

Standardní metody

- Mnoho metod standardizováno mezinárodními i národními organizacemi
- Organization for Economic Cooperation and Materials (OECD)
 - International Organization for Standardization (ISO)
 - American Society for Testing and Materials (ASTM)
 - US EPA
 - Národní standardizační programy a legislativa
 - ČNI Český normalizační institut
 - MŽP
 - MZE



Výhody standardních metod

- Metodiky testů jsou jednotné a porovnatelné s předchozími výsledky v té stejné i v dalších laboratořích
- Mohou být zopakovány dalšími laboratořemi
- Výsledky jsou dobře akceptovatelné pro regulační orgány
- Zjednodušená logistika, vývoj a optimalizace už provedena
- Tyto metody poskytují základ, na němž se dá dále stavět a který se dá případně modifikovat
- Získaná data mohou být kombinována s daty z jiných laboratoří pro využití v QSAR, ERA's
- Detailní seznam použitých přístrojů, medií, modelových organismů, atd.
- Popsány experimentální, analytické a dokumentační postupy
- Specifikována pravidla validity testu

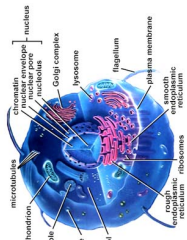
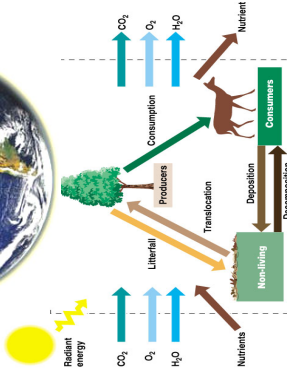
Nevýhody standardních metod

- Často příliš specifické → těžko aplikovatelné pro jiné situace nebo k odpovědi dalších otázek
- Bývají používány v nevhodných situacích (výzkum, hodnocení příčiny a účinku)
- Nemusí být aplikovatelné do reálného prostředí

Moderní přístupy studia biochemických a buněčných mechanismů toxicity v ekotoxikologických biotech

Klára Hilscherová





Biosféra

Ekosystém

Společenstvo

Populace

Jedinec

Soustava orgánů
 Organ
 Tkáň
 Buňka
 Organela
 Biomolekula

VYSOKÁ

NÍZKÁ

Ekologická relevance
 Trvání odpovědi
 Dlouhodobější následky

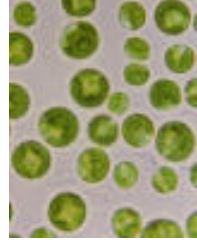
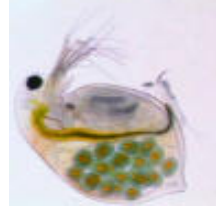
Flexibilita
 Schopnost určit příčinu
 Specifita
 Citlivost

NÍZKÁ

VYSOKÁ

BIOMARKERY

- Časné varovné signály potenciálního poškození organismu i celé populace, časný marker toxicity (*i bez morfologických změn*)
- Cizorodými látkami způsobené změny buněčných nebo biochemických složek, struktur, nebo funkcí, které jsou měřitelné v biologickém vzorku
- Citlivé, rychlé odpovědi, mohou ukazovat mechanismus účinku, předcházejí viditelným symptomům toxicity
- Nejlépe prostudovány u vyšších živočichů (savců, ryb)
- Možno sledovat i u druhů ze standardních akvatických biotestů (řasy, makrofyta, bezobratlí)



Biochemické markery

- screeningové metody s vysokou predikční schopností, alternatíva vüči stávajícím metodám.
- používány v základním toxikologickém, ekotoxikologickém a farmakologickém výzkumu.
- některé obecně akceptovány.
- řada parametrů testována jako potenciální biochemické markery.
- potenciál využití jako alternativní metody pro toxikologické hodnocení nových xenobiotik.

Výhoda biologických a biochemických indikátorů kontaminace: schopnost vypovídat o vlivu znečištění v celém jeho komplexu, se všemi synergistickými a antagonistickými vlivy mezi jednotlivými znečišťujícími komponenty.

Biochemické markery

Princip: toxické látky v subletálních koncentracích způsobují změny hodnot hematologických, biochemických, ukazatelů nespecifické imunity, vyvolávají histopatologické změny v tkáních.

Po vstupu cizorodých látek do organismu či buňky dochází:

- k jejich vazbě na buněčné receptory, kontrolující klíčové buněčné pochody,
- ke vzniku reaktivních intermediátů,
- k inhibici určitých enzymových aktivit a dalším procesům, které předcházejí toxickým a dalším negativním efektům na úrovni buňky, orgánů, organismů a populací.

