

OZNACZANIE OSTREJ TOKSYCZNOŚCI DOUSTNEJ  
INSEKTYCYDÓW CHLOROWANYCH  
(NA PRZYKŁADZIE DIELDRINU)

ANNA BOJANOWSKA, ALEKSANDRA BIELICKA

Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

Ocena toksykologiczna pestycydów przy dopuszczaniu ich do użytku oparta być musi na licznych i wielostronnych badaniach. Szereg ich otwiera badanie toksyczności ostrej, której ogólnie przyjętą charakterystyką jest średnia dawka śmiertelna —  $LD_{50}$ , oznaczana przy podaniu doustnym, naskórnym oraz przez drogi oddechowe w przypadku substancji lotnej.

Przy ocenie środka wymagane jest oznaczenie  $LD_{50}$  dla jednego gatunku zwierząt testowych oraz sprawdzenie na dwu innych gatunkach, czy nie zachodzą przy podaniu pojedynczej dawki znaczne różnice we wrażliwości; z tych ostatnich przynajmniej jeden gatunek nie może należeć do gryzoni.

Na otrzymanywaną doświadczalnie wartość liczbową  $LD_{50}$  mogą wpływać różnorodne czynniki. A więc z jednej strony dobór jednolitego zwierzęcego materiału testowego i ściśle przestrzeganie tych samych warunków przy prowadzeniu doświadczeń, a z drugiej — sposób statystycznej interpretacji danych liczbowych.

Celem naszej pracy było uzyskanie informacji o powtarzalności wielkości  $LD_{50}$  w odrębnych doświadczeniach oraz porównanie precyzji wyników liczbowych przy zastosowaniu odmiennych statystycznych metod obliczeniowych.

Współczesne metody statystyczne dla badań typu alternatywnego „śmierć lub przeżycie“ uwzględniają naturalną zmienność materiału biologicznego, w którym każdy osobnik reaguje na podany bodziec chemiczny podobnie, lecz nie identycznie. Metody te zapewniają, dla zachowania pożądanej dokładności oznaczeń, w dostatecznym stopniu zniwelowanie niedających się nigdy uniknąć rozbieżności.

Oczywiście precyzja oznaczeń jest proporcjonalna do liczebności prób testowych, lecz wszelkie ograniczenia w tym zakresie narzucane są względami technicznymi.

Jednoczesnym zadaniem było ustalenie ostrej toksyczności doustnej dwóch produktów krajowych: dieldrinu o dość wysokich i metoksychloru o stosunkowo niskich właściwościach trujących.

W pierwszej części przeprowadzono badanie dieldrinu. Użyto preparat produkcji doświadczalnej, otrzymany z Instytutu Przemysłu Organicznego. Według dołączonego przez I. P. O. atestu analitycznego produkt zawiera 90% związku 1, 2, 3, 4, 10, 10-heksachloro 6, 7 — epoksy 1, 4, 4 a, 5, 6, 7, 8, 8 a — ektahydro 1, 4, 5, 8 — dwumetanonaftalenu; jego temperatura topnienia wynosi 125 do 135°, a temperatura krzepnięcia 108 do 112°.

W licznych krajach stosuje się w preparatach użytkowych dieldrin techniczny o 85% czystości, którego temperatura krzepnięcia wynosi nieco ponad 95°, w Kanadzie natomiast używa się produkt przekrystalizowany o czystości ponad 99% i temperaturze topnienia 175 do 176°.

Im wyższa jest czystość substancji, tym w pewnym zakresie jego toksyczność jest mniejsza. Według Medwedzia ostra toksyczność technicznego dieldrinu jest, w dość znacznej mierze, uzależniona od stopnia zanieczyszczenia heksachlorocyklopentadieniem, wykazującym właściwości wysoce trujące.

