# Практична робота № 5

**Тема: ОЦІНКА БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ТОКСИКАНТІВ**

*Мета:* вивчити особливості визначення середньої дози токсичного ефекту графічним та аналітичним способами, провести оцінку токсикологічної активності шкідливих речовин шляхом альтернативної форми обліку реакцій.

Робота розрахована на два заняття.

# Заняття 1. Визначення середньої дози токсичного ефекту за методом Беренса

При випробуванні інсектицидів, лікарських, радіоактивних та інших біологічно активних речовин виявляється, що особини однорідної групи реагують на однакову дозу по-різному (тобто має місце індивідуальна мінливість), а різні дози можуть викликати однаковий ефект у цілої групи індивідів. Це означає, що про силу дії на організм біологічно активних речовин

можна судити лише по середньому результату.

Дози сильнодіючих речовин випробовують на однорідних групах (миші, щури та ін.) по 6-10 особин. На кожній групі вивчають одну дозу. Зазвичай застосовують 5-9 доз у зростаючому за силою дії порядку. Досвід проводять одночасно на всіх групах особин, при цьому враховують число особин, у яких виявився ефект від дії доз, і число тих, які видимим ефектом не характеризуються. За середнім результатом судять про виявлення ефекту дії доз у 50% піддослідних індивідів.

Визначити дозу, що викликала видимий ефект або летальний результат у 50% піддослідних індивідів, можна різними способами – графічно й аналітично.

Залежність між дозою та ефектом дії токсиканта графічно виражається у вигляді *S*-подібної кривої (кумуляти), де по осі абсцис відкладають дози речовини, а по осі ординат – ефект впливу цих доз на піддослідних тварин. Центральна точка кумуляти збігається з центром розподілу. Опускаючи з цієї точки перпендикуляри на осі координат, можна визначити середню дозу ефекту.

З метою вирівнювання експериментальної характеристичної кривої Беренс запропонував прийом так званого «накопичення частот»: до числа тварин, загиблих від кожної з випробуваних доз, додають кількість тварин, загиблих від усіх менших випробуваних доз; а до числа тварин, які вижили від кожної з випробуваних доз, додають кількість тварин, що вижили від усіх більш високих випробуваних доз.

На підставі обчислених «накопичених частот» підраховують смертність у відсотках від кожної з випробуваних доз і будують характеристичну криву шляхом відкладення по осі абсцис випробувані дози, а по осі ординат – відсотки смертельних результатів. Величина *DL50* може бути знайдена безпосередньо з графіка: для цього з точки характеристичної кривої, яка відповідає 50% смертельних результатів, опускають перпендикуляр на вісь абсцис, точка перетину якого і буде відповідати величині *DL50*.

Близьку за значенням величину *DL50* можна отримати і без побудови графіка. Оскільки в середній частині характеристичної кривої невеликий її відрізок мало відрізняється від прямої лінії, то величину *DL50* можна обчислити шляхом прямолінійної інтерполяції між найближчими до *DL50* меншою і більшою дозами.

Якщо інтервал або різниця між дозами, що випробовуються, дорівнює d, а величина *DL50* знаходиться між дозами А і В, з яких доза А викликала а% смертельних результатів (а <50) і доза В викликала b% смертельних результатів (b> 50), то

*DL50*

*= А +* −𝑎

𝑏−𝑎

(10)

Слід зазначити, що в процесі «накопичення частот» штучно перебільшується «вага» крайніх варіантів індивідуальної чутливості тварин до досліджуваної речовини, внаслідок чого відсоток смертельних результатів від малих його доз виявляється заниженим, а від високих доз – завищеним. Таким

чином, метод «накопичення частот» веде до спотворення форми характеристичної кривої. Очевидно, однак, що середня ділянка кривої при цьому не спотворюється і, отже, в значення *DL50* не вноситься систематична помилка. Зрозуміло, що за цієї причини метод Беренса не придатний для знаходження доз, що викликають інші частоти смертельних результатів (наприклад, *DL10* і *DL90*).

