanizmalarının etüd edilmesi için çok sayıda hayvan deneyi gerekmektedir. Böylece canlı organizmalardaki fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerin belirlenmesi.
- c. İlâç metabolizması ve farmakokinetik incelemeler yapılabilir.
- 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. Laboratuvarlarda elde edilen bilgiler klinik farmakoloji için ön bilgi ve dayanak olmaktadır. Buna karşılık hiç bir hayvan deneyi yapılmadan bir drogun klinik deneylerinin yapılamayacağı da bilinmesi gerekir. Toksisite tayinlerinde elde edilen sonuçların kliniğe uygulanmasıyla ilgili yöntem ve sonuçlar *Hagan*<sup>7</sup> ve *Litchfield*<sup>10</sup>'in çalışmalarıyla belirtilmiştir.

Aşağıdaki tablolarda (2 ve 3) bazı droglara ve farmakolojik parametrelere 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     |
| Sıçan       | 140                          | 141       | 71     |
| Kobay       | —                            | 110       | 45     |
| Tavşan      | 60                           | 63        | 35     |
| Köpek       | 260                          | 107       | 167    |
| İnsan       | 360                          | 600       | —      |

Tablo 3. Hekzobarbitalin değişik hayvanlardaki farklı etkileri.

| H A Y V A N | Uyku Süresi<br>(dakika) | Biyolojik Yarı<br>Ömür (dakika) | Enzimatik Aktivite<br>(µg/g/sn) |
|-------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Fare        | 12                      | 19                              | 598                             |
| Sıçan       | 95                      | 140                             | 134                             |
| Tavşan      | 49                      | 60                              | 294                             |
| Köpek       | 315                     | 260                             | 36                              |

*Quinn ve Brodie*<sup>14</sup>'nin çalışmalarına göre hayvanlarda hekzobarbitalin sebep olduğu uyku süresi biyolojik yarı ömürle doğru orantılı fakat bu maddenin 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 hidrosilasyonu, tavşanlarda ise ester hidroliziyle gerçekleşmektedir<sup>11</sup>.

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:

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

#### *Drogların Veriliş Yolu :*

LD<sub>50</sub> 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 ilâcın tümünün yutulması sağlanır. *Bein*<sup>3</sup>, *Worden* ve *Harpek*<sup>20</sup> 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<sub>50</sub> değeri ile birlikte hayvanlarda değişik farmakolojik parametrelerin etüd edildiği durumlarda kullanılmaktadır.

İlâçların verilmiş yollarına göre toksisitelerinde önemli değişiklikler olabilmektedir. Örneğin Edrofonyum'un farelerde değişik yollardan verilmesiyle elde edilen LD<sub>50</sub> değerleri *Barnes* ve *Eltherington*<sup>3</sup>'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   |

Görüldüğü gibi i.v. yolla LD<sub>50</sub> değeri minimal düzeydedir. Edrofonyum için i.v. yol p.o. yola oranla yaklaşık 66 defa daha toksiktir. Damar içi yolla ilâçların rezorbsiyonu çok daha hızlı ve tamdır. Karaciğerin detoksikasyon yapıcı etkisi devre dışı kalmıştır. Damar içi ilâç verilmişlerinde enjekte edilen solüsyonun verilmiş hızı farelerde yaklaşık 0,2 ml/10 sn ve hacmi 10 ml/kg vücut ağırlığı olarak hesaplanması gerekir.

#### *Diğer faktörler :*

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

Solventin bileşimi de LD<sub>50</sub> 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 ilâçların toksisitesini değiştirmektedir. Örneğin aynı kafesten alınmış 10 faredeki Amfetaminin LD<sub>50</sub> değeri tek başına kafeste tutulan farelerdekine oranla 10 defa daha az olduğu *Mercier*<sup>11</sup> tarafından gösterilmiştir.

## KAYNAKLAR

- 1 — ARMITAGE, P. and ALLEN, I. : *Methods of estimating the LD<sub>50</sub> 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. Pharmacol., **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.: *Differenciation entre toxicite specifique et toxicite non specifique de differents corps hypoglycemiants.* 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'evaluation de la toxicite de nouvelles substances medicamenteuses.* J. Pharmac. Belge, **21** : 5-6, 299, 1966.
- 12 — MILLER, L. and TAINTER, M.L. : *Estimation of the LD<sub>50</sub> 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'evaluation de la toxicite 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.