

# İki Sonuçlu Biyolojik Denemelerde LD<sub>50</sub> Değerinin Tahmininde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

## Statistical Methods for Estimating the LD<sub>50</sub> in Quantal Bioassay: Review

İsmet DOĞAN,<sup>a</sup>  
Nurhan DOĞAN<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Biyostatistik ve Tıbbi Bilişim AD,  
Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Tıp Fakültesi, Afyonkarahisar

Geliş Tarihi/Received: 11.09.2014  
Kabul Tarihi/Accepted: 11.10.2014

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Nurhan DOĞAN  
Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Tıp Fakültesi,  
Biyostatistik ve Tıbbi Bilişim AD,  
Afyonkarahisar,  
TÜRKİYE/TURKEY  
nurhandogan@hotmail.com

**ÖZET** Biyolojik denemeler, fiziksel, kimyasal, biyolojik, psikolojik veya fizyolojik herhangi bir uyarıcının (stimulus) canlı materyalde oluşturduğu reaksiyon aracılığı ile etki gücünü (potency) tahmin eden yöntemlerdir. Biyolojik denemeler içerisinde önemli bir yere sahip olan doz-cevap çalışmalarında temel amaç, doz-cevap ilişkilerini belirlemek veya minimal etkili dozu bulmaktır. Özellikle ilaç geliştirme ile ilgili olmakla birlikte tedavi amaçla kullanılan vitamin, hormon vb. şeyler ile ilgili çalışmalarda uygun dozun belirlenmesi gerekmektedir. Çünkü bunların düşük dozda olmaları etkisiz olmalarına, yüksek dozda olmaları ise kabul edilemez sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Biyolojik denemeler sonucunda elde edilen yanıtlar, nitel (var-yok, ölü-sağ vb.) veya nicel olarak ifade edilebilmektedir. Gerek nitel gerekse nicel verilerden yararlanarak LD<sub>50</sub> değeri istatistiksel yöntemler kullanılarak tahmin edilebilmektedir. Bu çalışmada, nitel veriler için geliştirilmiş on altı farklı yöntem tanıtılmış ve literatürden elde edilen bilgilerden yararlanarak yöntemler birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Biyolojik deneme; öldürücü doz (LD<sub>50</sub>); doz-yanıt ilişkisi

**ABSTRACT** Biological assays (bioassay, for short) are methods for estimating the potency of a physical, chemical, biological, psychological or physiological stimuli of any material (for example, a vitamin, a hormone or a drug) by utilizing the reaction caused by its application to experimental subjects that are living (for example, an animal, a piece of animal tissue, etc). The fundamental aim of the dose-response study have an important place in biological assays is to determine the dose-response relationship or find the minimal effective dose. Because of these low dose to be ineffective, while at high doses that lead to health problems is unacceptable. If the response measure is binary, the assay said to be quantal. Otherwise it is quantitative. Experiments involving drugs and pesticides usually require quantal response analysis. A quantal response is one which a certain event either happens or doesn't happen. A common measure of the response of a substance in a species is the median lethal dose (LD<sub>50</sub>). This is the dose that kills %50 of the population within a fixed time. There are many methods available for estimating LD<sub>50</sub>. In this paper, methods to estimate the median lethal dose are reviewed. Sixteen statistical methods to estimate the median lethal dose are introduced and discussed.

**Key Words:** Bioassay; lethal dose (LD<sub>50</sub>); dose-response relationship

Türkiye Klinikleri J Biostat 2015;7(1):39-46

**E**n geniş anlamı ile biyolojik deneme kavramı, fiziksel, kimyasal, biyolojik, psikolojik veya fizyolojik herhangi bir uyarıcının (stimulus) canlı materyalde oluşturduğu reaksiyon aracılığı ile etki gücünün (potency) ölçülmesi olarak anlaşılmalıdır. Biyolojik deney, başta uygun deney hayvanları olmak üzere insan, organ, doku, hücre vb. canlı materyale

verilen vitamin, hormon, ilaç vb. dozları için elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde sıklıkla başvurulan bir yöntemdir.<sup>1</sup>

Uyarıcının etkisi “ya hep ya hiç” şeklinde olduğu zaman kuantal, uyarıcı artan dozlarda uygulandığında, uyarıcının etkisi de kademeli olarak artıyorsa kademeli doz-yanıt ilişkisinden söz edilir. Bir uyarıcının farklı dozları ile yanıtlar arasındaki ilişkinin deneysel olarak belirlenmesi ile ilgili biyolojik denemeler,

1. Amacına göre;
  - a) Mutlak (= absolute) Denemeler;
  - b) Karşılaştırmalı Denemeler;
2. Elde edilen yanıtlara göre;
  - a) Doğrudan Denemeler;
  - b) Paralel Doğru Denemeleri;
  - c) Eğitim-Oran Denemeleri;
  - d) Kuantal Yanıt Denemeleri;

