

## **DİJİTAL PREPARASYONLARININ BİYOLOJİK TİTRAJINDAN ELDE EDİLEN NETİCELERİN STATİSTİK METODLARLA DEĞERLENDİRİLMESİ**

**M. Şahin Akman\***

**Kemal Ozan\*\***

### **Giriş**

Dijital yapraklarının tuttuğu glikozit miktarı, bitkinin yetiştiği toprağın tabiatına, deniz seviyesinden yüksekliğine, yaprakların toplanma zamanı ve saklanma şekline göre çok değişik olur. Normal koşullarda, bitkinin yapraklarında % 0,40 civarında etken madde bulunması gerekirken, % 0,02'den % 0,60'a kadar değişik nispetlerde glikozid tutan yapraklara raslanır (1,2,4,5,6,7).

Kimyasal metotlar yetersiz olduğundan, dijital preparasyonlarının titraji için, uluslar arası standart bir etalon'a\*\*\* göre bir eşantyonun aktivitesini tayin etme esasına dayanan çeşitli biyolojik titraj metotları kullanılır (7,8). Böylece ilâç kitaplarında da işaret edildiği gibi dijitalin biyolojik titraji kurbağa, köpek, kedi, kobay, güvercin gibi çeşitli hayvanlar üzerinde yapılır (1,2). Bütün bu metotlarla hazırlanacak etalon'ların, standart dijital tozuna göre % 100 ± 10 nispetinde bir aktiviteye malik olması gerekir (7).

Dijital preparasyonlarında aktivite tayini için ileri sürülen çeşitli biyolojik titrajlardan (Fransız Farmakope'sinin (8) kabul ettiği gibi) tercihan kobaylarda en küçük öldürücü dozu tespit etme esasına

\* A.Ü. Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Kürsüsü Profesörü. Ankara - Türkiye.

\*\* A.Ü. Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Kürsüsü Dr. Asistanı. Ankara - Türkiye.

\*\*\* Etalon, Londra Tıbbi Araştırmalar Enstitüsünce verilen gramında 11,1 kedi, 2200 ile 2350 kurbağa, 5,05 köpek ünitesi tutan dijital yaprağı tozudur. Laboratoire National de la Santé Publique (Fransa)'de ampuller içinde, uluslararası Ünite ile işaretlenmiş etalon dijital tozu vermektedir.

dayanan, Knafel-Lenz (7) metodu ile elde edilen neticelerin statistik hesaplarla değerlendirilmesini inceleyeceğiz. Çünkü kobay; kedi ve köpeklere nazaran daha kolayca temin edilebilen ve daha az ferdi varyasyon gösteren bir laboratuvar hayvanıdır. Kurbağa Ünitesine dayanan titraj metodu da, kurbağaların nev'i ve ağırlığa, mevsim ve muhit ısısına göre çok fazla ferdi farklılık göstermeleri sebebiyle, birbirinden çok farklı neticeler verdiği için statistik hesaplar için elverişli değildir. Şu halde statistik metotlarla çalışıldığında, en uygun teknik, kobaylar üzerinde yapılan biyolojik titraj metotudur.

### Materyal ve Metot

Kullanılacak metot, aşağıda izah edileceği şekilde hazırlanmış bir dijital yaprağı tozu solüsyonunun, yavaş intra-venöz enjeksiyonla uyutulmuş kobaya, kalbi durdurana kadar verilmesinden ibarettir.

*Şırıngalık solüsyonun hazırlanması:* 250 ml. lik konik bir şişeye, 1 g. denenecek dijital yaprağı tozundan konur. Toz iyice ıslanacak şekilde, 100 ml. destile su azar azar ve çalkalanarak ilâve edilir. Bu şişe, bir bain-marie'nin 1 lt soğuk su ihtiva eden küvetine batırılır. Isı 90° yükselene kadar banyo tedrici olarak ısıtılır. Şişe banyodan çıkarılır. 10 dakika bekletildikten sonra, 0,90 g NaCl ilâve edilir ve 5 dakika dinlendirilir. Bu eriyik bir başka şişeye süzülerek alınır. Hacim destile su ile yüze ulaştırılır. Bu şekilde hazırlanmış solüsyon hemen kullanılmalıdır.

*Hayvanların hazırlanması:* Her solüsyonun denenmesi için, tercihan erkek ve ortalama 300 g. ağırlıkta 10 kobay kullanılır. Kobaylar, serom fizyolojikte hazırlanmış, % 50'lik, ılık éthyluréthane'dan 2 ml/kg periton içi şırınga edilerek uyutulurlar. Küçük bir tespit tablosuna sırt üstü yatırılarak, bağlanırlar. Vena jugularis dışarı alınarak, içine kalp istikâmetine doğru yöneltilmiş bir kanül sokulur ve tespit edilir. Hayvanların sun'i tenefüs altında bulundurulması lüzumlu değildir.

