

# PATOLOGIA I TERAPIA

BARBARA STEFANIAK

## Metody oznaczania dawek leków i trucizn ( $ED_{50}$ i $LD_{50}$ )

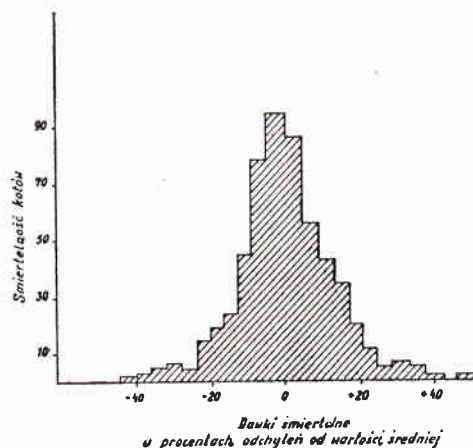
Z Zakładu Farmakologii Doświadczalnej i Lecznictwa Instytutu Weterynarii w Puławach  
Kierownik: doc. dr TEODOR JUSZKIEWICZ

W początkowych próbach określania aktywności biologicznie czynnych substancji oznaczano zwykle dawką minimalną, która powodowała reakcję jednego osobnika w grupie, lub dawkę maksymalną, która wywoływała oczekiwaną reakcję w całej grupie zwierząt doświadczalnych. Dawka minimalna powodowała reakcję tylko najłabszego osobnika w grupie i nie mogła świadczyć o odporności populacji. Podobnie wielkość dawki maksymalnej zależała od tolerancji osobnika najodporniejszego. Aby zmniejszyć rozpiętość między dawką minimalną a maksymalną, starano się wykluczyć obiektywne przyczyny, dla których jedne osobniki reagowały przy dawkach bardzo niskich, a inne dopiero przy wysokich. Dobierano więc grupy zwierząt eliminując różnicę płci, wieku, ras i przeliczano dawki leku lub trucizny na jednostkę ciężaru ciała zwierzęcia. Jednak nawet bardzo staranny dobór materiału doświadczalnego nie może zagwarantować jednolitej reakcji u wszystkich zwierząt w grupie. Przyczyną tego jest różnorodność cech indywidualnych poszczególnych osobników. W wielu wypadkach nie można uchwycić czynników wpływających na tę różnorodność osobniczą. Uniemożliwia to przewidywanie reakcji jednej jednostki na podstawie wyniku uzyskanego dla innej.

Ogólnie wiadomo, że wielkość dawki podawanego zwierzęciu leku lub trucizny zależy od szeregu czynników. Reakcja grupy zwierząt na tę samą dawkę będzie się różnić w zależności od właściwości indywidualnych poszczególnych osobników. Uwzględniając rozpiętość reakcji indywidualnych pewnej populacji, można przy użyciu odpowiedniego zakresu dawek ustalić zależność pomiędzy wielkością dawki, a ilością zwierząt na nią reagujących. Istnieje możliwość przedstawienia tej zależności przy pomocy równania matematycznego lub na wykresie.

Od dawna obserwowano, że jeżeli w grupie zwierząt podawać różne dawki, to największa ilość osobników reaguje na dawki bliskie średniej, a im dawka bardziej odbiega od średniej, tym mniej zwierząt na nią reaguje. Graficzną ilustrację tej obserwacji przedstawił już w 1926 r. de Lind van Wijngaarden (cyt. 4) na podstawie doświadczenia, w którym badał śmiertelność kotów po podaniu nalewki z naparstnicy (wykres 1).

Doświadczenie było przeprowadzone bardzo starannie i na dużym materiale biologicznym (573 koty). Z wykresu widać, że przy dawkach znacznie odchylających się od średniej (np. o 40% in plus czy in minus) ilość reagujących zwierząt jest znikoma. Zatem dawki odległe od średniej nie są zupełnie charakte-



Wykres 1. Histogram częstotliwości padania kotów po różnych dawkach nalewki z naparstnicy układający się w charakterystyczną krzywą rozkładu normalnego.

(C. de Lind van Wijngaarden, cyt. wg J. H. Burn, D. J. Finney, L. G. Goodwin: Biological Standardization, 1952).

rystyczne dla tej grupy zwierząt. Jako średnią dawkę, obarczoną najmniejszym błędem, wybrano więc taką, która wywołuje reakcję dodatnią u 50% testowanych osobników. Przy tego rodzaju wyborze unika się błędów wywołanych nieprzeciętnymi cechami indywidualnymi. Dawkę leku wywołującą dodatnią reakcję u 50% zwierząt doświadczalnych w grupie nazwano *dosis effectiva* 50% ( $ED_{50}$ ).

W przypadku testowania trucizny — efektem dodatnim jest śmierć zwierząt użytych w doświadczeniu. Przy określaniu aktywności czynnika śmiertelnego, jako zasadniczą dawkę przyjęto więc taką, po podaniu której, pada 50% osobników w grupie i nazwano ją *dosis letalis* 50% ( $LD_{50}$ ).

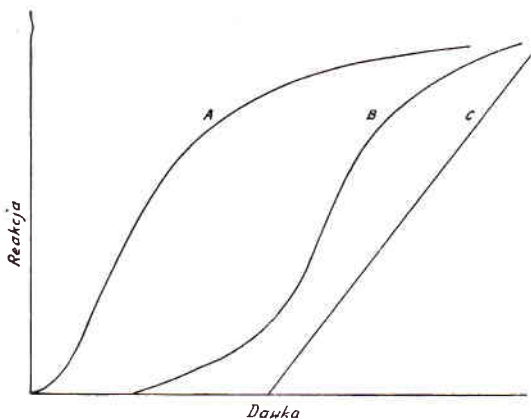
Aby określić  $ED_{50}$  lub  $LD_{50}$  trzeba przebadć reakcję zwierząt na pewien określony zakres dawek w szeregu grup. Jeżeli do szacowania wielkości średnich posługiwać się obliczeniami matematycznymi, trzeba wyznaczyć doświadczalnie największą dawkę, przy której nie reaguje żaden osobnik w grupie, oraz najmniejszą dawkę, przy której reagują wszystkie. Przy stosowaniu metod wykreślnych zakres dawek powinien być tak szeroki,

by wywołał reakcję dodatnią przynajmniej w granicach od 15—80%.

Wartości  $ED_{50}$ ,  $LD_{50}$  i  $DC_{50}$  (*dosis curativa* 50% — dawka lecznicza wywołująca reakcję dodatnią u 50% leczonych osobników) należą do podstawowych określeń w farmakologii i toksykologii. Zajomość  $LD_{50}$  i  $DC_{50}$  umożliwia obliczenie współczynnika leczniczego (*index therapeuticus*), który jest miarą bezpieczeństwa stosowania leku. Współczynnik ten oznaczony symbolem I. Th. jest stosunkiem  $LD_{50}$  do  $DC_{50}$  (I. Th. =  $\frac{LD_{50}}{DC_{50}}$ ). Przyjmuje się, że środki o I. Th. niższym niż 1,8 nie nadają się do lecznictwa, gdyż przy niewielkim przedawkowaniu powodować mogą zatrucia i zejścia śmiertelne (10).