Biochemické markery toxicity = vybrané parametry, jejichž měřitelné změny jsou prvními, časnými odpověďmi na expozici cizorodými látkami („early warning of biological impact“).

- **indikují mechanismus toxicity, nikoliv určitou cizorodou látku.**
- některé biochemické parametry specificky odrážejí expozici některou třídou nebo skupinou kontaminantů.
- biologickými modely jsou nejčastěji jaterní tkáň, primární hepatocyty nebo permanentní linie odvozené od hepatocytů, případně odebraná krev či jiné tělní tekutiny
- Vhodně zvolené biomarkery jsou významnými indikátory zdravotního stavu organismů v monitorovaném ekosystému.
- Předností je schopnost detekovat toxické účinky látek před manifestací jejich účinku, tzn. před narušením fyziologických funkcí jako např. růstu, vývoje, reprodukce.

Biomarkery = biochemické, fyziologické či histologické indikátory expozice nebo vlivů xenobiotik na suborganismální nebo organismální úrovni

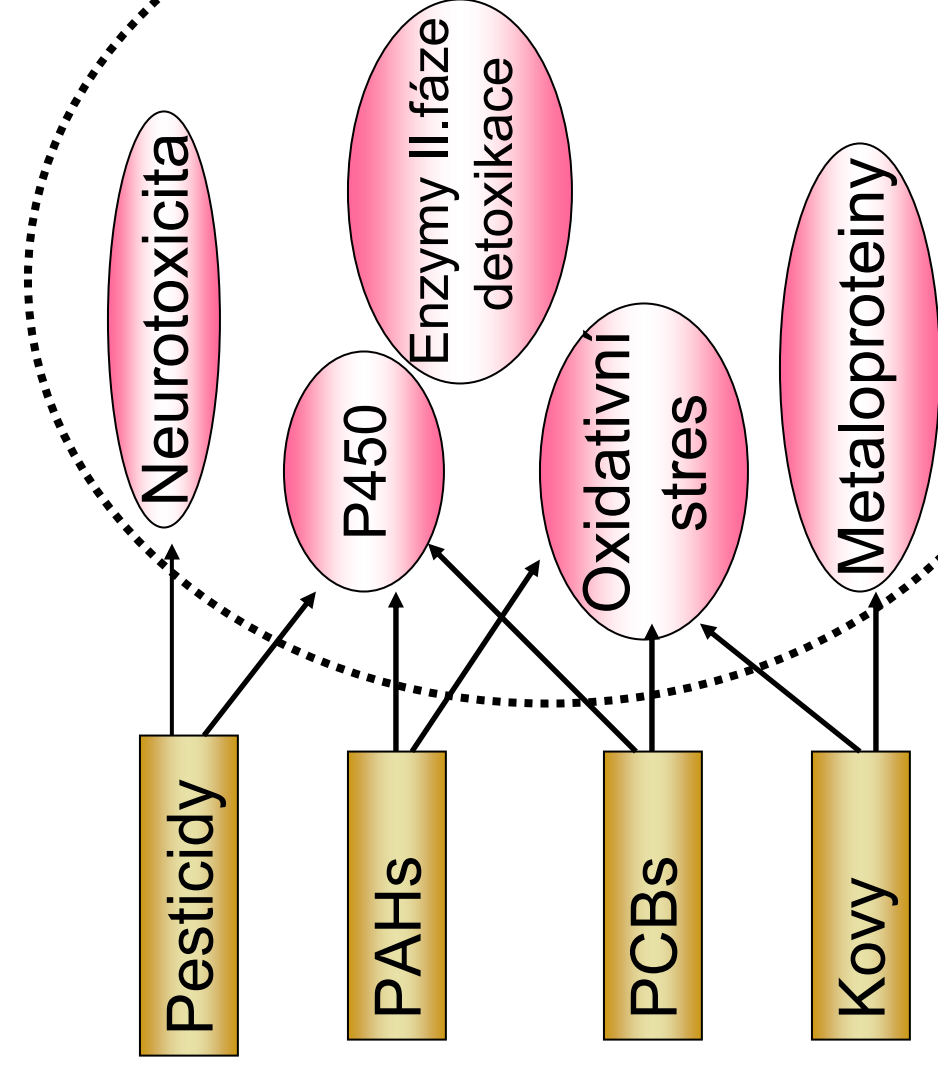
Výhoda: odpovídají na expozici = reagují pouze polutanty dostupné pro organismus.

