

Ćwiczenie 1. Obliczanie LD₅₀ wybranych substancji toksycznych

1. Wiadomości wprowadzające

Do oceny bezpieczeństwa lub szkodliwości substancji chemicznej występującej naturalnie, celowo dodawanej lub stanowiącej zanieczyszczenie żywności, konieczne jest przeprowadzenie wielu badań na zwierzętach, uwzględniających wszystkie kierunki jej ewentualnego działania toksycznego. Oceny nasilenia oddziaływania związku toksycznego na organizm zwierzęcy dokonuje się na podstawie dającego się zmierzyć efektu końcowego, który w zależności od dawki może być różny.

Dawka jest to ilość substancji chemicznej, która podana, pobrana lub wchłonięta do organizmu w określony sposób – powoduje efekty biologiczne. Wielkość dawki określa się w jednostkach wagowych w przeliczeniu na masę i na dobę, np. $\mu\text{g/kg m.c./24 h}$; mg/kg m.c./24 h .

Badania toksykologiczne na zwierzętach laboratoryjnych są wieloetapowe i długotrwałe. Zwierzętom podzielonym na grupy podaje się różne dawki substancji chemicznej, przy jednoczesnym prowadzeniu grupy kontrolnej, przebywającej w tych samych warunkach, karmionych taką samą paszą, lecz bez narażenia na substancję badaną.

Najłatwiejszym do zaobserwowania punktem końcowym w doświadczeniach biologicznych jest śmierć zwierząt. Taki efekt jest skutkiem podania **dawki śmiertelnej (dosis letalis, DL)**. Jest to ilość substancji chemicznej powodująca śmierć organizmu po jednorazowym podaniu. W doświadczeniach biologicznych, oceniających *toksycność ostrą* substancji chemicznych, najczęściej posługuje się **dawką śmiertelną medialną (median lethal dose, LD₅₀)**. Jest to statystycznie obliczona na podstawie wyników badań na zwierzętach doświadczalnych ilość substancji chemicznej, która podana w jednorazowej dawce, w określony sposób (dożołądkowo, dermalnie, przez układ oddechowy), powoduje śmierć 50% zwierząt. W badaniach toksykologicznych stosuje się także **dawkę graniczną (dosis minima DM)**, która określa najmniejszą ilość substancji wywołującej pierwsze dostrzegalne skutki biologiczne.

W krajach Unii Europejskiej obowiązuje klasyfikacja związków chemicznych w zależności od ustalonej dla nich wartości LD₅₀ (tab. 1).

Tabela 1. Klasyfikacja substancji chemicznych pod względem ich toksyczności według kryteriów podanych w Rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 5 marca 2009 r. [Dz.U. 2009 Nr 43 poz. 353]

Klasa toksyczności	Symbol	Zakres LD ₅₀ per os dla szczurów (mg/kg m.c)
Bardzo toksyczne	T+	<25
Toksyczne	T	25-200
Szkodliwe	Xn	200-2000
Niesklasyfikowane	-	>2000

2. Część praktyczna

Obliczanie dawki LD₅₀ wybranych substancji toksycznych z wykorzystaniem metod Kräbera, Behrensa i Thompsona

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z metodami wyliczania tej dawki na podstawie metody Behrensa, Kräbera oraz Thompsona. Na podstawie danych eksperymentalnych (tab. 2) należy obliczyć LD₅₀ dla wybranej substancji.

Tabela 2. Dane do obliczeń LD₅₀

Lp.	Substancja	Gatunek	Płeć	Liczba zwierząt w grupie	Dawka [mg/kg m.c] (liczba zwierząt przeżywających)	
					metoda Behrensa i metoda Kräbera	metoda Thompsona
1	Chlorek fenylortęciowy	szczur	m., ż.	6	13,6(6), 15,0(5), 16,5(3), 18,2(3), 20,0(3), 22,0 (2), 24,2(0)	16,5(3), 18,2(3), 20,0(3), 22,0(2)
2	Faloidyna	mysz	m., ż.	6	1,00(6), 1,20(5), 1,44(4), 1,73(4), 2,07(4), 2,49(3), 2,99(1)	1,73(4), 2,07(4), 2,49(3), 2,99(1)
3	Patulina	szczur	m., ż.	5	30,0(4), 37,5(4), 46,9(3), 58,6(2), 73,2(2), 91,6(0)	37,5(4), 46,9(3), 58,6(2), 73,2(2)
4	Chlorfenwinfos	królik	m.	5	180(5), 207(4), 238(3), 274(2), 315(1), 362(0)	207(4), 238(3), 274(2), 315(1)
5	Chlorfenwinfos	królik	ż.	5	300(5), 345(4), 397(4), 456(2), 525(1), 603(1), 693(0)	345(4), 397(4), 456(2), 525(1)
6	Fosfamidon	szczur	ż.	6	3,00(6), 3,21(5), 3,43(4), 3,68(2), 3,93(2), 4,20(1), 4,50(0)	3,21(5), 3,43(4), 3,6 8(2), 3,93(2)
7	Fosfamidon	szczur	m.	6	11,0(6), 11,8(5), 12,6(4), 13,5(3), 14,4(3), 15,4(1), 16,5(0)	12,6(4), 13,5(3), 14,4(3), 15,4(1)
8	Amygdalina	mysz	m., ż.	6	200(6), 230(5), 264,5(5), 304,2(2), 350(2), 402(2)	264,5(5), 304,2(2), 350(2), 402(2)
9	Tlenek kadmu	szczur	m., ż.	6	153(6), 176(5), 202(5), 232 (2), 267 (2), 307(0)	176(5), 202(5), 232(2), 267(2)
10	BHT	szczur	m ^a	6	900(6), 1125(6), 1406(4), 1738(3), 2197(1), 2796(2), 3439(1)	1125(6), 1406(4), 1738(3), 2197(1),
11	BHT	szczur	m ^b	6	400(5), 500(5), 625(4), 781(2), 976(0), 1220(1)	500(5), 625(4), 781 (2), 976(0)
12	Difenyl	szczur	m	6	1666(6), 2000(5), 2400(4), 2880(5) 3456(3), 4147(2), 4976(1)	2880(5), 3456(3), 4147(2), 4976(1)
13	Difenyl	królik	m	6	1666(5), 2000(4), 2400(1), 2880(2) 3456(2), 4147(0), 4976(0)	1666(5), 2000(4), 2400(1), 2880(2)