Znając  $ED_{50}$  pewnych preparatów standardowych można wyznaczyć aktywność biologiczną nowych leków czy trucizn, przez porównanie ilościowej reakcji zwierząt. Posługując się znajomością dawek średnich ( $LD_{50}$  i  $ED_{50}$ ) można też porównywać wrażliwość ras czy płci w obrębie gatunku na różne szczepy bakteryjne, lub określone rozcieńczenia wirusów, jak również poprawę przeżywalności zakażonych zwierząt po podaniu leku.

Jeżeli przedstawić graficznie zależność ilości reagujących zwierząt od wzrastających dawek leku czy trucizny, okaże się, że punkty nie układają się w linię prostą, czyli procentowa ilość zwierząt reagujących w grupie nie jest proporcjonalna do wielkości stosowanych dawek. Dla praktycznego określenia zależności między wielkością dawek a ilością osobników na nie reagujących, podaje się dawki uszeregowane w postępie geometrycznym lub arytmetycznym. Każda dawka podaje się odpowiednio dużej grupie zwierząt. Charakter krzywych ilustrujących reakcję, jako funkcję wzrastających dawek (w zależności od zastosowanego układu wykresnego) ujmuje wykres 2 (wg 2).

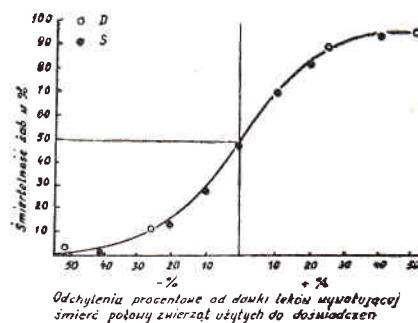


Wykres 2. Współzależność w układzie dawka-reakcja. (H. C. Batson: An Introduction to Statistics in Medical Sciences, 1958).

Krzywa A wykreślona jest w takim układzie, gdzie reakcję przedstawiono jako procentową śmiertelność zwierząt w zależności od wielkości dawek uszeregowanych w postępie arytmetycznym. Krzywa B jest sigmoidą i przedstawia wyniki tego samego doświadczenia co krzywa A, tylko dawki przedstawiono na osi odciętych jako wartości ich logarytmów, a reakcję jak poprzednio w procentach. Przy nieuniknio-

nym rozrzucie punktów łatwiej jest wykreślić krzywą B niż krzywą A. Najłatwiej jednak byłoby pracować w takim układzie, gdzie zależność reakcji od dawki byłaby linią prostą. Okazuje się, że krzywą B można przekształcić w prostą C, jeśli dawki przedstawimy w skali logarytmicznej a reakcję zwierząt ująć nie w procentach ale w jednostkach zwanych probitami (zagadnienie probitów będzie omówione szerzej w dalszej części).

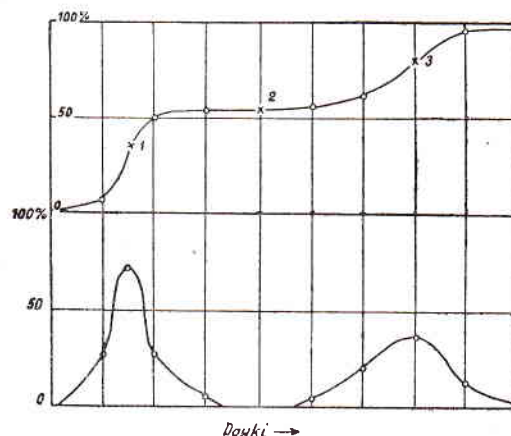
Krzywe przedstawione na wykresie 2 okazały się charakterystyczne dla tego typu doświadczeń, niezależnie od stosowanych preparatów i materiału biologicznego. Potwierdzeniem tego niech będzie ciekawe porównanie, które przeprowadził Behrens w 1929 r. (wg Burna — 4). Otóż przebadał on obraz śmiertelność żab *Rana temporaria* w zależności od wzrastających, dożylnych dawek strofantyny. Rezultaty tego doświadczenia porównał z wynikami uzyskanymi przez Trevana, który badał śmiertelność tego samego gatunku żab, po podaniu różnych dawek digitoksyny do worka limfatycznego. Behrens ujął wyniki obu doświadczeń we wspólnym układzie wykreślonym (wykres 3) — na osi rzędnych zaznaczając śmiertelność żab w procentach, zaś na osi odciętych dawki wyrażone jako procent odchylenia od  $LD_{50}$ .



Wykres 3. Krzywa zależności między procentami śmiertelności żab po podaniu (o) digitoksyny i (●) strofantyny. (J. H. Burn, D. J. Finney, L. G. Goodwin: Biological Standardization, 1952).

Położenie punktów z obu doświadczeń przeprowadzonych zupełnie niezależnie jedno od drugiego jest takie, że wyznaczają one wspólną krzywą. Świadczy to o określonej prawidłowości dla zależności reakcji od dawki podanego preparatu.

Wspomiana tu prawidłowość zostaje jednak tylko wtedy zachowana, jeśli materiał użyty w doświadczeniu jest jednolicie dobrany. Jeżeli warunek ten nie jest zachowany, zdarza się, że punkty uzyskane w doświadczeniu wyznaczają krzywą o zgoła zaskakujących kształtach jak np. na wykresie 4 (12).



Wykres 4. Krzywa działania dawek dla dwóch niewłaściwie dobranych grup zwierząt. (W. Biehler i H. Wollschitt, cyt. wg L. Ther: Pharmakologische Methoden, 1949).

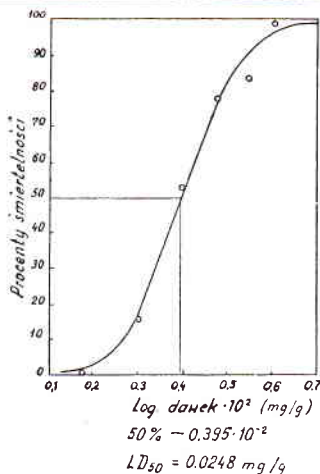
Być może źle dobrano tu materiał doświadczalny pod względem wieku, lub część zwierząt była chora, albo nie bacząc na dużą różnicę wrażliwości na dany preparat — użyto zwierząt obu płci.

Wstępną fazą każdego doświadczenia musi być orientacyjne określenie rzędu wielkości dawek. Pewne dane na ten temat można wyszukać w literaturze. Jeśli nie dysponuje się żadnymi wskazówkami, trzeba zrobić kilka prób na niewielkiej liczbie zwierząt, aby ustalić zakres stosowanych dawek. Następnie ustala się dawki w szeregu arytmetycznym lub geometrycznym i każdą dawkę podaje grupie składającej się z kilku osobników — przeważnie 4—7 (6).

Metoda Trevana

Jedną z pierwszych metod określania LD<sub>50</sub> była graficzna metoda Trevana opracowana w 1927 r. Tok postępowania ilustruje poniższy przykład, cytowany przez Burna (4).

Dawka (mg/g)	Liczba myszek		Procentowa śmiertelność
	Hełc wyściowa	Radły	
0.015	20	0	0
0.020	69	11	16
0.025	95	50	53
0.030	78	61	78
0.035	44	37	84
0.040	20	20	100



Wykres 5. Metoda Trevana — wyznaczenie LD<sub>50</sub> chlorowodoru kokainy u myszek.

(J. H. Burn, D. J. Finney, L. G. Goodwin, 1952).