şeklinde sınıflandırılmaktadır.<sup>2</sup> Her bir biyolojik deneme türünde tamamının uygulanması gerekli olmamasına rağmen bir biyolojik denemenin sonuçlarının güvenilir olabilmesi için ihtiyaç duyulan koşullar;

- a) Deneme, özdeş bir standart ile bilinmeyen arasında doğrudan karşılaştırma içermelidir,
- b) Doz ile yanıt arasında anlamlı bir kademeli ilişki olmalıdır,
- c) İki ürüne ait doz miktarları ile yanıtlara ait regresyon doğruları paralel olmalıdır,
- d) İstatistiksel analizin geçerliliği ve testin uygunluğu için verinin homojenliği kanıtlanmalıdır,
- e) Analiz, veriden doğrudan hesaplanmış deneme hatasının tahminini içermelidir, şeklinde sıralanmaktadır.<sup>2</sup>

Bir uyarıcının etkinliğini ifade etmek amacıyla başlangıçta “minimum etkin doz” veya “minimum öldürücü doz” terimleri kullanılmış, ancak Trevan tarafından, ortalama tolerans değerini ifade eden ve uygulanan doz miktarının, uygulandığı birimlerin yarısını etkileyen doz olarak belirtilen “medyan öldürücü doz” ifadesinin kullanılmasının daha uygun olacağı öne sürülmüştür.<sup>3</sup> Belirlenmesi ve

yorumlanması oldukça kolay olan “medyan öldürücü doz” literatürde “Lethal Consantration” kelimelerinin ilk harfleri kullanılarak LC<sub>50</sub> veya “Lethal Dose” kelimelerinin ilk harfleri kullanılarak LD<sub>50</sub> sembolleri ile gösterilmektedir.

Doz-cevap çalışmalarında temel amaç, doz-cevap ilişkilerini belirlemek veya minimal etkili dozu bulmaktır. Özellikle ilaç geliştirme ile ilgili olmakla birlikte tedavi amaçla kullanılan vitamin, hormon vb. şeyler ile ilgili çalışmalarda uygun dozun belirlenmesi gerekmektedir. Çünkü bunların düşük dozda olmaları etkisiz olmalarına, yüksek dozda olmaları ise kabul edilemez sağlık sorunlarına neden olmaktadır.

Özellikle farmakoloji ve toksikolojide bir ilaca ait doz-yanıt ilişkisi önem taşımaktadır. Gerek farmakolojide gerekse toksikolojide güvenlik ve etkinlik için doz-yanıt profillerinin doğru tahmin edilmesi, Faz II denemeleri sonunda bir ilacın risk-yarar profilinin güvenilir değerlendirilmesine ve Faz III denemelerinde de uygun dozun seçilmesinin teyit edilmesini sağlamaktadır.

Biyolojik denemeler sonucunda elde edilen yanıtlar, nitel (var-yok, ölü-sağ vb.) veya nicel olarak ifade edilebilmektedir. Gerek nitel gerekse nicel verilerden yararlanarak değeri istatistiksel yöntemler kullanılarak tahmin edilebilmektedir. Bu çalışmanın amacı, nitel veriler için geliştirilmiş yöntemleri tanıtmak ve literatürden elde edilen bilgilerden yararlanarak yöntemleri birbirleri ile karşılaştırmaktır.

Deneme sonucunun nitel olarak ifade edildiği iki sonuçlu durumlar literatürde, kuantal denemeler olarak isimlendirilmektedir. Kuantal denemelerde istatistiksel yöntemler kullanılarak LD<sub>50</sub> değerinin tahmin edilebilmesi için verilerin;

Doz Miktarı	log doz (x <sub>i</sub> )	Toplam Birey Sayısı (n <sub>i</sub> )	Etkilenen Birey Sayısı (r <sub>i</sub> )
X <sub>1</sub>	x <sub>1</sub>	n <sub>1</sub>	r <sub>1</sub>
X <sub>2</sub>	x <sub>2</sub>	n <sub>2</sub>	r <sub>2</sub>
X <sub>3</sub>	x <sub>3</sub>	n <sub>3</sub>	r <sub>3</sub>
X <sub>4</sub>	x <sub>4</sub>	n <sub>4</sub>	r <sub>4</sub>
...	...	...	...
...	...	...	...
...	...	...	...
X <sub>k</sub>	x <sub>k</sub>	n <sub>k</sub>	r <sub>k</sub>

şeklinde düzenlenmesi gerekmektedir.<sup>4</sup> Kuantal denemelerde LD<sub>50</sub> değerinin tahmin edilmesi ile ilgili literatürde yaygın olarak kullanılan yöntemler aşağıda anlatılmıştır.

### GRAFİK YÖNTEMİ

**Adım 1.** Her bir doz seviyesi için p<sub>i</sub> değerleri hesaplanır.

$$p_i = \frac{r_i}{n_i} \quad (i = 1, 2, \dots, k)$$

**Adım 2.** X ekseninde p<sub>i</sub> değerleri Y ekseninde de logaritmik doz değerleri kullanılarak grafik çizilir. Grafik üzerinde p<sub>i</sub>=0.50 değerine karşılık gelen logaritmik doz değerinden yararlanarak LD<sub>50</sub>=10<sup>log doz</sup> olarak belirlenir.