W piśmiennictwie wartości  $LD_{50}$  dieldrinu dla szczurów przy doustnym podaniu nie są jednakowe i wahają się od 34 mg/kg dla samic i od 47 mg/kg dla samców, aż do 100 mg/kg dla obu płci. Dawka oznaczona w standardowych warunkach w laboratoriach Communicable Disease Center (Savannah, Ga, U. S. A) wynosi 46 mg/kg zarówno dla samców, jak i dla samic. Martin przytacza 100 mg/kg bez określenia płci, inni autorzy — 65 mg/kg oraz 87 mg/kg wagi ciała szczurów. W tych badaniach, jako rozpuszczalnik, używane były jadalne oleje roślinne, najczęściej kukurydziany i arachidowy, co nie może mieć wpływu na wspomniane różnice. Dość znaczne rozbieżności w podawanych wartościach  $LD_{50}$  wynikają niewątpliwie ze stopnia czystości badanych produktów, jak również z niejednakowej wrażliwości na dieldrin poszczególnych szczepów szczurów laboratoryjnych.

Ze względu na to, że w licznych krajach, m. in. w Szwajcarii i Wielkiej Brytanii, średnia doustna dawka śmiertelna, wynosząca 50 mg/kg wagi ciała, przyjmowana jest przy klasyfikacji pestycydów jako wielkość graniczna niebezpieczeństwa, wydawało się słuszne uzyskanie danych, dotyczących ostrej toksyczności doustnej preparatu krajowego.

#### B a d a n i a   w ł a s n e

Do doświadczeń używano szczury kapturowe w wieku około 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> miesięcy; rozpiętość wagi samic w poszczególnych próbach nie przekraczała 40 g, samców — 60 g. Szczury pochodziły z tej samej hodowli i przed

doświadczeniem, celem adaptacji, trzymane były w Zakładzie przez okres dwóch tygodni.

Jako rozpuszczalnik do sporządzania roztworów badanego preparatu używano olej arachidowy.

Ustalony na podstawie wstępnych badań orientacyjnych mnożnik postępu geometrycznego stężeń wynosił 1,6; później został obniżony na 1,34. Stężenia były ponadto tak dobrane, aby objętość podawanych szczurom roztworów mieściła się w granicach 0,40—0,60 ml. Substancje badane podawano w 4 stężeniach grupom testowym, każdej składającej się z 20 szczurów (10 samic i 10 samców), tak, że na jedno oznaczenie przeznaczano 80 szczurów, nie licząc zwierząt kontrolnych, otrzymujących olej bez trucizny. Roztwory wprowadzano metalową sondą długości 5 cm, wmontowaną do strzykawki zaopatrzonej w podziałkę i regulator, pozwalający na dawkowanie z dokładnością do 0,02 ml. Szczury umieszczano pojedynczo w klatkach i odnotowywano śmiertelność po upływie 48 godzin. Szczury były przetrzymywane jeszcze przez okres 14 dni i w tym czasie zanotowano tylko kilka przypadków śmiertelnych, które jednak nie były uwzględnione w obliczeniach.

Dla ilustracji podajemy wyniki dwóch oznaczeń, po jednym dla każdego z zastosowanych postępów poziomów -dawkowania (tab. 1).

Tabela 1

Śmiertelność szczurów po 48 godz. przy doustnym podaniu dieldrinu

L. p.	Stężenie roztworu g/100 ml	Dawka mg/kg	Śmiertelność w proc.		
			♀	♂	średnio
1	5,12	170,6	100	100	100
	3,20	106,6	70	80	75
	2,00	66,6	40	60	50
	1,25	41,6	20	30	25
2	3,24	107,1	40	90	65
	2,42	79,9	20	90	55
	1,81	59,6	20	40	30
	1,35	44,5	0	10	5

Przy interpretacji danych posługiwano się czterema matematycznymi metodami statystycznymi, były to:

1) metoda interpolacyjna Weila oparta na teorii stopniowego przybliżania, Thompsona (jest ona przyjęta przy toksykologicznej ocenie pestycydów na terenie Wielkiej Brytanii);

2) metoda graficzna probitowa-logarytmiczna Litchfielda i Wilcoxona;

3) metoda probitowa Fiuney'a;

4) metoda logitowa Berksona.

Wszystkie cztery metody zapewniają możliwość ustalenia, w oparciu o odchylenie standartowe, granic ufności dla  $LD_{50}$  przy obranym poziomie wiarygodności, zazwyczaj wynoszącym 0,95. Tłumaczy się to, że znaleziona wartość liczbowa średniej dawki śmiertelnej znajdzie się w 95 przypadkach na 100 w przedziale wyznaczonym tymi granicami.