W cytowanym doświadczeniu określano toksyczność 0,1% roztworu chlorowodoru kokainy dla myszek. Z tabeli widać, że dawki ułożono w postępie arytmetycznym a różnica postępu wynosiła 0,005 mg/g. Przy dawce 0,015 mg/g stwierdzono 0% śmiertelności. Przy wzrastających dawkach śmiertelność rosła osiągając przy 0,040 mg/g 100%. Punkty przeniesione z tabelki na wykres układają się w krzywą, z której łatwo określić LD<sub>50</sub> (na osi odciętych zaznaczono wartości logarytmów dawek). 50% śmiertelność uzyskuje się przy dawce, której logarytm wynosi  $0,395 \times 10^{-2}$  — 0,0248 mg/g.

Metoda Kärbera

Często stosowana dla oznaczenia ED<sub>50</sub> jest rachunkowa metoda Kärbera opracowana zarówno dla arytmetycznego jak i geometrycznego szeregu dawek. W tabeli 1. ujęto wyniki doświadczenia w arytmetycznym układzie dawek, o różnicy postępu  $r = 0,1$  (12).

Na dawkę maksymalną wszystkie osobniki reagowały dodatnio, na dawkę najmniejszą żaden. W metodzie tej ED<sub>50</sub> oblicza się wg wzoru przytoczonego pod tablicą, przy czym:

Dawka	Reakcja	z	r	z-r
0.9	+++++	4.5	0.1	0.45
0.8	++++-	3.0	0.1	0.30
0.7	+ + - - -	3.0	0.1	0.30
0.6	++++-	3.5	0.1	0.35
0.5	+ + + - -	2.0	0.1	0.20
0.4	+ - - - -	0.5	0.1	0.05
0.3	- - - - -			
				$\Sigma = 1.65$

$$ED_{50} = D_{max} - \frac{\Sigma(z \cdot r)}{n}$$

Tab. 1. Oznaczenie ED<sub>50</sub> metodą Kärbera. Dawki w postępie arytmetycznym. (L. Ther: Pharmakologische Methoden, 1949).

D<sub>max</sub> (w tym przypadku 0,9) jest dawką, na którą reagują wszystkie zwierzęta,

z — jest średnią arytmetyczną ilości zwierząt reagujących przy dwu sąsiednich dawkach,

n — ilością zwierząt w poszczególnych grupach. Oczywiście, wynik będzie tym dokładniejszy, im więcej zwierząt użyje się do eksperymentu.

Doświadczenie drugie (tabela 2) dotyczy badania ilościowej reakcji samca ropuchy, Bufo viridis, na gonadotropinę surowicy kłaczki (13). Stosując metodę Kärbera określono jaką ilość jednostek gonadotropiny jest niezbędna, aby wywołać reakcję plemnikową u połowy osobników.

Dawka	Reakcja	p	d	$\frac{(P_{n-1} + P_n)}{2}$
20.0	+++++	6/6	0.05	11/12
17.8	++++-	5/6	0.05	10/12
15.9	++++-	5/6	0.05	10/12
14.1	++++-	5/6	0.05	10/12
12.6	++- - -	2/6	0.05	7/12
11.2	+- - - -	2/6	0.05	4/12
10.0	- - - - -	0/6	0.05	2/12
				$\Sigma = 44/12$

$$\lg ED_{50} = \lg D_{max} - \Sigma \left( \frac{P_{n-1} + P_n}{2} \right) d$$

Tab. 2. Oznaczenie ED<sub>50</sub> metodą Kärbera. Dawki w postępie geometrycznym.

(F. X. Wohlzogen: Wien. Tierärztl. Mscrh. 37, 6:394—398, 1950).

Dawki uszeregowane są w postępie geometrycznym (logarytmy tworzą postęp arytmetyczny). Z tabeli 2 wynika, że przy dawce 20 I.E. reagowały wszystkie żaby w grupie, zaś przy dawce 10 I.E. ani jedna. Wartość ED<sub>50</sub> określa się ze wzoru pod tabelą 2, gdzie:

p — określa ilość żab reagujących na ogólną liczbę osobników w grupie,

$\frac{P_{n-1} + P_n}{2}$  — jest średnią arytmetyczną ilości reagujących żab w dwu sąsiadujących ze sobą grupach,

d — jest różnicą logarytmów poszczególnych dawek.

Metoda Reeda i Muencha

Spośród metod rachunkowych najbardziej może znana jest metoda Reeda i Muencha, często stosowana dla obu układów dawek. Pierwszym przykładem będzie oznaczenie ED<sub>50</sub> leku obniżającego poziom cukru we krwi (14). Za reakcję dodatnią przyjęto takie działanie leku, które przy danej dawce powoduje spadek poziomu cukru co najmniej o 30% w stosunku do wartości wyjściowej. Spadki poziomu cukru nie sięgające 30% uznane zostały w doświadczeniu za reakcję ujemną. Każdą z wymienionych dawek podawano dziesięciu pacjentom, u których później oznaczano poziom cukru i porównywano z poziomami wyjściowymi. Sposób obliczenia w metodzie Reeda i Muencha opiera się na dwóch następujących założeniach.

1. Osobniki, które reagują na dawkę x zareagowałyby również na każdą dawkę większą od niej.  
 2. Osobniki, które nie reagują na dawkę x nie zareagowałyby również na dawkę mniejszą od x.  
 Jak widać z tabeli 3, przy wzrastających w postępie arytmetycznym dawkach, rośnie również ilość pacjentów reagujących większym niż 30% spadkiem poziomu cukru.

Dawka	Zareagowało		Dane kumulatywne		% reagujących *
	+	-	Zareagowało	Nie zareag.	
$D_{min}$ $x_0 = 0,5$	0	10	0	25	$\frac{100-0}{0+25} = 0$
$x_1 = 0,625$	4	6	4	15	$\frac{100-4}{4+15} = 21,1$
$x_2 = 0,750$	3	7	7	9	$\frac{100-7}{7+9} = 43,8$
$x_3 = 0,875$	8	2	15	2	$\frac{100-15}{15+2} = 88,2$
$D_{max}$ $x_4 = 1,0$	10	0	25	0	$\frac{100-25}{25+0} = 100$

\* % reagujących =  $\frac{\text{ilość reagujących} \times 100}{\text{suma reagujących i nie reagujących}}$

Tab. 3. Obliczenie ED<sub>50</sub> metodą Reeda i Muencha (J. Venulet: Współczesne problemy farmakoterapii, 1959).

Oprócz wyników z poszczególnych grup zebrano w tabeli dane kumulatywne uwzględniające powyższą wymienioną założenia. I tak np. na dawkę x<sub>3</sub> zareagowało ośmiu pacjentów, ale na nią zareagowały również pacjenci, którzy reagowali przy niższych dawkach. W ten sposób można przyjąć, że na dawkę x<sub>3</sub> reagowało 15 pacjentów.

Obliczony na podstawie danych kumulatywnych procent reagujących pozwala zorientować się, że w danym przykładzie ED<sub>50</sub> będzie znajdować się między dawkami x<sub>2</sub> a x<sub>3</sub>.