### İTERPOLASYON YÖNTEMİ

**Adım 1.** Her bir doz seviyesi için p<sub>i</sub> değerleri hesaplanır.

$$p_i = \frac{r_i}{n_i} \quad (i = 1, 2, \dots, k)$$

**Adım 2.** p<sub>i</sub> değerlerine bakılır. Eğer p<sub>i</sub>=0.50 değeri var ise bu değere karşılık gelen log (x<sub>i</sub>) değerinden yararlanarak LD<sub>50</sub>=10<sup>log(x<sub>i</sub>)</sup> olarak belirlenir. Eğer p<sub>i</sub> değerlerinin içinde p<sub>i</sub>=0.50 değeri yok ise max i (p<sub>i</sub> < 0.50 < p<sub>i+1</sub>) koşulunu sağlayan p<sub>i</sub>, p<sub>i+1</sub>, log (x<sub>i</sub>) ve log (x<sub>i+1</sub>) değerlerinden yararlanarak,

$$\frac{m - \log(x_i)}{\log(x_{i+1}) - \log(x_i)} = \frac{0.50 - p_i}{p_{i+1} - p_i}$$

eşitliği kullanılarak m değeri elde edilir. LD<sub>50</sub>=10<sup>m</sup> olarak belirlenir.

### PROBİT ANALİZİ<sup>1,5,9</sup>

Çalışmalarda genellikle nicel yanıtlar tercih edilmesine rağmen pratikte bu her zaman mümkün olmamaktadır. Probit analiz kantil (binomial) yanıt değerleri (Y) ile doz miktarları (X) arasındaki ilişkinin analiz edilmesinde bugün bile halen kullanılması tercih edilen özel bir regresyon modelidir. Probit model, yanıt yüzdesi ile logaritmik doz arasında kümülatif normal dağılıma sahip bir ilişki olduğunu varsaymaktadır ve matematiksel olarak;

$$P = \alpha + \beta[\log_{10}(\text{doz})]$$

şeklinde ifade edilmektedir. Probit Y değeri ise;

$$P = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{Y-5} e^{-\frac{1}{2}u^2} du$$

ile hesaplanmaktadır. P=0.50 değerine karşılık gelen Y değeri LD<sub>50</sub> değerinin tahminidir.

### LOGİT ANALİZİ<sup>1,5,9</sup>

Logit, binomial veriyi doğrusal hale dönüştüren ve Probit'e çok benzeyen bir başka yöntemdir. Logit terimi 1944 yılında Berkson tarafından literatüre kazandırılmıştır. Lojistik eğriyi veren fonksiyon;

$$y = \frac{1}{1 + e^{-(\alpha + \beta x)}} \text{ 'dir.}$$

Logit(y) değeri ise;

$$\text{logit}(y) = \ln \frac{y}{1 - y} = \alpha + \beta x$$

biçiminde ifade edilmektedir. Logit ve Probit arasındaki ilişki neredeyse ayırt edilemez durumdur. Probit değerden yararlanarak Logit değer;

$$\text{Logit} \cong \frac{\pi}{\sqrt{3}} * \text{Probit}$$

formülü kullanılarak elde edilebilir.  $\mu = -\alpha/\beta$  değeri LD<sub>50</sub> değerinin tahminidir.

### DRAGSTEDT-BEHRENS YÖNTEMİ<sup>4,6,10,11</sup>

**Adım 1.** Her bir doz seviyesi için p<sub>i</sub>\* değerleri hesaplanır.

$$p_i^* = \frac{\sum_{i=1}^s r_i}{\sum_{i=1}^s r_i + \sum_{i=s+1}^k (n_i - r_i)} \quad (s = 1, 2, \dots, k)$$

**Adım 2.** p<sub>i</sub>\* değerlerine bakılır. Eğer p<sub>i</sub>\*=0.50 var ise LD<sub>50</sub>=10<sup>log(x<sub>i</sub>)</sup> dir. Eğer p<sub>i</sub>\*=0.50 yok ise p<sub>i</sub>\* değerleri içerisinde (p<sub>i</sub><0.50) olan en büyük p<sub>i</sub> değeri ve bu değere karşılık gelen doz miktarı dikkate alınarak LD<sub>50</sub> değeri aşağıda verilen formül yardımıyla hesaplanır.

$$LD_{50} = \log(x_i) + \frac{(\log(x_{i+1}) - \log(x_i))(0.5 - p(x_i))}{p(x_{i+1}) - p(x_i)}$$

### KÄRBER YÖNTEMİ<sup>12,13</sup>

Her bir doz miktarının eşit sayıda bireyde denendiği ve tüm bireyleri etkileyen en düşük doz mik-

tarının bilindiği durumlarda kullanılmaktadır. Yönteme göre LD<sub>50</sub> değeri,

$$LD_{50} = D_m - \frac{\sum z * d}{m}$$

D<sub>m</sub>: Tüm bireyleri etkileyen en düşük doz miktarı

$z = \frac{r_i + r_{i+1}}{2}$ : Dozlar arası ortalama etkilenen birey sayısı

d: Birbirini ardışık takip eden dozlar arası fark

eşitliği kullanılarak tahmin edilmektedir.