Pierwsze dwie metody nie są pracochłonne i są łatwe do rutynowego stosowania, zwłaszcza pierwsza, w której można posługiwać się przygotowanymi przez Weila tabelami i paroma nieskomplikowanymi wzorami. Pozostałe dwie są nieco trudniejsze ze względu na konieczność długotrwałych obliczeń. Zestawienie wyznaczonych wartości średnich dostępnych dawek dieldrinu wraz z przedziałami ufności podane są w tab. 2.

Dla uwypuklenia zbieżności otrzymanych przez nas wartości  $LD_{50}$  sporządzone zostało zestawienie graficzne rozwartości odpowiadających im przedziałów ufności (diagram 1). Jak widać z niego niezależnie od użytej metody obliczeniowej większe przesunięcia zakresów istotności nie występują.

• Dla przekonania się jak dalece dopuszczalne jest ograniczanie liczby zwierząt, określono średnie dawki śmiertelne, używając przy mnożniku 1,6 na każdym z czterech poziomów dawkowania po 2, 3, 4, 5 i 6 szczerów; wyniki obliczone metodą Weila zestawione są w tab. 3.

Przy rozpatrywaniu przedstawionych wyników nasuwają się następujące sugestie:

1. Samice są bardziej odporne od samców na działanie dieldrinu; różnice wrażliwości osobniczej samic są większe, na co wskazują zarówno bardziej rozległe zakresy przedziałów ufności dla  $LD_{50}$ , jak i niższe współczynniki nachylenia prostych regresji w układzie logarytmiczno-probitowym. Jest to uzasadnione reakcjami fizjologicznymi. Reakcja samców jest znacznie bardziej wyrównana.

2. Prosta i szybka metoda Weila może znaleźć zastosowanie do obliczania wartości  $LD_{50}$  przy rutynowych badaniach sprawdzających, np. przy badaniach uprzednio znanych substancji podstawowych, lecz wytwarzanych odmiennymi procesami technologicznymi. Precyzja dla znajdowanej tą metodą  $LD_{50}$  nie odbiega w zasadzie od precyzji metod probitowych (Finneya oraz Litchfielda i Wilcoxona).

3. Wydaje się, że przy użyciu metody Weila liczbę zwierząt testowych, przeznaczonych na pojedynczy poziom dawkowania można ograniczyć do 6, co najwyżej do 4. Zwiększenie jednak tej liczby do 10 sztuk daje możliwość uzyskania bardziej pewnych wyników.

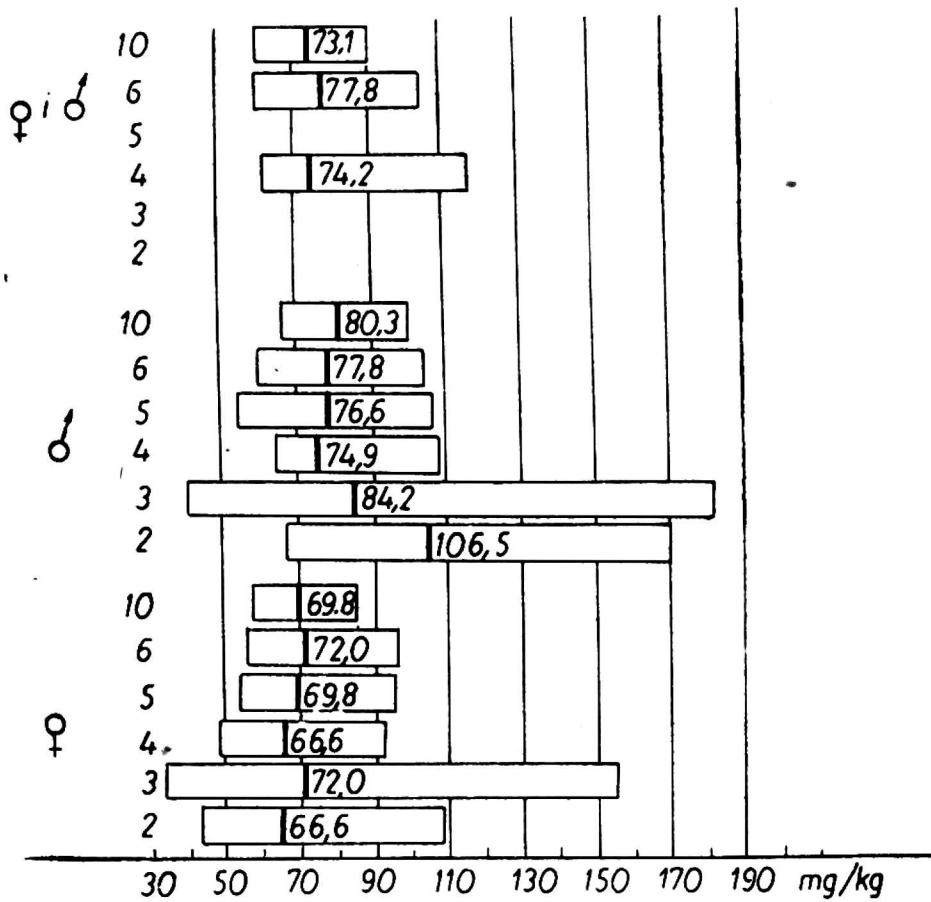
4. Pomijając wykonaną na samicach część doświadczenia drugiego ze względu na nieuzyskanie śmiertelności wyższej od 40% i stąd wynikająca konieczność posłużenia się ekstrapolacją wartość liczbowa oznaczonej  $LD_{50}$  jest powtarzalna w kolejnych próbach i zgodna z podawaną w piś-