Srednią dawkę oblicza się ze wzoru:

$$ED_{50} = x_i + \frac{[50 - p(x_i)] \cdot [x_{i+1} - x_i]}{[p(x_{i+1}) - p(x_i)]}$$

x<sub>i</sub> — najwyższa dawka przy której reaguje mniej niż 50% osobników,

x<sub>i+1</sub> — najniższa dawka przy której reaguje więcej niż 50% pacjentów,

p(x<sub>i</sub>) i p(x<sub>i+1</sub>) — procenty reagujących przy dawkach x<sub>i</sub> i x<sub>i+1</sub>.

W omówionym przykładzie x<sub>i</sub> = x<sub>2</sub> a x<sub>i+1</sub> = x<sub>3</sub>, wobec tego:

$$ED_{50} = x_2 + \frac{[50 - p(x_2)] \cdot [x_3 - x_2]}{[p(x_3) - p(x_2)]}$$

Ilustracją geometrycznej wersji metody Reeda i Muencha będzie przykład obliczenia LD<sub>50</sub> wirusa wiosenno-letniego zapalenia mózgu na myszkach (11). Każdej grupie składającej się z sześciu myszek wprowadzano wirus w rozcieńczeniu 10-krotnie większym od poprzedniej. Wyniki przedstawia tabela 4.

Ilość padłych i przeżywających myszek w grupach przeliczona została jak w poprzednim przykładzie na dane kumulatywne. W ostatniej kolumnie obliczono procent śmiertelności przy danym rozcieńczeniu. Jak widać z tabeli, LD<sub>50</sub> leży między rozcieńczeniami 10<sup>-4</sup> i 10<sup>-5</sup>. Na podstawie danych z tabeli oblicza się wartość logarytmu LD<sub>50</sub>, który równa się logarytmowi rozcieńczenia przy którym reaguje więcej niż 50% osobników (lg x<sub>i+1</sub>) plus współczynnik proporcjonalności (w) pomnożony przez różnicę między logarytmami rozcieńczeń (d).

$$lg LD_{50} = lg x_{i+1} + w \cdot d$$

$$w = \frac{p(x_{i+1}) - 50}{p(x_{i+1}) - p(x_i)}$$

Dla określenia dokładności obliczonej LD<sub>50</sub> można wykorzystać wzór Pizziego (wg Schwerdta i Merrel — 9).

Dawka wirusa (w rozcieńczeniu)	Liczba myszek przy każdym rozcieńczeniu				% śmiertelności
	dane bezwzględne		dane kumulatywne		
	przeżyły	padły	przeżyły	padły	
1	2	3	4	5	6
10 <sup>-1</sup>	0	6	0	25	100
10 <sup>-2</sup>	1	5	1	19	95
10 <sup>-3</sup>	2	4	3	14	82
10 <sup>-4</sup>	2	4	5	10	68
10 <sup>-5</sup>	3	3	8	6	42
10 <sup>-6</sup>	4	2	12	3	20
10 <sup>-7</sup>	6	0	18	1	5
10 <sup>-8</sup>	5	1	23	1	4

Tab. 4. Obliczanie LD<sub>50</sub> wirusa wiosenno-letniego zapalenia mózgu metodą Reeda i Muencha.

(A. K. Szubladze, S. J. Gajdamowicz: Kratkij kurs praktičeskoj wirusologii, 1954).

$$SE_{LD_{50}} = \pm \sqrt{\frac{0,79 \cdot d \cdot R}{n}}$$

d — różnica między logarytmami rozcieńczeń,

R — różnica między logarytmami rozcieńczeń dla punktów kumulatywnej śmiertelności 25% i 75%,

n — liczba zwierząt przypadająca na jedno rozcieńczenie.

Metoda Ziejtlenoka

W oparciu o metodę Reeda i Muencha, Ziejtlenok przedstawił uproszczoną tablicę interpolacyjną (11). W praktyce najczęściej przy mianowaniu wirusa używa się rozcieńczenia 10-krotne i każdym rozcieńczeniem zakaża 4 myszki. Po przebadaniu wszystkich możliwych kombinacji rezultatów padania i przeżywania zwierząt, Ziejtlenok zestawiał tablicę interpolacji, wg której od razu można znaleźć mantysę antylogarytmu LD<sub>50</sub>. Cechą antylogarytmu jest wykładnik potęgowy najbliższego rozcieńczenia przy którym padło więcej niż 50% zwierząt.

Rozcieńczenie wirusa						
10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
+	+	+	+	+	+	-
+	+	+	+	+	-	-
+	+	+	+	+	-	-
+	+	+	-	-	-	-
padły	19	15	11	7	4	1
przeżyły	-	-	-	1	2	5

$$W_{10^{-5}} = \frac{4}{2+4} = \frac{4}{6}; \quad W_{10^{-6}} = \frac{1}{5+1} = \frac{1}{6}$$

Tab. 5. Oznaczenie LD<sub>50</sub> metodą Ziejtlenoka.

(A. K. Szubladze, S. J. Gajdamowicz: Kratkij kurs praktičeskoj wirusologii, 1954).

W podanym przykładzie mianowania wirusa, z danych kumulatywnych wynika, że LD<sub>50</sub> znajduje się między rozcieńczeniami 10<sup>-5</sup> i 10<sup>-6</sup>. Przy rozcieńczeniu 10<sup>-6</sup> padła jedna myszka a liczba wszystkich, które przeżyły tę dawkę wirusa wynosi 5. Wskaźnik dla rozcieńczenia 10<sup>-6</sup> będzie więc  $\frac{1}{5+1} = \frac{1}{6}$ . Dla rozcieńczenia 10<sup>-5</sup> sumaryczna śmiertelność wynosi 4, a przeżywalność 2, wskaźnik zatem jest  $\frac{4}{2+4} = \frac{4}{6}$ .

	50%	3/4	3/5	4/5	4/6	5/6	4/7	5/7	6/7	5/8	6/8	7/8	5/9	6/9	7/9	8/9	10/10
5(50%)	%	75	60	80	67	83	57	72	86	62.5	75	87.5	55	67	78	89	100
1/4	25	50	29	53	40	57	22	47	39	32	50	60	17	40	53	61	67
1/5	20	45	25	50	38	52	19	43	34	29	45	55	14	36	48	57	62
2/5	40	71	50	75	63	77	41	70	78	55	71	79	33	63	74	80	83
1/6	17	43	23	47	34	50	17	40	32	27	43	53	13	34	46	53	60
2/6	33	60	37	63	50	66	29	56	68	43	60	69	23	50	62	70	75
1/7	14	41	22	45	32	48	16	38	50	25	41	50	12	32	44	52	58
2/7	29	54	32	60	44	61	25	52	63	36	54	64	19	44	57	65	70
3/7	43	78	60	81	71	83	50	75	81	65	78	82	42	71	80	85	88
1/8	12.5	40	21	44	31	47	16	37	49	24	40	49	11	31	42	51	57
2/8	25	50	29	55	40	57	22	47	59	32	50	60	17	40	53	61	67
3/8	37.5	66	43	71	57	73	35	63	75	48	66	74	28	57	70	75	80
1/9	11	39	20	43	30	45	15	36	48	24	39	49	11	30	42	50	56
2/9	22	47	26	52	38	54	20	44	56	30	47	57	15	38	50	58	64
3/9	33	60	37	63	50	66	29	56	68	43	60	69	23	50	62	70	75
4/9	44	80	63	83	74	84	54	79	86	67	80	86	45	74	82	87	89
0/10	0	33	17	37	25	40	12	30	42	19	33	43	09	25	36	44	50

Tab. 6. Tabela interpolacji dla wyliczenia LD<sub>50</sub> wg liczby padłych zwierząt (do metody Ziejtlenoka).