#### SPEARMAN-KÄRBER YÖNTEMİ<sup>4,6,9,14-16</sup>

**Adım 1.** Her bir doz seviyesi için p<sub>i</sub> değerleri hesaplanır.

$$p_i = \frac{r_i}{n_i} \quad (i = 1, 2, \dots, k)$$

**Adım 2.** LD<sub>50</sub> değeri aşağıda verilen formül yardımıyla hesaplanır.

$$m = \sum_{i=1}^{k-1} \frac{(p_{i+1} - p_i)[\log(x_i) + \log(x_{i+1})]}{2}$$

$$LD_{50} = 10^m$$

#### TRIMMED SPEARMAN-KÄRBER YÖNTEMİ<sup>17</sup>

**Adım 1.** Her bir doz seviyesi için p<sub>i</sub> değerleri hesaplanır.

$$p_i = \frac{r_i}{n_i} \quad (i = 1, 2, \dots, k)$$

**Adım 2.** Ardışık olarak birbirini takip eden tüm p<sub>i</sub> değerleri arasında p<sub>i+1</sub> ≥ p<sub>i</sub> koşulunun sağlanıp sağlanmadığına bakılır. Eğer koşul sağlanmıyorsa,

$$p_i = \frac{r_i + r_{i+1}}{n_i + n_{i+1}}$$

eşitliği kullanılarak p<sub>i+1</sub> ≥ p<sub>i</sub> olması sağlanır. Tüm p<sub>i</sub> değerleri için p<sub>i+1</sub> ≥ p<sub>i</sub> koşulu sağlandığında üçüncü adıma geçilir.

**Adım 3.** Denemede göz ardı edilmesi istenen uç değerlerin yüzdesine (α) karar verilir. 0 ≤ α ≤ 50 aralığından seçilecek olan α değeri, p<sub>i</sub> değerlerinin dağılımının her iki ucundan göz ardı edilecek uç değerlerin yüzdesini göstermektedir. Araştırmacı tarafından belirlenecek olan α değerinden yararlanarak  $\hat{p}_i$  değerleri,

$$\hat{p}_i = (p_i - \frac{\alpha}{100}) / (1 - \frac{2\alpha}{100})$$

eşitliği kullanılarak hesaplanır. Sıfırdan küçük değerler için sıfır, 1'den büyük değerler için de 1 değeri alınır.

**Adım 4.**  $\hat{p}_i$  değerlerinden yararlanarak göreceli sıklık değerleri hesaplanır. Göreceli sıklık değerlerinin toplamı 1'e eşit olmak zorundadır.

$$\text{Göreceli Sıklık} = (\hat{p}_i - \hat{p}_{i-1})$$

**Adım 5.** Birbirini ardışık takip eden lndoz değerleri için  $\frac{\text{lndoz}_{i-1} + \text{lndoz}_i}{2}$  formülü kullanılarak birbirini ardışık takip eden değerlere ait orta noktalar bulunur.

**Adım 6.** m değeri hesaplanır.

$$m = \sum_{i=1}^{k-1} (\hat{p}_i - \hat{p}_{i-1}) * \text{Orta Nokta}_i$$

**Adım 7.** LD<sub>50</sub> değeri hesaplanır.

$$LD_{50} = e^m$$

#### MILLER-TAINTER YÖNTEMİ<sup>18,19</sup>

Yöntemin uygulanabilmesi için her bir doz miktarının eşit sayıda bireye uygulanması gerekir. X ekseninde logaritmik doz değerleri Y ekseninde de  $P_i = \frac{r_i}{n_i}$  değerlerine karşılık gelen Probit değerleri kullanılarak grafik çizilir. Grafik üzerinde Probit = 5 değerine karşılık gelen logaritmik doz değerinden yararlanarak LD<sub>50</sub> = 10<sup>log doz</sup> olarak belirlenir. p<sub>i</sub> değerlerine karşılık Probit değerleri için Tablo 1'de verilen değerlerden yararlanılmaktadır.<sup>19</sup>

Düzeltilmiş % p<sub>i</sub> değerlerinin hesaplanmasında, ölüm oranı % 0 için 100 \* (0.25/n), ölüm oranı % 100 için 100 \* (n - 0.25) / n, formülleri kullanılmaktadır.