Tabela 2  
Doustne średnie dawki śmiertelne dieldrinu dla szczurów LD<sub>50</sub> mg/kg wraz z granicami przedziałów ufności

liczba	Zwierzęta testowe		Weila	Litchfielda i Wilcoxon	Finney'a	Berksona	Mnożnik poziomów dawkowania
	pleć i waga						
40	♀	135—175	80,3 (65,1—99,1)	69,0 (49,0—96,6)	70,4 (47,5—93,3)	76,3 (54,9—106,0)	
40	♂	130—185	69,8 (57,2—85,1)	58,0 (41,0—81,2)	57,6 (40,7—74,5)	58,1 (42,1—80,2)	1,6
80	♀ i ♂		73,1 (59,3—90,2) *	66,5 (53,2—83,1)	66,3 (52,3—80,1)	66,5 (64,8—68,4)	
40	♀	120—150		108 (81,2—143,6) **	109,5 (99,7—119,3) **	103,5 (93,6—113,1) **	
40	♂	120—165	74,3 (62,1—88,0)	66,5 (56,8—77,8)	61,2 (52,0—70,4)	63,7 (54,3—74,7)	1,34
80	♀ i ♂		77,0 (64,4—92,5)	80,0 (68,3—93,6)	81,3 (69,3—93,3)	73,8 (70,9—76,7)	

\* Badanie wykonano na 4 grupach szczurów złożonych z 5♀ + 5♂.

\*\* Przy ekstrapolacji nie daje się obliczyć, ponieważ nie uzyskano śmiertelności ponad 50%.



Doustne średnie dawki śmiertelne dieldrinu LD<sub>50</sub> w mg/kg (według metody Weila)