W tabelicy interpolacyjnej odszukuje się w rubryce poziomej wskaźnika  $W_{10^{-5}} = \frac{4}{6}$  (dla śmiertelności > 50%). W kolumnie pionowej zaś wskaźnika  $W_{10^{-6}} = \frac{1}{6}$  (dla śmiertelności < 50%).

Dla obu tych wskaźników znajduje się mantysę antylogarytmu, która w opisanym przykładzie wynosi 34, a jego cecha —5. Po odczytaniu w tabelicy antylogarytmów, wartość LD<sub>50</sub> odpowiada rozcieńczeniu 1:218 800. Jest to wartość orientacyjna i w razie potrzeby można dokładniejsze dane uzyskać inną z podanych metod.

Metoda Millera — Taintera

Dla lepszego zrozumienia następnej metody oznaczania LD<sub>50</sub> — graficznej metody Millera-Taintera konieczne jest wyjaśnienie pochodzenia probitów.

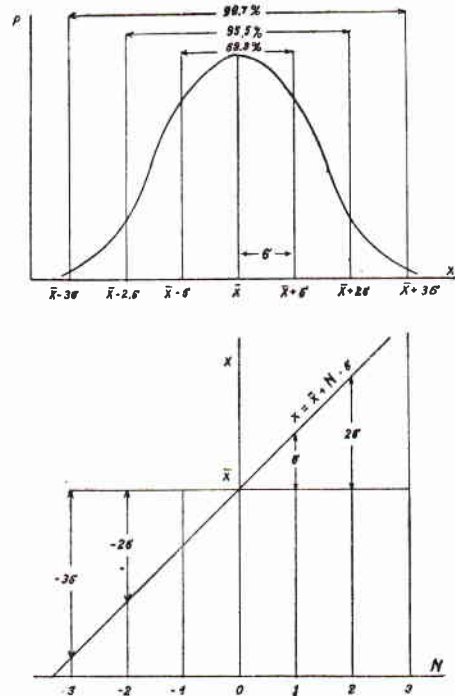
Jeżeli oznaczyć w jednakowych warunkach indywidualne dawki śmiertelne dla większej liczby zwierząt, to okaże się, że układają się one w krzywą rozkładu normalnego, tzw. krzywą błędu Gaussa. Krzywa ogólnie ma kształt dzwonu, który jest różny dla różnych układów doświadczalnych. Graficzne przedstawienie zależności między p — czyli prawdopodobieństwem ilości zwierząt reagujących, a N — nazwanym normalnym równoważnym odchyleniem daje w efekcie krzywą rozkładu normalnego jak na wykresie 6. Jeżeli całe pole ograniczone krzywą przyjąć za 100%, to prawdopodobieństwo uzyskania reakcji na wartości dawki x odchyłającej się od średniej x nie więcej niż o δ w obu kierunkach jest równe ~ 68,3%, dla x w zakresie  $\bar{x} - 2\delta$  do  $\bar{x} + 2\delta$  wynosi ~ 95,5%, a w granicach  $\bar{x} - 3\delta$  do  $\bar{x} + 3\delta$  ~ 99,7%. Zatem prawdopodobieństwo występowania reakcji przy dawkach odchyłających się od średniej o więcej niż 3 δ w dowolną stronę jest ~ 0,3% (8). Jeżeli dawka średnia x powoduje reakcję u określonej liczby p zwierząt, np. jest to LD<sub>50</sub>, to wszystkie dawki x, przy których reagują pozostałe osobniki danej populacji można wyrazić przy pomocy dawki średniej i iloczynu

odchylenia standardowego  $\left( \delta = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}} \right)$  przez normalne równoważne odchylenie N.

$$x = \bar{x} + N \cdot \delta \quad (1)$$

Jest to równanie linii prostej przedstawionej na wykresie 6 poniżej krzywej rozkładu normalnego.

Gdy na osi odciętych N = 0, wtedy x = x. Jest to dawka przy której reaguje 50% osobników. Dla N = ± 1 wartość x = x ± δ; jak widać z krzywej rozkładu normalnego, prawdopodobieństwo zareago-



Wykres 6. Przekształcenie krzywej rozkładu normalnego w prostolinią zależność między dawką a normalnym, równoważnym odchyleniem.

wania na dawkę x dotyczy znaczenie mniejszej ilości zwierząt niż dla dawki x. Jeszcze mniejsze ilości osobników reagują na dawki  $x \pm 2\delta$  i  $x \pm 3\delta$  (N = ± 2, N = ± 3). Im więc wartość bezwzględna N jest większa tym ilość zwierząt reagujących na dawkę x jest mniejsza, to znaczy, że im dawka bardziej odbiega od wartości średniej, tym mniejsze jest prawdopodobieństwo uzyskania reakcji. Tak więc uzyskuje się w efekcie linię prostą ilustrującą zależność reakcji do dawki x. Tylko reakcja nie jest wyrażona jak poprzednio w procentach, a jako N — normalne równoważne odchylenie. W oparciu o to Bliss (3) wprowadził jednostkę prawdopodobieństwa (probability unit) równą N + 5, tak aby jednostki były dodatnie. Tę nową jednostkę prawdopodobieństwa nazwano probitem. Bliss opracował również tabelę zamiany procentów na probity.

Umożliwia ona wykreślanie zależności dawka — reakcja (w probitach) jako linii prostej. Możliwość tę wykorzystali Miller i Tainter do opracowania prostej i szybkiej metody wykresowej (7). Metoda ta jest często stosowana ze względu na jej liczne zalety. Do sporządzenia wykresu można użyć papieru z siatką półlogarytmiczną — w układzie zwykłym zaznacza się probity reakcji, a na skali logarytmicznej dawki. Jeśli wykres sporządza się na papierze milimetrowym, wtedy nanosi się nie wartości dawek, a ich logarytmy.

Przeważnie każda seria danych zawiera dawkę na którą nie reaguje żaden osobnik w grupie (reakcja 0%), jak również dawkę na którą reagują wszystkie zwierzęta w grupie (reakcja 100%). Rezultatom tym nie odpowiadają końcowe wartości probitów. Dlatego Barlett (wg 10), zaproponował poprawkę polegającą na wpisaniu  $\frac{1}{4}$  w miejsce zerowej ilości reagujących zwierząt, czyli  $\frac{0,25}{n}$  zamiast  $\frac{0}{n}$ , oraz n —  $\frac{0,25}{n}$  zamiast  $\frac{n}{n}$  w przypadku 100% reakcji.