Vhodné biomarkery by měly splňovat následující vlastnosti:

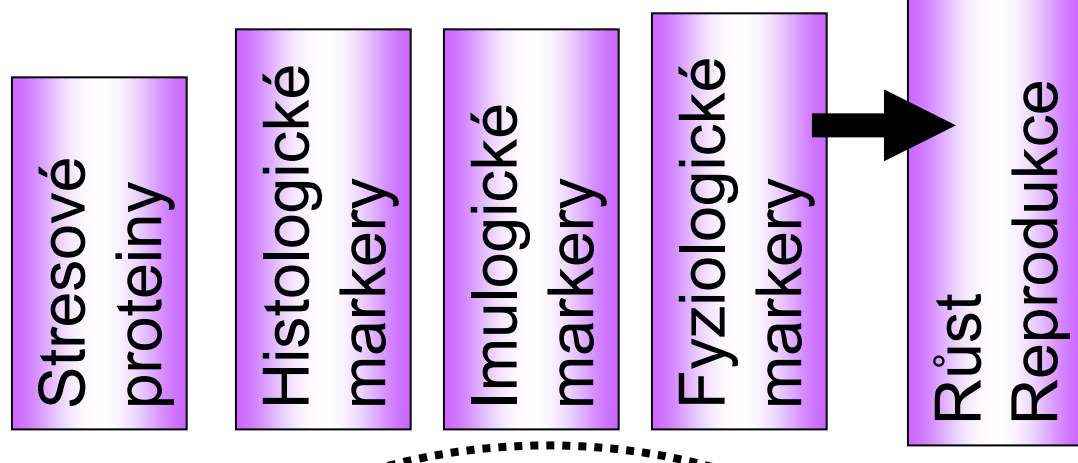
- (i) senzitivní ve srovnání s ostatními biomarkery;
- (ii) specifičnost ke konkrétním druhům chemických xenobiotik;
- (iii) permanentní odpověď ;
- (iv) jasnost v interpretaci a propojení na vlivy vyšší úrovně;
- (v) spolehlivost, reprodukovatelnost;
- (vi) preciznost, jednoduchost a nízké náklady;
- (vii) aplikovatelnost v terénních podmínkách a validace v terénu