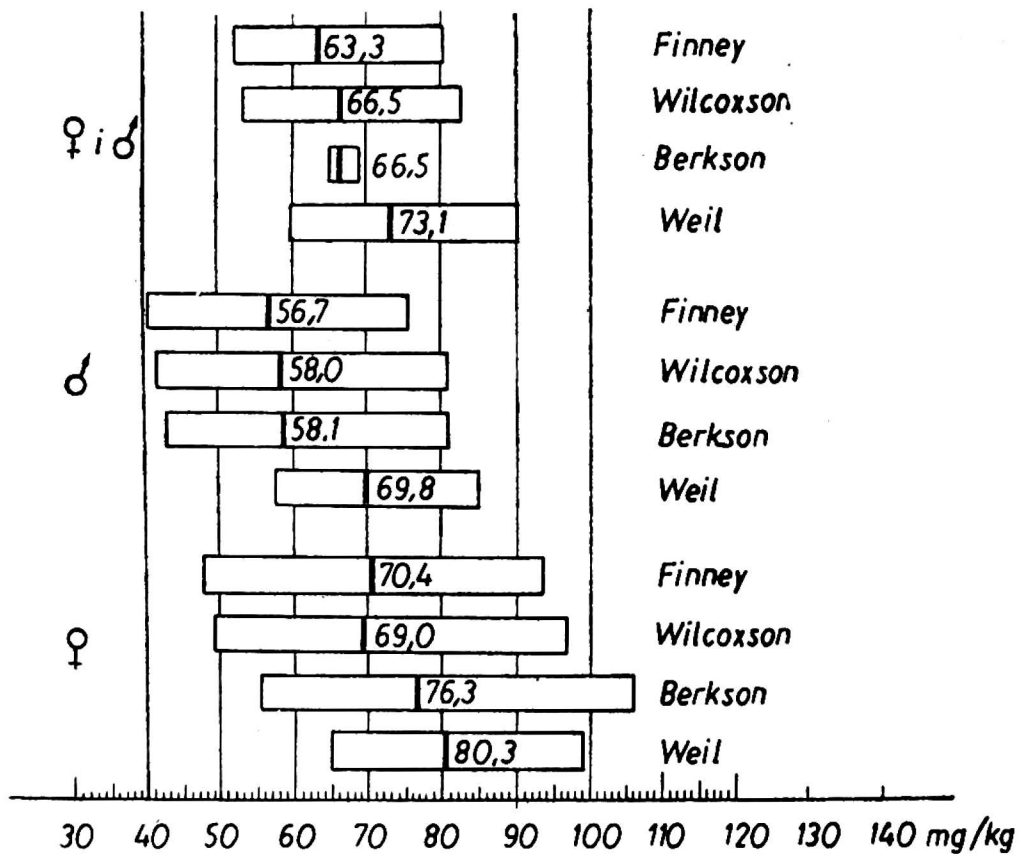


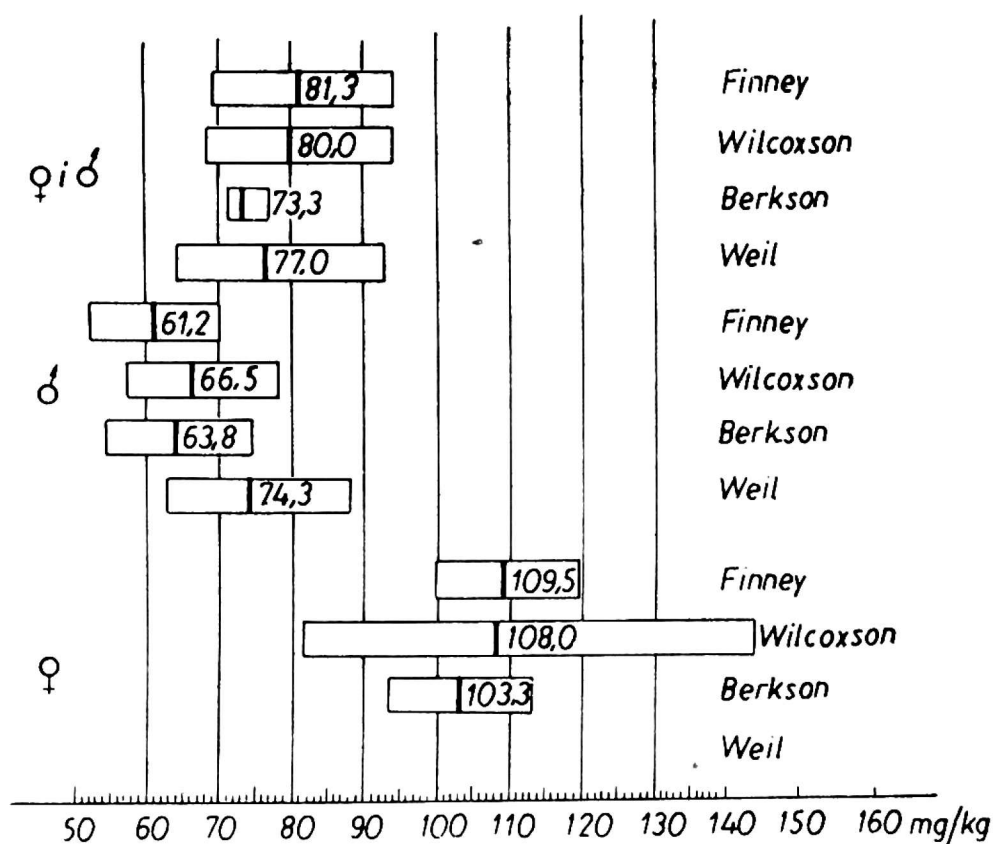
Diagram 1. Doustne średnie dawki śmiertelne dieldrinu LD<sub>50</sub> w mg/kg (mnożnik 1,6)