Sposób szacowania wartości ED<sub>50</sub> metodą Millera-Taintera omówiony zostanie na przykładzie doświadczenia przeprowadzonego przez autorów (7). W do-

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	—	2.67	2.94	3.12	3.24	3.36	3.44	3.52	3.60	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.00	4.04	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.22	4.26	4.29	4.32	4.36	4.38	4.42	4.44
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.58	4.62	4.64	4.66	4.70	4.72
40	4.74	4.77	4.80	4.82	4.84	4.87	4.90	4.92	4.95	4.98
50	5.00	5.02	5.02	5.08	5.10	5.12	5.15	5.18	5.20	5.22
60	5.25	5.28	5.30	5.33	5.36	5.38	5.41	5.44	5.46	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.70	5.74	5.77	5.80
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.12	6.18	6.22
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
90	6.28	6.28	6.29	6.29	6.30	6.31	6.31	6.32	6.32	6.34
91	6.34	6.34	6.35	6.36	6.36	6.37	6.38	6.38	6.39	6.40
92	6.40	6.41	6.41	6.42	6.43	6.44	6.44	6.45	6.46	6.46
93	6.48	6.48	6.49	6.49	6.50	6.51	6.52	6.53	6.53	6.54
94	6.56	6.56	6.57	6.58	6.58	6.60	6.60	6.62	6.62	6.64
95	6.64	6.66	6.66	6.68	6.68	6.70	6.70	6.72	6.72	6.74
96	6.75	6.76	6.77	6.78	6.80	6.81	6.82	6.84	6.85	6.86
97	6.88	6.90	6.91	6.92	6.94	6.96	6.98	6.99	7.01	7.03
98	7.05	7.08	7.10	7.12	7.14	7.17	7.20	7.22	7.26	7.29
99	7.32	7.36	7.40	7.46	7.51	7.58	7.65	7.74	7.88	8.09

Tab. 7. Probity (jednostki prawdopodobieństwa) dla przekształcenia sigmoidalnej krzywej układu dawka-reakcja w linię prostą.

(H. C. Batson, An Introduction to Statistics in the Medical Sciences, 1958).

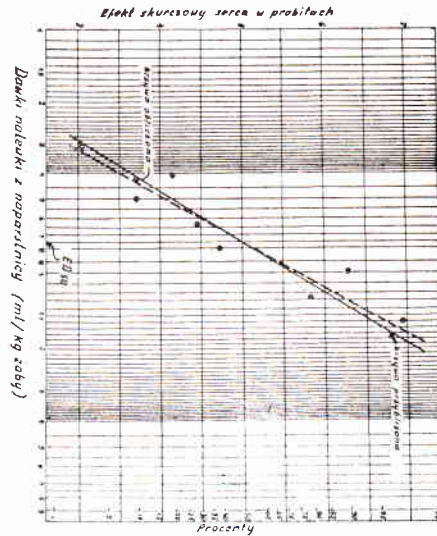
świadczeniu badano wpływ różnych dawek nalewki z naparstnicy na efekt skurczowy serca u żab. Dawki nalewki z naparstnicy ustalono wg postępu geometrycznego o ilorazie 1,26 i każdą dawkę podawano w ośmiu grupach liczących po 10 żab. Tabela 8 ujmuje liczbowe wartości doświadczenia, a wykres 7 przedstawia to graficznie.

Nr GRUPY	DAWKA	REAKCJA	PROBITY
1	3,16	0/10	(3,04)
2	3,98	2/10	4,16
3	5,01	1/10	3,72
4	6,31	3/10	4,48
5	7,94	4/10	4,75
6	10,00	9/10	6,28
7	12,59	8/10	5,84
8	15,85	10/10	(6,96)

Tab. 8. Oznaczanie LD<sub>50</sub> metodą Millera-Taintera. Wyniki z tabeli przeniesiono na wykres 7.

(L. C. Miller, M. L. Tainter: Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 57, 2:261—264, 1944).

W kolumnie 3 tabeli 8 podano ilość żab reagujących efektem skurczowym serca w stosunku do całkowitej ilości osobników w grupie otrzymujących daną dawkę. I tak np. przy dawce 3,98 ml/kg zareagowały dwie spośród 10 żab (20%), a na dawkę 15,85 ml/kg wszystkie w grupie (100%). Uzyskane procenty wyrażono przy pomocy tablicy zmiany na probity i wartości umieszczono na siatce półlogarytmicznej. Dla 0% i 100% uwzględniono poprawkę wprowadzoną przez Barletta (wartości probitów podane w nawiasach). Po przeniesieniu wszystkich punktów z tabeli wykresła się prostą (linia ciągła). Odczytane z wykresu ED<sub>50</sub> (dawka odpowiadająca 5 probitom) wynosi 7,55 ml/kg. Należy zwrócić uwagę, że przy różnych rzędach wielkości dawek cykle skali logarytmicznej powtarzają się. W omawianym przykładzie użyte dawki są rzędu jednostek



Wykres 7. Graficzne szacowanie ED<sub>50</sub> metodą Millera-Taintera.

(L. C. Miller, M. L. Tainter: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 57, 2:261—264, 1944).

(1—5) i dziesiątek (6—8). Dla porównania, na wykresie przedstawiono linią przerywaną wyniki tego samego doświadczenia obliczone metodą rachunkową, która jest dokładniejsza, ale za to bardzo pracochłonna. Jak widać, porównanie wypadło korzystnie dla metody wykresowej, ponieważ uzyskano identyczną wartość ED<sub>50</sub>. Istnieje również wzór dla określenia błędu standardowego od dawki średniej, obliczonej graficzną metodą Millera-Taintera. W tym celu należy odczytać dwie wartości z wykresu t.j. wielkości dawek przy probitach 4 i 6, które odpowiednio wynoszą 4,75 ml i 12,20 ml. Różnicę tych dwu dawek oznacza się symbolem 2s i podstawia do wzoru:

$$SE_{ED_{50}} = \frac{2s}{\sqrt{2n'}}$$

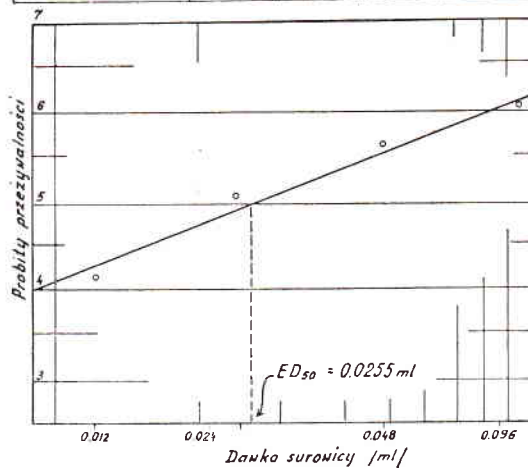
n' — pod pierwiastkiem stanowi sumę ilości zwierząt w grupach, które mieszczą się w zakresie probitów 3,5 do 6,5. W opisanym przykładzie n' wynosi 6×10 czyli 60 sztuk. Obliczony po podstawieniu wartości błąd standardowy wynosi ± 0,68 ml/kg.

Dla łatwiejszego przyswojenia graficznej metody Millera-Taintera warto jest zapoznać się z innym przykładem, który dotyczy określania ED<sub>50</sub> surowicy przeciw pałeczce duru brzusznej (2). Surowicę wstrzykiwano myszkom zakażanym dawką 10 tysięcy żywych pałeczek duru. Wyniki doświadczenia umieszczono w tabelce i na wykresie 8.