^a Dieta zawierała 24% białka ^b Dieta zawierała 4% białka

A. Obliczanie dawki LD₅₀ 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.

Następnie oblicza się procentową śmiertelność dla każdej z dawek (liczba zwierząt padłych podzielona przez liczbę zwierząt wyliczona dla danej dawki x 100). LD₅₀ można następnie wyznaczyć graficznie. Przykładowe obliczenia podano w tabeli 3.

Tabela 3. Przykład obliczeń dawki LD₅₀ metodą Behrensa

Dawka (mg/kg)	Liczba zwierząt w doświadczeniu		Wyliczona liczba zwierząt			Śmiertelność (%)
	przeżywających	padłych	Przeżywających danych dawkę i wyższą	Padłych przy danej dawce i niższych	Całkowita dla danej dawki	
75	6	0	22	0	22	0
83	5	1	16	1	17	5,9
91	3	3	11	4	15	26,7
100*	2	4	8	8	16	50,0
110	4	2	6	10	16	62,5
121	2	4	2	14	16	87,5
133	0	6	0	20	20	100

* w podanym przykładzie dawka LD₅₀ wynosi 100 mg/kg masy ciała (śmiertelność 50%)

B. Obliczanie LD₅₀ metodą Kräbera

Aby wykonać obliczenie LD₅₀ tą metodą konieczne jest zastosowanie wielu dawek, wśród których powinna być dawka powodująca śmierć wszystkich zwierząt oraz dawka nie działająca. Metoda ta pozwala na otrzymanie dostatecznie dokładnego wyniku przy silnym rozproszeniu poszczególnych wartości. LD₅₀ wylicza się z następującego wzoru:

$$LD_{50} = D_{\max} - (\sum z \times d) / n$$

D_{max} - dawka, przy której padły wszystkie zwierzęta,

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

d - różnica wartości liczbowych dwóch po sobie następujących dawek,

n - liczba zwierząt w grupie.

Przykładowe obliczenie podano w tabeli 4.

Tabela 4. Sposób obliczania LD₅₀ metodą Kräbera (w każdej grupie było 6 zwierząt)^a

Dawka (mg/kg)	Liczba zwierząt padłych	z	d	z x d
75	0	-	-	-
83	1	0,5	8	4
91	3	2	8	16
100*	4	3,5	9	31,5
110	2	3	10	30
121	4	3	11	33
133	6	5	12	11
Suma				174,5

^a LD₅₀ = 133 - (174,5 : 6) = 104 mg/kg m.c.

C. Obliczanie LD₅₀ metodą Thompsona przy użyciu tabel Weila.

Po wykonaniu badań wstępnych, tzn. po ustaleniu przybliżonego poziomu dawkowania i określenia LD₀ i LD₁₀₀, ustala się mnożnik postępu geometrycznego stężeń. Zwierzęta dzieli się na 4

grupy, z których każda otrzymuje 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 dawkowania (liczba wskazująca, ile razy kolejna dawka jest większa od poprzedniej),

f -współczynnik odczytywany z tabel Weila zależny od liczby zwierząt w grupie i śmiertelności dla poszczególnych dawek (tab. 5)

Tabela 5. Tabele Weila (fragment); współczynniki f służące do wyliczania LD_{50} ze wzoru Thompsona dla 4 dawek substancji (n -liczba zwierząt w grupie, r -liczba zwierząt padłych przy kolejnych dawkach)

$n=5$		$n=6$			
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	3,4,2,4	1,00000
2,1,4,4	0,25000	1,2,5,6	0,20000	4,2,2,6	0,50000

Sposób obliczeń dla wyżej podanego przykładu z uwzględnieniem dawek od 83 do 110 mg/kg m.c.:

$$\log LD_{50} = \log 83 + (\log 1,1) \cdot (1,00000 + 1)$$

$$\log LD_{50} = 2,0019$$

$$LD_{50} = 100,43 \text{ mg/kg m.c.}$$

Zakres wiadomości wymaganych do kolokwium wprowadzającego:

1. Definicja dawki śmiertelnej LD (dosis lethalis), dawki śmiertelnej medialnej LD_{50} (median lethal dose), dawki granicznej DM (dosis minima),
2. Klasyfikacja substancji chemicznych pod względem ich toksyczności

Opracowano na podstawie:

1. Orzeł D., Biernat J. (red). Wybrane zagadnienia z toksykologii żywności. Wyd. UP, Wrocław 2012
2. Brzozowska A. Toksykologia żywności. Wyd. SGGW, Warszawa 2010