Tabela 3

Doustne średnie dawki śmiertelne dieldrinu LD<sub>50</sub> w mg/kg

Liczba badanych szczurów		♀	♂	♀ i ♂
na poziom dawkowania	łącznie			
2	8	106,5 (66,6—170,4)	66,6 (41,6—109,0)	—
3	12	84,2 (39,1—181,4)	72,0 (33,4—155,0)	—
4	16	74,9 (52,3—107,2)	66,6 (46,7— 92,8)	74,2 (60,4—117,4)
5	20	76,6 (53,3—106,1)	69,8 (51,8— 93,9)	—
6	24	77,8 (58,3—104,0)	72,0 (54,4— 95,4)	77,8 (58,3—103,9)
10	40	80,3 (65,1— 99,1)	69,8 (57,2— 85,1)	73,1 (59,3— 90,2)

W nawiasach granice przedziałów ufności według met. Weila

Diagram 2. Doustne średnie dawki śmiertelne dieldrinu LD<sub>50</sub> w mg/kg (mnożnik 1,34)

miennictwie. Zostało przez nas ustalone, że dla samców wartość liczbowa LD<sub>50</sub> dieldrinu nie jest niższa od 58 i wyższa od 66 mg/kg, dla samic zaś nie niższa od 70 i nie wyższa od 80 mg/kg wagi ciała szczurów. Cytowane w publikacjach mniejsze wartości były uzyskane w doświadczeniach, wykonanych na młodszych od użytych przez nas szczurach, tj. posiadających wiek od 1 do 1<sup>1/2</sup> miesiąca.

5. Nie dostrzeżono, aby zawężenie poziomów dawkowania przez zmianę mnożnika z 1,6 na 1,34 wywarło zdecydowany wpływ na poszukiwaną wielkość.

6. Logitowa metoda statystyczna Berksona, naszym zdaniem, powinna być stosowana w badaniach substancji o nieznanym potencjale toksyczności przy użyciu kilkunastu do 20 szczurów na każdy z czterech poziomów dawkowania. Zapewnia to szczególnie precyzyjne wyznaczenie poszukiwanej wartości liczbowej  $LD_{50}$ .

#### LITERATURA

1. Barbély F.: Bull. du Serr. fed. de l'hyg. publ. 1, 21, 1959.
2. Barnes J. M., Edson E. F.: Information Circular on the Toxicity of Pesticides to Man. 8, 2, 1960.
3. Berkson J.: J. Amer. Stat. Associat. 48, 565, 1953.
4. Bojanowska A.: „Statystyczna interpretacja biologicznych badań pestycydów“ — Praca zbiorowa. Instytut Ochrony Roślin, Poznań 1961.
5. Bojanowska A.: Biuletyn I. O. R. 17, 167, 1962.
6. Brady U. E., Dorough H. W., Arthur B. W.: J. Econ. Entomol. 53, 6, 1960.
7. Dermal S., Thomas G.: „Repertoire toxicologique des pesticide's“ Gemleux 1960.
8. Finney D. J.: „Probit analysis“ Cambridge 1947.
9. Finney D. J.: „Statistical method in biological assay“ London 1952.
10. Fisher C. D.: Chem. Week. Report, 1, 71, 1956
11. Great Britain.: Monthly Bull. Minist. Hlth 16, 2, 1957
12. Great Britain, Ministry of Agriculture Fisheries and Food. „Agricultural Chemicals Approval Scheme“ (*Insecticides, Fungicides and Herbicides*) London 1960.