Metoda Millera-Taintera jest chętnie stosowana przy testowaniu nowych leków lub trucizn. Najbardziej pewne wyniki uzyskuje się, jeśli do testowania preparatu badanego o nieznanym aktywności, przeprowadza się równoległe oznaczanie aktywności standardu i przedstawia aktywność względną. Unika się wtedy szeregu błędów przeprowadzając porównanie na takim samym materiale biologicznym i w takich samych warunkach. Wyjaśnia to dokładniej przykład podany przez Batsona (2). Badano właściwości uodporniające szczepionki przeciw durowi brzuszemu używając 4 grup myszek (po 20 sztuk w każdej grupie). Zastosowano 2 różne dawki szczepionki wzorcowej i 2 badanej. W sześć dni potem wszystkie myszki zakażano dootrzewnowo dawką 10.000 pałeczek duru brzusznej i obserwowano przeżywalność. Szczepionka badana wykazała w obu dawkach większą aktywność niż szczepionka wzorcowa wstrzykiwana w analogicznych dawkach (tabela i wykres 9).

Z obliczeń wynika, że probity wynoszą: dla szczepionki badanej przy śmiertelności  $\frac{6}{20}$  (30%) — 4,48

Dawka surowicy	0,012	0,024	0,048	0,096
Przeżywające licz. zwierząt	4/20	11/20	15/20	17/20
Procent przeżywalności	20	55	75	85
Probity	4,16	5,12	5,67	6,04

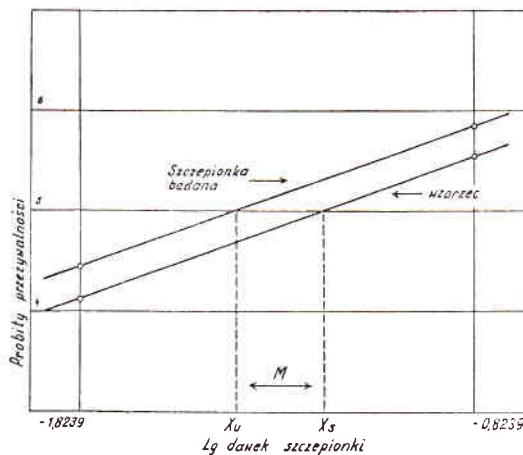


Wykres 8. Graficzne szacowanie ED<sub>50</sub> metodą Millera-Taintera. Przeżywalność myszek uodpornionych biernie surowicą przeciw pałeczce duru brzuszego i zakażonych dawką 10 000 żywych pałeczek duru.

(H. C. Batson: An Introduction to Statistics in the Medical Sciences, 1958).

probita, a przy śmiertelności  $\frac{16}{20}$  (75%) — 5,67 probita. Dla szczepionki wzorcowej analogiczne wielkości wynoszą (20%) — 4,16 probita oraz (70%) — 5,52 probita. Logarytm dawki 0,015 ml = -1,8239, a dawki 0,15 ml = -0,8239. Obliczone wartości przenosi się na papier milimetrowy zaznaczając na rzędnej probity przeżywalności dla odpowiedniej dawki, zaś na odciętej wartości logarytmów dawek.

Szczepionka badana		Szczepionka wzorcowa	
Niska dawka /0,015 ml/	Wysoka dawka /0,15 ml/	Niska dawka /0,015 ml/	Wysoka dawka /0,15 ml/
6/20	16/20	4/20	14/20



Wykres 9. Graficzne szacowanie względnej aktywności właściwości uodporniających szczepionki p. duru brzuszemu. (H. C. Batson: An Introduction to Statistics in the Medical Sciences, 1958).

Wartość ED<sub>50</sub> można znaleźć po połączeniu odpowiednich punktów. W przytoczonym przykładzie wynosi ona dla szczepionki badanej 0,0365 ml, zaś dla standardu 0,0625 ml. Najprostsze przybliżenie względnej aktywności można określić jako iloraz odwrot-

ności dawki ED<sub>50</sub> szczepionki badanej w stosunku do standardu:

$$\frac{1}{0,0365} : \frac{1}{0,0625} = \frac{0,0625}{0,0365} = 1,71 \text{ czyli } 171\%$$

Pozioma odległość między liniami szczepionki badanej i wzorcowej w każdym ujęciu pionowym wynosi M i jest logarytmem względnej aktywności. Wartość M w logarytmach odczytuje się z odciętej jako  $x_s - x_u$ , gdzie  $x_s$  i  $x_u$  to są wartości logarytmów szczepionki standardowej i badanej o niezna-nej mocy, wywołujących różne reakcje.

W tym przypadku  $x_s = -1,2041$ ,  $x_u = -1,4377$ , tak więc  $M = (-1,2041) - (-1,4377) = 0,2336$ . Względna aktywność znaleziona jako antylogarytm M wynosi 1,71 czyli 171%.

Pozostaje teraz wyznaczyć błąd standardowy względnej aktywności, który równa się  $SE_A = = 2,303 \cdot SE_M \cdot A$ ;

SE<sub>M</sub> — to błąd standardowy logarytmu względnej aktywności,

A — względna aktywność (w tym przykładzie 1,71 lub 171%). Aby więc obliczyć SE<sub>A</sub> trzeba najpierw wyznaczyć SE<sub>M</sub>. Błąd standardowy logarytmu

względnej aktywności — wynosi:  $SE_M \frac{1}{b} \sqrt{\frac{2}{n_s} + \frac{2}{n_u}}$

gdzie b jest współczynnikiem nachylenia linii (gdy linie są równoległe współczynnik dla obu prostych jest taki sam) a n<sub>s</sub> i n<sub>u</sub> reprezentują ilość zwierząt w grupach dla szczepionki standardowej i badanej w zakresie probitów 3,5 do 6,5; w omówionym przykładzie n<sub>s</sub> = n<sub>u</sub> = 40. Współczynnik nachylenia (b) może być najłatwiej określony jako różnica w probitach reakcji dla dwóch dawek różniących się 10-krotnie. Wtedy różnica logarytmów tych dawek wynosi 1. W tym przykładzie probity dla przeży-wających uzyskane przy dawkach 0,15 ml i 0,015 ml szczepionki badanej są odpowiednio 5,84 i 4,48, więc

$$b = \frac{5,84 - 4,48}{1} = 1,36. \text{ Ponieważ obie proste są}$$

równoległe, współczynnik nachylenia będzie oczy-wiście ten sam. Błąd od logarytmu względnej akty-wności wynosi po podstawieniu wartości liczbowych:

$$SE_M = \frac{1}{1,36} \cdot \sqrt{\frac{2}{40} + \frac{2}{40}} = 0,233.$$

Posiadając powyższe dane można obliczyć błąd standardowy. Zgodnie z przytoczonym uprzednio wzorem —

$$SE_A = 2,303 \cdot 0,233 \cdot 1,71 = 0,92$$

Tak więc aktywność badanej szczepionki w odnie-sieniu do aktywności standardu obliczona na podsta-wie danych z tabeli wynosi 171 ± 92%.

Opisane wyżej szacowanie względnej aktywności jest tylko wtedy dostatecznie godne zaufania, o ile obie proste w układzie dawka — reakcja są do siebie równoległe, jak to uzyskano w przytoczonym przy-padku. Oczywiście lepiej jest określać względną aktywność przy pomocy większej ilości dawek i dla sprawdzenia wiarygodności danych obie proste wy-kreślać na jednym arkuszu. Jeżeli rozbieżność dwu linii jest tak duża, że trudno jest uznać je równo-ległymi, graficzne określenie względnej aktywności nie będzie wystarczająco godne zaufania i trzeba w takim wypadku posłużyć się metodami rachunko-wymi.