Наближене значення стандартної помилки *DL50* можна розрахувати за емпіричною формулою, запропонованою Гедамом:

*SDL50*

*=* √𝑘·𝑒·𝑑

𝑛

(11)

де *d* – інтервал між дозами, що випробовуються; *n* – кількість тварин у кожній групі; *k* – постійний множник (при користуванні методом Беренса дорівнює 0,66, а при користуванні методом Кербера – 0,564); *e* – стандартне відхилення, що визначається з графіка характеристичної кривої як половина різниці між величинами *DL84* і *DL16*.

Середня величина ефекту вважається достовірною у випадку перевищення стандартної помилки більше, ніж у 3 рази.

*Приклад визначення середньої дози токсичного ефекту за методом Беренса*

Практичне використання методу Беренса можна ілюструвати на прикладі обробки експериментального матеріалу з вивчення токсичності тубазіда (табл. 5).

Таблиця 5 Експериментальні дані з вивчення токсичності тубазіда за методом Беренса

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Дози токсиканта,мг/кг | Фактичний результат | «Накопичені частоти» | % загибелі тварин |
| загиблітварини | ті, що вижили | загиблітварини | ті, щовижили |
| 150 | 0 | 8 | 0 | 22 | 0 |
| 160 | 1 | 7 | 1 | 14 | 6,7 |
| 170 | 4 | 4 | 5 | 7 | 41,7 |
| 180 | 6 | 2 | 11 | 3 | 78,6 |
| 190 | 7 | 1 | 18 | 1 | 94,7 |
| 200 | 8 | 0 | 26 | 0 | 100,0 |

«Накопичення частот» проводиться наступним чином.

Для дози 150 мг/кг, від якої фактично вижило 8 тварин, записуємо результат в стовпчик «накопичені частоти» в табл. 5 наступним чином: загинуло 0 тварин, вижило 8 + 7 + 4 + 2 + 1 = 22 тварини (тобто додаємо до числа тварин, які фактично вижили, число тварин, які вижили від більш високих доз).

Для дози 160 мг/кг, від якої 1 тварина загинула та 7 вижило, заносимо наступні дані: загинула 1 тварина, вижило 7 + 4 + 2 + 1 = 14 тварин.

Для дози 170 мг/кг, від якої загинуло в експерименті 4 тварини: загинуло 4

+ 1 = 5 тварин (тобто додаємо одну тварину, загиблу від меншої дози), вижило 4 + 2 + 1 = 7 тварин і т.д.

Відсоток загибелі тварин розраховується шляхом використання даних стовпчика «накопичені частоти»: сума загиблих тварин та тих, що вижили, приймається за 100%, а число загиблих тварин – за *х*.

На підставі обчислених за «накопиченими частотами» відсотків смертельних результатів будуємо характеристичну криву (рис. 4). З цієї кривої знаходимо, що величина *DL50* дорівнює 172,3 мг/кг.

%

Рис. 4. Графік токсичності тубазіда, побудований за принципом

«накопичених частот»

Як зазначалося вище, величину *DL50* можна визначити без побудови графіка – безпосередньо за даними таблиці 5 і формулою 10.

В цьому випадку:

*d* = 10; А = 170 мг/кг; В = 180 мг/кг; а = 41,7%; b = 78,6%, отже:

*DL50*

= 170+ −41,7 1 = 172,3 мг/кг

78,6−41,7

З графіка знаходимо, що *DL84* = 183 мг/кг, а *DL16* = 164 мг/кг.

Отже, *e* = 84 − 16

2

= 183−164 = 9,5 мг/кг

2

Інтервал між випробуваннями *d* в цьому прикладі дорівнює 10 мг/кг, а кількість тварин у групі *n* дорівнює 8.

Отже, стандартна помилка дорівнює:

*SDL50*

= ,66· , ·1 = 2,8 мг/кг

8

Таким чином, при визначенні *DL50* для тубазіда за допомогою методу Беренса отримали:

*DL50* = 172 ± 2,8 мг/кг

Середня величина визначеного ефекту вважається достовірною, оскільки перевищує помилку більше, ніж у 3 рази.

Відповідь: для турбазіда *DL50* = 172 ± 2,8 мг/кг, тому його можна віднести до *помірно небезпечних* речовин за інтенсивністю виникаючих ефектів при введенні в організм через рот (табл. 3).

# Заняття 2. Визначення середньої дози токсичного ефекту за методом Кербера

Кербер розробив метод обчислення *DL50*, що не вимагає графічного зображення характеристичної кривої, а використовуються тільки безпосередні результати експерименту.