#### REED-MUENCH YÖNTEMİ<sup>4,6,13,18,20</sup>

**Adım 1.** Her bir doz seviyesi için j: 1 ≤ j ≤ k olmak üzere  $\sum_{i=1}^j r_i$  ve  $\sum_{i=j+1}^k (n_i - r_i)$  değerleri hesaplanır.

**Adım 2.** Aşağıda verilen formülden yararlanarak s değeri belirlenir.

$$s = \max \left[ j: 1 \leq j \leq k \text{ ve } \sum_{i=1}^j r_i \leq \sum_{i=j+1}^k (n_i - r_i) \right]$$

**TABLO 1:** Ölüm Oranları-Probit Değer Dönüşüm Tablosu.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33

**Adım 3.** Orijinal doz miktarları kullanılarak LD<sub>50</sub> değeri, h birbirini ardışık takip eden doz değerleri arasındaki farkı göstermek üzere,

$$LD_{50} = x_k - h(k - s)$$

formülü yardımıyla tahmin edilebilmektedir.

#### THOMPSON HAREKETLİ ORTALAMA YÖNTEMİ<sup>4,9,13,21,22</sup>

**Adım 1.** Her bir doz seviyesi için  $p_i^*$  değerleri hesaplanır.

$$\frac{1}{\bar{n}_i} = \frac{1}{2} \left( \frac{1}{n_{i-1}} + \frac{1}{n_{i+1}} \right) \quad i = 2, 3, \dots, k-1$$

olmak üzere,

$$p_i^* = \frac{p_{i-1} + \frac{n_i}{\bar{n}_i} p_i + p_{i+1}}{\left( 2 + \frac{n_i}{\bar{n}_i} \right)}$$

**Adım 2.**  $p_i^*$  değerlerinin 0.50 değerini de içerecek şekilde monoton olarak artıp artmadığına bakılır.  $p_i^*$  değerleri monoton olarak artmıyorsa yöntem kullanılmaz. Artıyor ise,

$$\frac{1}{\bar{n}_i} = \frac{1}{2} \left( \frac{1}{n_{i-1}} + \frac{1}{n_{i+1}} \right) \quad i = 2, 3, \dots, k-1$$

$$\log(x_i^*) = \frac{\log(x_{i-1}) + \frac{n_i}{\bar{n}_i} \log(x_i) + \log(x_{i+1}))}{\left( 2 + \frac{n_i}{\bar{n}_i} \right)}$$

değerleri hesaplanır.

**Adım 3.**  $p_i^*$  değerlerine bakılır. Eğer  $p_i^* = 0.50$  var ise  $LD_{50} = 10^{\log(x_i^*)}$  dir. Eğer  $p_i^* = 0.50$  yok ise  $LD_{50}$

değeri  $p_i^* < 0.50 < p_{i+1}^*$  değerleri kullanılarak aşağıda verilen formül yardımıyla hesaplanır.

$$m = \log(x_i^*) + \frac{(0.5 - p_i^*)}{(p_{i+1}^* - p_i^*)} [\log(x_{i+1}^*) - \log(x_i^*)]$$

$$LD_{50} = 10^m$$

Orijinal doz miktarları kullanılarak LD<sub>50</sub> değeri,  $p_i^* < 0.50 < p_{i+1}^*$  ve h birbirini ardışık takip eden doz değerleri arasındaki farkı göstermek üzere,

$$LD_{50} = x_1 + (i - 1)h + \frac{(0.5 - p_i)}{(p_{i+1} - p_i)} h$$

formülü yardımıyla tahmin edilebilmektedir

#### SHUSTER-DIETRICH YÖNTEMİ<sup>4,23</sup>

**Adım 1.** Her bir doz seviyesi için aşağıda verilen değerler hesaplanır.

$$n = \sum_{i=1}^k n_i$$

$$Y_i = \left( \frac{n_i}{n} \right)^{1/2} \log(x_i)$$

$$\bar{Y} = \sum \left( \frac{n_i}{n} \right)^{1/2} Y_i = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^k n_i \log(x_i)$$

$$Z_i = \left( \frac{n_i}{n} \right)^{1/2} \sin^{-1}(p_i^{1/2}) \frac{180}{\pi}$$

$$\bar{Z} = \sum_{i=1}^k Z_i \left( \frac{n_i}{n} \right)^{1/2}$$

$$S_{YZ} = \sum_{i=1}^k Y_i Z_i - \bar{Y} \bar{Z}$$

$$S_{ZZ} = \sum_{i=1}^k Z_i^2 - \bar{Z}^2$$

$$b = \frac{S_{YZ}}{S_{ZZ}}$$

**Adım 2.** LD<sub>50</sub> değeri aşağıda verilen formül yardımıyla hesaplanır.

$$m = \bar{Y} - b(\bar{Z} - 45)$$

$$LD_{50} = 10^m$$

**SHUSTER-YANG YÖNTEMİ<sup>4,24</sup>**

**Adım 1.** Her bir doz seviyesi için  $p_i = r_i / n_i$ ,  $A_i = r_i - 0.50 * n_i$  ve  $S_i = \sum_{u=0}^i A_u$  değerleri hesaplanır.