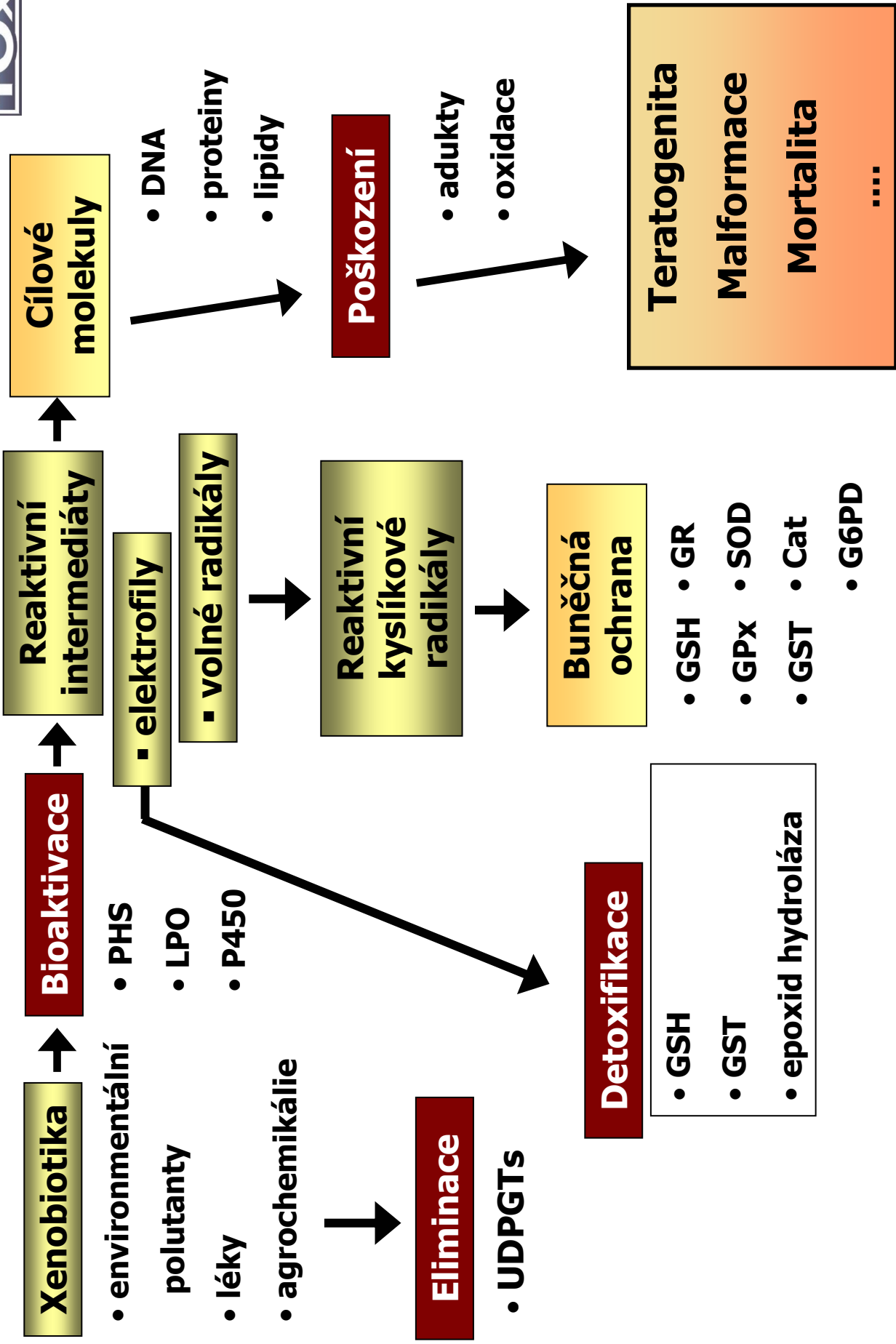
BIOMARKERY

Specifičtější parametry



Nespecifické parametry





BIOMARKERY EXPOZICE

- identifikují látku v systému a interaktivní produkt mezi xenobiotikem a endogenní složkou nebo jiné skutečnosti v biologickém systému způsobené expozicí.
- charakterizují množství toxikantu, které proniklo do organismu
- neposkytují příliš informací o následcích expozice, různě specifické

BIOMARKERY ÚČINKU-VLIVU

- biochemické změny, které se projeví jako výsledek negativní interakce toxikantu a biologického systému a mohou vyústit až v patologické poškození organismu

Biomarkery expozice

I. Stresové proteiny (proteiny teplotního šoku)

- nespecifické, indukovatelné u rostlin i živočichů

II. Inhibice esterázové aktivity (acetylcholinesterázy)

- enzym nervového systému živočichů, specifická odpověď
- po expozici organofosfátových pesticidů a karbamátů
- primární toxický vliv těchto látek, stupeň inhibice enzymů je v úzkém vztahu k expozici tkání

Acetylcholinesteráza (AChE): zejména v mozku, červených krvinkách a plasmě některých obratlovců, zodpovědná za hydrolyzu acetylcholinu, hlavního přenašeče neuronů. Její inhibice silně ovlivňuje přenos nervových signálů.

III. Metalothioneiny

- cytoplasmické kovy-vážíci proteiny, vyskytují se u řady eukaryot, indukce po expozici kovy, biomarkery vlivu toxických kovů.
- skupina proteinů s nízkou molekulovou hmotností (6 000-20 000), vysokým obsahem aminokyselin obsahujících sulfhydrylové skupiny (zejména cystein) a schopností vázat těžké kovy. K jejich zvýšené syntéze dochází při zvýšené koncentraci iontů kovů jak esenciálních tak toxických

BIOMARKERY EXPOZICE

IV. Indukce detoxikačních enzymů u rostlin i živočichů

A. Enzymy I. fáze biotransformace – enzymy MFO (monoxygenázy smíšené funkce) – indukce enzymů cytochromu P450 (EROD, MROD, PROD)

cytochrom P4501A - biomarker expozice důležitých skupin organických látek

- hladina cytochromu indukována 2,3,7,8-tetrachloldibenzo-p-dioxinem a příbuznými látkami, PCB, PAU
- cytochromy P450 (CYP) jsou hemoproteiny schopné vázat molekulární kyslík a vsunovat jeho jeden atom do molekuly substrátu, kterým mohou být i cizorodé látky, které jsou jedním nebo více cytochromy přeměněny tak, aby mohly být z organismu např. exkretovány.