У кожній групі, так само, як і при користуванні методом Беренса, має бути однакове число тварин. Кербер вважав достатнім, щоб кожна група складалася з 6 тварин, а інтервал між дозами, що випробовуються, не обов'язково повинен бути однаковим. Достатньо випробовувати 4–5 доз, включаючи, з одного боку, дозу, що не викликала ефекту ні в однієї тварини в групі, а з іншого боку – дозу, що викликала ефект у всіх тварин групи.

Значення *DL50* розраховують за формулою:

*DL50*

*= DL100*

*-* ∑(𝑧·𝑑)

𝑛

(12)

де *DL100* – доза досліджуваної речовини, яка викликала ефект у всієї групи тварин; *d* – інтервал (різниця) між кожними двома суміжними дозами; *z* – середнє арифметичне з *n* числа тварин, у яких спостерігався врахований ефект під впливом кожних двох суміжних доз (суміжні дві цифри у графі «загиблі» складається і поділяється пополам), *n* – число тварин у кожній групі.

*Приклад визначення середньої дози токсичного ефекту за методом Кербера*

Застосування методу Кербера може бути ілюстровано на прикладі експериментальних даних з визначення токсичності тубазіда, які наведені в табл. 5. Хід обробки показників представлений в табл. 6.

Таблиця 6 Хід визначення токсичності тубазіда за допомогою методу Кербера

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Дози, мг/кг | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 |
| Вижили, особин | 8 | 7 | 4 | 2 | 1 | 0 |
| Загиблі, особин | 0 | 1 | 4 | 6 | 7 | 8 |
| Загиблі, % | 0 | 12,5 | 50 | 75 | 87,5 | 100 |
| z | 0 | 0,5 | 2,5 | 5 | 6,5 | 7,5 |
| d | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| z∙d | 0 | 5,0 | 25,0 | 50,0 | 65,0 | 75,0 |

*n* = 8; *DL100* = 200 мг/кг

∑(𝑧 · 𝑑) = 5,0 + 25,0 + 50,0 + 65,0 + 75,0 = 220

*DL50*

= 200 – 22 = 200 – 27,5 = 172,5 мг/кг

8

При користуванні методом Кербера для визначення стандартної помилки DL50 величина стандартного відхилення повинна бути знайдена з графіка, побудованого на підставі частот, безпосередньо виявлених в експерименті.

Якщо побудувати графік залежності між дозами та відсотком загиблих тварин, то з нього видно, що *DL16* = 158 мг/кг і *DL84* = 188 мг/кг.

Таким чином,

*e* = 𝐿 − 𝐿 = 188−1 8 = 15 мг/кг

2 2

Отже, за формулою 11 стандартна помилка складає:

*SDL50*

= , 64·1 ·1 = 3,3 мг/кг

8

Таким чином, при визначенні DL50 для тубазіда за допомогою методу Кербера маємо:

*DL50* = 172,3±3,3 мг/кг

Середня величина ефекту вважається достовірною, оскільки перевищує помилку більше, ніж у 3 рази.

Відповідь: для турбазіда *DL50* = 172,3 ± 3,3 мг/кг, тому його можна віднести до *помірно небезпечних* речовин за інтенсивністю виникаючих ефектів при введенні в організм через рот (табл. 3).

## Завдання

* 1. Вивчити приклади визначення середньої дози токсичного ефекту за методами Беренса та Кербера.
	2. Визначити середню дозу токсичного ефекту для отруйної речовини, запропонованої викладачем, за допомогою методів Беренса та Кербера.
	3. Встановити клас токсичності речовини за значенням *DL50* (табл.3).
1. Оформити розрахунки в робочому зошиті.
2. Захистити роботу і відповісти на контрольні питання.

## Контрольні питання

1. Розкрийте особливості визначення дози, що викликала видимий ефект або летальний результат у 50% піддослідних індивідів.
2. В чому полягає метод Беренса для кількісної оцінки токсикологічної активності шкідливих речовин?
3. Охарактеризуйте принципи методу Кербера для обчислення середньо- смертельної дози токсиканта.
4. Поясніть переваги способу Спірмена – Кербера при визначенні середньої дози ефекту для оцінки токсикологічної активності речовин.