**Adım 2.**  $S_{s-1} = \min(S_1, S_2, \dots, S_k)$  ilk tamsayı  $s$  değerinden yararlanarak LD<sub>50</sub> değeri aşağıda verilen formül yardımıyla hesaplanır.

$$LD_{50} = x_s + (x_{s+1} - x_s) \frac{(0.5 - p_s)}{(p_{s+1} - p_s)}$$

**ROBBINS-MONRO YÖNTEMİ<sup>25-28</sup>**

Yöntem, yanıt eğrisine ait herhangi bir yüzdelik değerin tahmin edilmesinde tahmin edilmek istenilen yüzdelik değere yakınsayan bir noktalar dizisi oluşturmaktadır. Yönteme göre amaç,  $y(x)$  yanıt fonksiyonu ve  $F(\theta) = p$ ,  $0 < p < 1$  koşulunu sağlayan  $F(x)$  bilinmeyen dağılım fonksiyonu olmak üzere  $p$  olasılık değerine sahip,  $\theta$ 'nın değerini tahmin etmektir. Bu durum  $\theta$ 'ya yakınsayan bir dizi  $x_i$  değerinin yaratılması ile gerçekleştirilmektedir. Robbins-Monro yöntemine göre bu durum,

$$x_{i+1} = x_i + a_i(p - y(x_i))$$

eşitliği ile ifade edilmektedir. Eşitlikte yer alan  $a_i$ 'nin değeri,  $i$  adım sayısını göstermek üzere  $a_i = 1/i$  olan ardışık sabit değerlerden oluşmaktadır. Adım sayısının yeterli büyüklüğe ulaşması durumunda Robbins-Monro tarafından  $\lim_{i \rightarrow \infty} x_i = \theta$  olduğu ispatlandı için  $x_{i+1}$  değeri  $\theta$ 'nın tahmini olarak kullanılabilir. Yöntemin etkinliğinin adım sayısı,  $x_1$  ve  $a_i$  değerleri ile  $F(x)$  fonksiyonunun seçimine bağlı olduğu açık bir şekilde görülmektedir.

LD<sub>50</sub> değerinin tahmin edilmesinde Robbins-Monro yönteminden yararlanılmaktadır.  $x_1$  değeri başlangıç doz miktarını,  $n_1$  başlangıç doz miktarının denendiği birey sayısını,  $k_1$  başlangıç doz miktarının denenmesi durumunda etkilenen birey sayısını göstermek üzere  $p_1 = k_1/n_1$  etkilenme oranından yararlanarak ikinci adımda test edilecek doz miktarı,

$$x_2 = x_1 - a_1(p_1 - 0.5)$$

eşitliği kullanılarak elde edilmektedir. Bu durum ardışık olarak sürdürülecek olursa  $i + 1$  nci adımdaki test edilecek doz miktarını belirlemek için,

$$x_{i+1} = x_i - a_i(p_i - 0.5)$$

eşitliği kullanılmalıdır. Eğer adım sayısı yeteri kadar büyükse  $i + 1$  nci adım için eşitlikten elde edilecek doz miktarı, LD<sub>50</sub> değerinin tahmini olacaktır. Doz miktarlarına ait dağılıma göre uygun  $a_i$ 'lerin,

Normal Dağılım için;

$$a_i = \frac{\sqrt{2\pi} * \sigma}{i} = \frac{2.506 * \sigma}{i}$$

Lojistik Dağılım için,

$$a_i = \frac{4\sqrt{3} * \sigma}{\pi * i} = \frac{2.205 * \sigma}{i}$$

eşitlikleri kullanılarak belirlenmesi gerektiği ifade edilmektedir.<sup>26</sup> Formüllerde yer alan  $\sigma$  değeri, ilgili dağılıma ait standart sapma değerini göstermektedir.

**YUKARI-VE-AŞAĞI (UP-AND-DOWN) YÖNTEMİ<sup>29</sup>**

Yöntem, test maddesinin ardışık dozlarının her defasında tek bir bireye uygulanması esasına dayanmaktadır. İlk doz miktarının uygulanmasından sonra elde edilen sonuca göre sonraki adımda uygulanacak doz miktarına karar verilmektedir. Eğer önce uygulanan doz miktarı etkili olmuş ise sonraki aşamada uygulanacak doz miktarı bir öncekine göre daha düşük, etkili olmamış ise daha yüksek olarak belirlenmektedir. LD<sub>50</sub> değeri aşağıda verilen formül yardımıyla hesaplanır.

$$m = X_f + k * d$$

$X_f$ : Çalışmada kullanılan son doz miktarının logaritmik değeri

$k$ : Dixon tablo değeri

$d$ : Logaritmik doz değerleri arası fark

$$LD_{50} = 10^m$$

**LORKE YÖNTEMİ<sup>30</sup>**

Yönteme göre etkili olmayan en yüksek doz miktarı ( $D_0$ ) ile etkili olan en düşük doz miktarı ( $D_{100}$ ) belirlenir. Belirlenen bu doz miktarlarının geometrik ortalaması LD<sub>50</sub> değerinin tahminidir. Yönteme göre LD<sub>50</sub> değeri,

$$LD_{50} = \sqrt{D_0 * D_{100}}$$

formülü kullanılarak hesaplanmaktadır.