*Enjeksiyon tekniği:* Yavaş enjeksiyon, otomatik bir devamlı perfüzyon aleti yardımı ile yapılır. Alet şırınga edilen hacmin 15 dakika civarında kalbi durdurabilmesini (aşağı yukarı dakikada 1 ml.lik bir enjeksiyon hızı) mümkün kılacaktır şekilde ayarlanır. Enjeksiyonun başlangıcında kalp atımları gözle veya kalp bölgesinin palpasyonu ile kontrol edilir. Kalp atımları intizamsızlaştığında, sol karıncığa kadar ulaşacak şekilde iki kaburga arasından bir toplu iğne batırılır. İğnenin hareketleri gözlenir ve iğnenin 10 saniyeden fazla bir müddet

hareketsiz kalması kalbin durması olarak kabul edilir. Bu anda, şırınga edilmiş solüsyonun hacmi not edilir. Neticeler, bir kobayı öldürmek için, her kilogram canlı ağırlık için lüzumlu, mg. dijital yaprağı tozu miktarı olarak hesaplanır.

*Tecrübe planı* : Kobaylar rast gele olarak onar hayvanlık iki guruba ayrılır. Bu iki guruptan birine, aktivitesi uluslararası üniteye göre ayarlı ve işaretli etalon, diğerine ise aktivitesi bilinmeyen, titrağı yapılacak olan eşantiyon yukarıda izah edildiği şekilde hazırlanıp şırınga edilir.

### Sonuç

Tablo 1, yukarıda verilen metota göre yapılmış bir dijital titrajından elde edilen neticeleri göstermektedir (9).

**Tablo : 1**

Kobay Üzerinde Dijital Tozu Titrağı

| ETALON (E)<br>(letal doz) | EŞANTİYON (X)<br>(letal doz) |
|---------------------------|------------------------------|
| 14,8                      | 17,1                         |
| 15,1                      | 18,4                         |
| 16,2                      | 16,2                         |
| 15,4                      | 17,4                         |
| 15,3                      | 17,6                         |
| 14,6                      | 16,7                         |
| 16,5                      | 18,6                         |
| 14,7                      | 16,4                         |
| 15,8                      | 16,9                         |
| 15,2                      | 17,2                         |
| EE = 153,6                | EX = 172,5                   |

Biz bu çalışmamızda, tablo 1'de verilmiş rakamların statistik hesaplarla nasıl işlenip, ne şekilde tefsir edilebileceğini inceleyeceğiz. Bu maksatla, etalon ve eşantiyon için elde edilen letal dozların normal bir dağılım gibi kabul edilmesi başlangıcından hareket edilir. Bununla beraber, neticelerin dağılımında, standart ayrılış ortalamaya nispetle yüksek olursa, letal dozların logaritmalarının dağılımı, bizzat dozların dağılımına nazaran normale daha fazla yaklaşma şansına sahiptir (9). İşte bu sebeple bu gibi hesaplamalarda logaritma doz kullanılır. Şu halde tablo 1'de, iki gurup neticedeki dozlar, bir logarit-

ma cetveli yardımı ile (3) logaritma doza çevrilir. Tablo: 2'de neticelerin logaritma dozları görülmektedir.

**Tablo : 2**

Dijital titrajından elde edilmiş neticelerin logaritma dozları

| ETALON (E)<br>(log. doz XE) | EŞANTİYON (X)<br>(log. doz Xx) |
|-----------------------------|--------------------------------|
| 1,170                       | 1,233                          |
| 1,180                       | 1,265                          |
| 1,209                       | 1,209                          |
| 1,187                       | 1,240                          |
| 1,185                       | 1,245                          |
| 1,164                       | 1,223                          |
| 1,217                       | 1,269                          |
| 1,167                       | 1,215                          |
| 1,199                       | 1,228                          |
| 1,182                       | 1,235                          |
| EXE = 11,860                | EXx = 12,362                   |

Etalon ve eşantiyona ait logaritma dozlar ayrı ayrı toplanıp, varyant sayısına bölünerek ortalama değerler bulunur:

$$\bar{X}_E = \frac{EXE}{n} = \frac{11,860}{10} = 1,186$$

$$\bar{X}_X = \frac{EXx}{n} = \frac{12,362}{10} = 1,2362$$

Etalon'a göre eşantiyon'un nisbî aktivitesini veren formül (8).

$$M' = \bar{X}_E - \bar{X}_X \text{ dir.}$$

$\bar{X}_E = 1,186$  ve  $\bar{X}_X = 1,2362$  değerleri formülde yerlerine konursa:  
 $M' = 1,186 - 1,2362 = -0,0502$  bulunur.