Przy porównywaniu wartości średnich, np. aktywności dwóch szczepionek, czy toksyczności leków, trzeba odpowiedzieć na pytanie, czy różnice między wielkościami średnimi są wiarygodne, to znaczy, czy nie spotykają się w przedziałach błędu wielkości średnich. O wiarygodności różnicy można sądzić, jeżeli różnica między dwoma średnimi jest większa niż suma błędów standardowych SE<sub>1</sub> i SE<sub>2</sub> (1), czyli:

$$\bar{x}_1 - \bar{x}_2 > SE_1 + SE_2 \text{ lub } \bar{x}_1 - \bar{x}_2 > 2 \sqrt{SE_1^2 + SE_2^2}$$

Blizsze omówienie testów dla oznaczania wiarygodności różnic wykracza jednak poza ramy tego artykułu.

Podany tu przegląd metod oznaczania ED<sub>50</sub> i LD<sub>50</sub> nie wyczerpuje oczywiście całości szerokiego zagadnienia. Przedstawiono jedynie metody najczęściej stosowane, w miarę dokładne i proste.

#### Piśmiennictwo

1. Barlow R.: Wwiedzenie w chemizację farmakologii. Izdatelstwo Inostrannoj Literatury, Moskwa, 1959 (pierwotnie s angijskowie).
2. Batson H. C.: An Introduction to Statistics in the Medical Sciences. Burgess Publishing Co. Minneapolis 15, Minnesota, 1958.
3. Bliss C. J.: The method of probits. Science, 79, 2037:38-39, 1934.
4. Burn J. H., Finney D. J., Goodwin L. G.: Biological Standardization. Oxford University Press. London, 1952.
5. Chajkin W. P.: Kontrol biologicznej aktywności preparatów po zadannym absoljutywnym predielam dla

- sredniej efektywnej dozy. Farmakologia i Toksikologia, 24, 6:748-753, 1961.
6. Jeske J.: Farmakologiczne metody badania leków, P.Z.W.L., Warszawa, 1955.
7. Miller L. C., Tainter M. L.: Estimation of the ED<sub>50</sub> and Its Error by Means of Logarithmic Probit Graph Paper. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 57, 2:261-264, 1944.
8. Oktaba W.: Elementy statystyki matematycznej i metodyka doświadczalnictwa. P.W.N. Warszawa, 1962.
9. Scherwadt C. E., Merrel M.: Precision of Measurement of Lansing Virus Infectivity in Cotton Rats. Amer. J. Hyg. 55, 2:268-275, 1952.
10. Supniewski J.: Farmakologia, P.Z.W.L. Warszawa, 1962.
11. Szubladze A. K., Gajdamowicz S. J.: Kratkij kurs prakt. czeskiej wirusologii, Miedgiz. Moskwa, 1954.
12. Ther L.: Pharmakologische Methoden. Stuttgart, 1949.
13. Wohlzogen F. X.: Quantitative Untersuchungen über die Reaktion der männlichen Wechselkröte (Bufo viridis) auf Stutenserum — Gonadotropin. Wien. Tierärztl. Mschr. 37, 6:394-398, 1950.
14. Venulet J.: Współczesne problemy farmakoterapii, P.Z.W.L., Warszawa, 1959.

Adres autorki: mgr inż. Barbara Stefanak, Paławy, ul. Kaniowczyków 8 m. 6.

TADEUSZ KWIATKOWSKI

## Aktywność fosfatazy alkalicznej u cieląt zdrowych i chorych z objawami biegunki

Z Katedry Chorób Wewnętrznych Wydziału Wet. WSR we Wrocławiu  
Kierownik: prof. dr BRONISŁAW GANCARZ

Wprowadzenie badania aktywności enzymów do diagnostyki, jako jeszcze jednej metody pomocniczej, znacznie rozszerza możliwości rozpoznawcze w chorobach wewnętrznych, zwłaszcza w chorobach wątroby. Niedostatecznie natomiast opracowane jest to zagadnienie w schorzeniach przewodu pokarmowego zwierząt, zwłaszcza w nieżytach żołądka i jelit i w toksycznej dyspepsji u cieląt noworodków, w których to stanach często dochodzi do zmian dystroficznych i rozpadowych w błonie śluzowej i aparacie gruczołowym żołądka i jelit oraz w mięszu wątroby (7).

Biorąc pod uwagę wspomniane wyżej zmiany anatomo-patologiczne oraz fakt, że komórki błony śluzowej jelit zawierają znaczne ilości fosfatazy alkalicznej (FA), należy się spodziewać zwiększenia ilości tego enzymu w stanach chorobowych, którym towarzyszy biegunka z wydalaniem śluzu i strzępów zniszczonych martwiczo nabłonekó jelit. Ponadto poziom FA mógłby wskazywać na istnienie patologicznych zmian w wątrobie w przebiegu biegunek, znany jest bowiem wzrost poziomu FA w niedrożności nawet częściowej dróg żółciowych oraz w przypadkach zapalnych uszkodzeń wątroby (5).

Fosfataza alkaliczna należy do grupy hydrolaz; przyspiesza rozkład fosforowych wiązań estrowych. Z estrów tych powstaje kwas fosforowy i odpowiedni alkohol. Jest to enzym szeroko rozpowszechniony, stwierdzany niemal we wszystkich tkankach zwierzęcych, jednak niektóre tylko komórki zawierają dużą jego ilość. Są to: strefy wzrostowe kości, błona śluzowa jelit, kora nerek, krwinki białe, czynny gruczoł mlekowy. Wg Gibińskiene (2) 75% FA wzrastającej ponad normę w surowicy jest pochodzenia kostnego, wydalana ona jest do żółci przez wątrobę, która

działa tu jako narząd oczyszczający. Z innych źródeł tego zaczynu wymienić należy samą wątrobę.

Oznaczenia poziomu FA u przeżuwaczy wykonywał Kolb (4), u 30 zdrowych cieląt ustalił wysokość tego fermentu na 28,7 jednostek Kinga-Armstronga (KA), a u bydła dorosłego na 10,9 j. KA. Allcroff (1) uzyskał bardzo szerokie wahania u bydła ras angielskich, bo od 0,3 do 114,3 j. KA.

W stanach patologicznych badano aktywność FA przede wszystkim w zaburzeniach gospodarki wapniowo-fosforowej i w stanach nowotworowych. O obniżeniu tego zaczynu u ludzi w schorzeniach żołądkowo-jelitowych, wrzodzie żołądka i dwunastnicy pisze Zausch (8).

W własnych badaniach przeprowadzono oznaczenia poziomu FA metodą Urbacha-Raabego w surowicy krwi 57 cieląt zdrowych pochodzących z różnych środowisk hodowlanych, u 29 cieląt niedożywionych, przegłodzonych (materiał rzeźny) i charłacznych oraz u 32 sztuk chorych, u których badaniem klinicznym stwierdzono nieżyt żołądka i jelit, z wyraźnie zaznaczonymi objawami biegunki. Wyniki w jednostkach Kinga-Armstronga (j. KA) przedstawiono w tabeli 1 i na wykresie I.

Tab. 1

Cielęta zdrowe wiek	j. KA	Cielęta chore w różnym wieku	j. KA
1 tydzień	15	charłacze, głodzone niedożywione	2,5—12,6
2 tygodnie	12	chore z lekkim przebiegiem choroby	12—19
1 miesiąc	10	chore z ciężkim przebiegiem choroby	0,02—2
6 miesięcy	10		29—40
2 lata	8		