## SONUÇLAR

Grafiksel ve yarı grafiksel yöntemler, basitlikleri ve hızlı sonuç vermelerine rağmen bu yöntemlerden elde edilen sonuçların sayısal yöntemlerden elde edilen sonuçlara göre daha az gerçekçi olmalarından dolayı ancak son çare olarak tercih edilmeleri gerekmektedir.

Probit analizi normal dağılım, Logit analizi ise lojistik dağılım varsayımı üzerine kurulu yöntemlerdir. Az sayıda gözlem ve 3-4 farklı doz miktarı içeren denemelerde bu varsayımlar sağlanmamakta dolayısıyla da elde edilen tahmin değerleri güvenilir olmamaktadır.

Lojistik dağılım eğrisi normal dağılım eğrisine göre daha gerçekçi varsayımları sağlamaktadır. Bağımsız değişken değerleri içerisinde uç değer olması durumunda Logit, Probit'e göre daha iyi uyum göstermektedir.

Probit ve Lojit analizleri için geçerli olan sorunlar Trimmed Spearman-Kärber yöntemi için söz konusu değildir. Ancak Trimmed Spearman-Kärber yönteminden elde edilen LD<sub>50</sub> değeri üzerinde, göz ardı edilmesi istenen uç değerler yüzdesi ( $\alpha$ ) etkili olmaktadır.

Açısal dönüşüm içeren Shuster-Dietrich Yöntemi, diğer eğri uydurma yöntemleri gibi sağlam bir temel üzerine kurulmamıştır. Dolayısıyla Shuster-Dietrich Yönteminden elde edilen gerek nokta tahmin değerleri gerekse güven aralıklarına ait alt ve üst sınır değerleri diğer yöntemlerden elde edilenlere göre daha küçüktür.

Spearman-Kärber ve Reed-Muench yöntemlerinde doz değerlerinin dağılımı ile ilgili herhangi varsayım bulunmamaktadır. Yapılacak çalışmalarda kullanılacak logaritmik doz değerlerinin gerçek LD<sub>50</sub> değeri etrafında simetrik dağılmaması durumunda bu yöntemlerden elde edilecek tahmini LD<sub>50</sub> değerleri yanlı olmaktadır. Ancak, doz değerlerinin lojistik dağılıma sahip olması, her bir doz seviyesi denemesinde eşit sayıda birey kullanılması, doz aralıklarının eşit belirlenmesi ve çalışmadan elde edilen sonuçların %0-100 içermesi durumunda bu yöntemlerden elde edilecek tah-

minler, en çok olabilirlik tahminlerine yakınsamaktadır.

Spearman-Kärber ve Reed-Muench yöntemlerinden elde edilen sonuçlar birbirine yakın olmasına rağmen, gözlem sayısının az olduğu durumlarda Spearman-Kärber yönteminden elde edilen sonuçlar Reed-Muench yönteminden elde edilen sonuçlara göre daha güveniliridir.

Thompson Hareketli Ortalama Yöntemi, uygulama açısından Spearman-Kärber ve Reed-Muench yöntemlerine göre daha kolay olmasına rağmen elde edilen sonuçlar bakımından bu yöntemlere göre kayda değer ölçüde daha iyi sonuçlara sahip değildir.

Miller-Tainter Yöntemi gerek elde edilen sonuçların doğru olmaması gerekse yöntemin uygulanması için gereğinden fazla sayıda bireye ihtiyaç duyması ve maliyetin yüksek olmasından dolayı diğer yöntemlere göre daha az tercih edilen bir yöntemdir.

LD<sub>50</sub> değerinin tahmin edilmesinde yararlanılan yöntemlerin tamamında (Robbins-Monro yöntemi hariç) test edilecek doz düzeyleri önceden belirlenmektedir. Yukarı-ve-Aşağı Yönteminde ise yöntemin işleyiş mantığından dolayı, doz düzeyleri otomatik olarak LD<sub>50</sub> değerine doğru yönlendirilmektedir. Bu durum LD<sub>50</sub> değerinin tahminindeki doğruluk oranını artırmakta ve yöntemin diğer yöntemlere göre avantajlı olmasını sağlamaktadır. Ancak başlangıç için belirlenen doz düzeyinin seçimi yöntemdeki test sayısını etkilemektedir.