Çıkarma işlemi yerine logaritmalarda kologaritma kullanıldığından ve bir kologaritmanın mantisi, logaritmanın en sağdaki rakamını 10'a diğerlerini 9'a tamamlayarak; karakteristiği de logaritmanın karakteristiğine + 1 ilâve edilip işareti değiştirilerek bulunacağından, yukarıdaki  $-0,0502 = 1,9498$  olarak değiştirilir.

Eşantiyonun etalon'a göre nisbî aktivitesini  $M'$  nün antilogaritması verir (8). Antilogaritma 1,9498, logaritma cetvelinden 0,891

olarak gösterilmiştir. Öyleyse eşantyonun aktivitesi, etalonun aktivitesinin % 89,1'dir denir.

Bazı farmakope'lerde işaret edildiği gibi, bulunan aktivite yüzdesinin  $\pm 15$  limitleri dışına çıkmaması gerektiğinden, eşantyona ait bulduğumuz aktivite yüzdesinin güven sınırlarını tespit etmemiz lâzımdır. Zira güven sınırları  $\pm 15$ 'i aştığı takdirde yapılan titraj geçerli değildir.

Aktivite yüzdesinin güven sınırları, iki grup ölçünün müsterek varyansından hareket edilerek ( $P=0,05$  ihtimalc göre) hesaplanır. Yani güven sınırları,  $M'$ 'nin varyansı hesaplanarak tahmin edilebilir. Bu da her grup için ayrı olarak hesaplanmış iki varyansın karışımından aşağıdaki formüller yardımı ile elde edilir (8)

$$S^2 \text{ comb} = \frac{E (X_E - \bar{X}_E)^2 + E (X_X - \bar{X}_X)^2}{(n_E - 1) + (n_X - 1)}$$

veya

$$S^2 \text{ comb} = \frac{EX_i^2 - \frac{(EX_E)^2}{n_E} - \frac{(EX_X)^2}{n_X}}{n_E + n_X - 2}$$

Her gruptaki ferdi değerlerin kareleri alınıp toplanırsa  $EX_i^2 = 0,265718$  olarak bulunur\*. Etalon ve eşantyon grubundaki neticelerin, ayrı toplamlarının kareleri alınarak formülde yerine konur.

$$S^2 \text{ comb} = \frac{0,265718 - \frac{0,86^2}{10} - \frac{1,362^2}{10}}{10 + 10 - 2}$$

$$S^2 \text{ comb} = 0,000347$$

$M'$ , etalon ve eşantyon ortalamaları arasındaki fark olduğundan,  $M'$  farkının varyansı, bu iki ortalamamın varyanslarının toplamıdır:

$$S^2_{M'} = S^2_{\bar{X}_X} + S^2_{\bar{X}_E}$$

$$S^2_{M'} = S^2 \left( \frac{1}{n_E} + \frac{1}{n_X} \right)$$

\* Hesap işlemlerini kolaylaştırmak maksadıyla, her logaritma doz, 1,1 küçültüldü.

$$S^2_{M'} = 0,000347 \left( \frac{1}{10} + \frac{1}{10} \right) = 0,000694$$

$$\text{Standart ayrılış ölçüsü } MS' = \sqrt{0,000694} = 0,00833.$$

M' nün güven sınırları, standart ayrılış ölçüsünden  $M' \pm tSM'$  formülü yardımı ile hesaplanır (8). (t) değeri  $P=0,05$  ve 18 serbestlik derecesine göre t teorik tablosundan bulunur.

$$1,9498 \pm 2,10 \times 0,00833 = 1,9323 \text{ ve } 1,9673$$

1,9323 ve 1,9673'ün antilogaritmaları 0,855 ve 0,927'dir.

*Şu halde netice olarak: "Eşantiyonun aktivitesi, etalona göre % 89,1 ve bu değer (P=0,05 ihtimale göre) güven sınırları % 85,5 ile % 92,7 dir" denir.*

*Gerçek değerlerle, etalon ve eşantiyonun mukayese edilmesi: Eşantiyonun etalon'a göre aktivitesinin tespiti logaritma dozlar alınmaksızın, gerçek değerlerle de yapılabilir (8). Tablo: 1 de verilen neticeler alınıp, statistik formüllerle işlenirse (10) Etalon için ortalama değer  $15,36 \pm 0,45$ , eşantiyon için ise  $17,25 \pm 0,57$  bulunur. Şu halde, etalon'un güven sınırları (P = 0,05 ihtimale göre) 14,91 ve 15,81 olup, eşantiyona ait 16,68 ve 17,82 limitleri ile müşterek sahaya sahip olmadığından, bu iki preparasyon birbirinden önemli olarak farklıdır.*