Robbins-Monro yönteminin etkinliği adım sayısı, başlangıç doz miktarı ve  $a_1$  değerleri ile  $F(x)$  fonksiyonunun seçimine bağlıdır. Üstelik yöntem için geliştirilmiş herhangi bir durdurma kuralı bulunmamaktadır. Yöntemin en önemli avantajı ise az sayıda bireyden yararlanarak kısa sürede sonuca ulaşılmasını sağlamasıdır.

Lorke yöntemi kullanılarak, 13 deney hayvanı ile akut toksisite ve LD<sub>50</sub> hakkında yeterli bilgi elde etmek mümkündür. Bu yöntemde herhangi bir sınırlama bulunmamaktadır ve yöntem her türlü ilaç, tarımsal ve endüstriyel kimyasallar için kullanılabilir.

## KAYNAKLAR

1. Finney DJ. Quantal Responses and the Dosage-Response Curve Probit Analysis. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1947. p.8-47.
2. Batson HC. Bioassay: The quantal response assay. Proceedings of the Eighth Conference on the Design of Experiments in Army Research Development and Testing. Defense Technical Information Center Compilation Part Notice ADP014630 1962;551-76.
3. Trevan JW. The error of determination of toxicity. Proceedings of the Royal Society B 1927;101(712):483-514.
4. Zhou T. Chapter 2-Methods of Estimating LC50. Numerical Comparisons of Bioassay Methods in Estimating LC50. Manhattan, Kansas: Kansas State University; 2010. p.5-30.
5. Özdamar K. [Using probit and logit analysis in bioassay]. n'den N'ye Gezinti İstatistik Dergisi 2012;2(8):12-7.
6. Govindarajulu Z. The Angular Response Curve and Other Topics Statistical Techniques in Bioassay. 2<sup>nd</sup> ed. Basel, Switz: Karger; 2000. p.113-53.
7. Berkson J. Why I prefer logits to probits. Biometrics 1951;7(4):327-39.
8. Tamhane AC. A survey of literature on estimation methods for quantal response curves with a view toward applying them to the problem of selecting the curve with the smallest q-quantile (ED100q). Technical Report No: 614. Ithaca, New York: Cornell University; 1983. p.13-6.
9. Hoekstra JA. Estimation of the LC50. A Review. Environmetrics 1991;2(2):139-52.
10. Dragstedt CA, Land VF. Respiratory stimulants in acute cocaine poisoning in rabbits. J Pharmacol Exp Ther 1928;32(3):215-22.
11. Behrens B, Heubner W, Koll W, Külz F. Über auswertung von follikelhormon-präparaten. Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie 1937;186(2-5):121-60.
12. Kärber G. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie 1931;162(4):480-6.
13. Armitage P, Allen I. Methods of estimating the LD50 in quantal response data. J Hyg 1950;48(3):298-322.
14. Miller RG, Halpern JW. Robust estimators for quantal bioassay. Technical Report No: 42. Stanford, California: Stanford University; 1979. p.16-7.
15. Carter A. Using the Spearman-Kärber method to estimate the ED50. Dallas-USA: SAS Conference Proceedings; 1994, p.1120-5.
16. Spearman C. The method of "right and wrong" cases (constant stimuli) without Gauss's formulas. Br J Psychol 1908;2(3):227-42.
17. Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ Sci Technol 1977;11(7):714-9.
18. Miller LC, Tainter ML. Estimation of LD50 and its error by means of log-probit graph paper. Proc Soc Exp Biol Med 1944;57:261-4.
19. Randhawa MA. Calculation of LD50 values from the method of Miller and Tainter 1944. J Ayub Med Coll Abbottabad 2009;21(3):184-5.
20. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am J Hyg 1938;27(3):493-7.
21. Thompson WR. Use of moving averages and interpolation to estimate median effective dose. Bacteriol Review 1947;11(2):115-45.
22. Bennett BM. Estimation of LD50 by moving averages. J Hyg 1952;50(2):157-64.
23. Shuster JJ, Dietrich FH. Quantal response assays by inverse regression. Communication in Statistics-Theory and Methods 1976;5(4):293-305.
24. Shuster JJ, Yang MCK. A distribution-free approach to quantal response assays. Can J Stat 1975;3(1):57-70.
25. Robbins H, Monro S. A stochastic approximation method. Ann Math Stat 1951;22(3):400-7.
26. Cochran WG, Davis M. The Robbins-Monro method for estimating the median lethal dose. Journal of the Royal Statistical Society series B (Methodological) 1965;27(1):28-44.
27. Hawkins DF. Observations on the application of the Robbins-Monro process to sequential toxicity assays. Br J Pharmacol 1964;22(2):392-402.
28. Mugno R, Zhu W, Rosenberger, WF. Comparison of adaptive designs for estimating several percentiles of a dose-response curve. Proceedings of the Annual Meeting of the American Statistical Association 2001;1-7.
29. Dixon WJ. The Up-and-Down method for small samples. Journal of the American Statistical Association (JASA) 1965;60(312):967-78.
30. Lorke D. A new approach to practical acute toxicity testing. Arch Toxicol 1983;54(4):275-87.