*Etalon ve eşantiyon arasındaki farkın (t) testi ile araştırılması: Bu maksatla iki ortalama değer arasındaki farkın araştırılması için kul-*

lanılan  $t = \frac{X_E - X_X}{\sqrt{S^2_E + S^2_X}}$  formülünde\* Etalon ve eşantiyona ait

değerler yerlerine konularak bir (t) değeri hesaplanır:

$$t = \frac{15,36 - 17,25}{\sqrt{0,40267 + 0,61833}} = \frac{1,89}{0,32} = 5,91$$

Hesapla bulunan  $t = 5,91$  değeri, (t) teorik tablosundaki 18 serbestlik derecesi için işaret edilen  $P = 0,05$  için 2,10 ve  $P = 0,01$  için 2,88 değerlerinden büyük olduğundan, etalon ve eşantiyon arasındaki aktivite farkı çok önemlidir.

\*  $X_E$  : Etalon'un ortalama değeri,  
 $X_X$  : Eşantiyon'un ortalama değeri,  
 $S_E$  : Etalona ait değerlerin standart yanlış emsali,  
 $S_X$  : Eşantiyona ait değerlerin standart yanlış emsali.

## T a r t ı ŝ m a

Bugün birçok memleketlerin ilâç kitapları, biyolojik dozajlarda statistik metotların kullanılmasından bahsetmektedir (7,8). Böylece, Pharmacopée française'in 8'ci, Pharmacopeia of United States'in 15 ve 16'cı, British Pharmacopea'nın 1963 baskısında, bu metotlarla ilgili sayfalara rastlanmaktadır. Oysa henüz bizim ilâç kitabımızda bu bahislere rastlanmadığından, bu ve bundan sonra aynı sahada yapacağımız neşriyatların bilhassa ilâç kontrol işlerinde çalışacak eksperler için faydalı olacağı kanaatındayız.

## Ö z e t

Bu incelemede, standart bir dijital yaprağı (etalon) tozuna göre, aktivitesi bilinmeyen herhangi bir eşantiyonun, kobay üzerindeki biyolojik titrajından elde edilmiş neticelerin, statistik metotlarla nasıl değerlendirilip, ne şekilde tefsir edilebileceği, işlemler mümkün olduğu kadar basitleştirilerek gösterilmiştir.

## R é s u m é

### **Application des Méthodes Statistiques pour Interpréter les Résultats Obtenus d'un Titration Biologique sur des Preparations Digitaliques**

Dans cette étude, on a montré l'utilisation des méthodes statistiques pour interpréter les résultats d'un titration biologique fait sur des Cobayes afin de déterminer l'activité d'un échantillon en fonction de la poudre de référence (étalon).

## B i b l i o g r a p h i e

- 1- **Akman, M. Ş.** (1967): *Farmakoloji ders notları*. Basılmadı.
- 2- **Akman, M. Ş.** (1952): *Aydın ve Muğla illerinde yetişen tıbbî ve zehirli bitkilerden en önemlilerinin Farmakolojik-toksikolojik etkileri bunlardan hazırlanacak Galenik preparatların yabancı memleket müstahzarları ile mukayeseleri* (76-78). Ankara Üniversitesi Basımevi.

- 3- **Candoğan, M.** (1965): *Sayıların ve trigonometrik tabirlerin beş aşarili logaritma cetvelleri ve kullanılış izahı*. İnkilâp ve Aka kitabevleri, Ankara caddesi, 95. İstanbul.
- 4- **Hazard, R.** (1943): *Précis de Thérapeutique et de Pharmacologie*, p.321-322. Masson et Cie Editeurs, Paris.
- 5- **Hazard, R.** (1953): *Précis de Thérapeutique et de Pharmacologie* p. 822-833. Masson et Cie Editeurs, Paris.
- 6- **Hazard, R., Cheymol, J., Lévy, J., Boissier, J.R., Lechat, P.** (1963): *Manuel de Pharmacologie* p. 256-263. Masson et Cie Editeurs, Paris.
- 7- **La Barre, J. et Thomas, J.** (1947): *Dosage biologique et Control des Médicaments*, p. 21-29. Masson et Cie Editeurs, Paris.
- 8- **Pharmacopée Française** (1965): *Monographie: Digitale* p.374.
- 9- **Philippe, J.** (1965): *L'analyse statistique des essais biologiques dans la pharmacopée française 1965*. Ann. pharm.franç.28 (12), 755-774.
- 10- **Valette, G.** (1964): *Méthodes statistiques en Pharmacologie*. Prod. et Prob. Pharm. 19 (3), 97.

Yazı "Dergi Yazı Kuruluna" 2.5.1967 günü gelmiştir.