B. Enzymy II. fáze biotransformace – glutathion transferázy (GST), uridinedifosfoglukuronosyl transferázy, sulfotransferázy

Biomarkery účinku

- I. **Parametry oxidativního stresu** - produkce kyslíkových radikálů, aktivita antioxidantních enzymů koncentrace neenzymatických antioxidantů, oxidativní poškození makromolekul
- II. **Parametry energetické bilance organismu – obsah lipidů, proteinů, uhlovodíků a aktivity elektronového transportu**
- III. **Indikátory narušení metabolismu - metabolické enzymy**
pyruvát kináza, laktát dehydrogenáza, isocitrát dehydrogenáza
- IV. **Biomarkery zatížení endokrinního systému - vitelogenin, hormony T3 a T4, enzymy metabolismu steroidních hormonů.**
- V. **Genotoxické biomarkery (narušení integrity DNA – zlomy v DNA, mikrojaděrka)**
- VI. **Histologicko-patologické změny některých orgánů**

BIOMARKERY ÚČINKU

Parametry oxidativního stresu

- produkce kyslíkových radikálů – superoxid, peroxid vodíku, hydroxylový radikál
- aktivita antioxidantních enzymů – glutathion peroxidáza, glutathion reduktáza, superoxidáza, kataláza
- koncentrace neenzymatických antioxidantů
- oxidativní poškození makromolekul – lipidní peroxidace, oxidativní adukty DNA, produkty oxidace proteinů

Jedná se biomarkery organochlorových pesticidů, PCB, pesticidů typu paraquat apod.

Genotoxické biomarkery (narušení integrity DNA – zlomy v DNA, mikrojaderka) - využívány při hodnocení zatížení ekosystémů látkami s genotoxickým účinkem, které indukují vznik chromosomálních aberací a mutací.

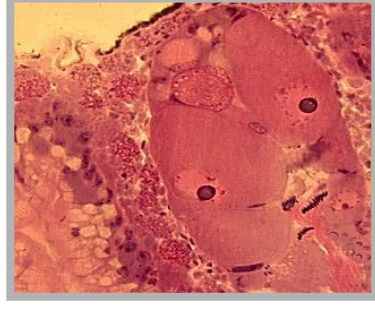
alternativa detekce - metody PCR, RT-PCR a DNA-fingerprintingu test mikrojader

Test mikrojader (MNT) - jednoduchá orientační metoda ke stanovení genotoxicity. Pozitivní po působení PCB, benzpyrenu, benzinu, apod.

Biomarkery účinku na endokrinní systém

Stanovení produkce vitelogeninu

- Vitelogenin je bílkovina produkovaná jaterními buňkami ryb, obojživelníků, plazů a ptáků.
- Produkce je indukována vazbou estrogenů na jaterní receptory.
- U samic je vitelogenin transportován do vaječníků, kde tvoří součást žloutkových proteinů.
- U samců je hladina endogenních estrogenů přirozeně velmi nízká, a proto je i produkce vitelogeninu minimální
- Po působení ED's s xenoestrogenním účinkem (ze známých látek je to např. chlordan, toxafen, dieldrin, 4-nonylfenol) dochází u obou pohlaví ke stimulaci tvorby endogenních estrogenů a ke zvýšení hladin vitelogeninu.
- Naopak působením antiestrogenních ED's (např. metoxychloru) se produkce vitelogeninu minimalizuje pod měřitelnou úroveň.
- Sledován zejména u ryb a obojživelníků



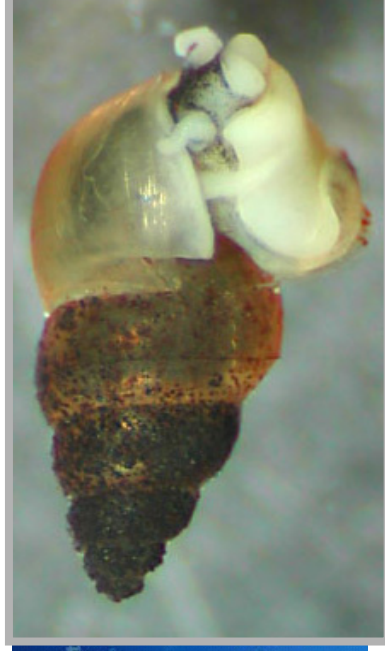
Další parametry: vitelin, cytochromy, hladiny hormonů
Histochemická charakteristika a lokalizace

Doporučené metody pro biologické monitorovací programy ve vodním prostředí na národních úrovních

Metoda	Organismus	V současnosti používán v monitorovacích programech	Biomarker látek	Biologický význam
Tvorba DNA aduktů	Ryby, mlži	Francie, Holandsko, Švédsko, USA	PAU, nitro látky, amino triazinové pesticidy	Parametr genotoxických vlivů, citlivý indikátor minulé a současné expozice
Inhibice acetylcholinesterázy	Ryby, koryši, mlži	Francie	Organo fosfáty a karbamáty nebo podobné molekuly, možné řasové toxiny	Parametr expozice
Indukce metallothioneinů	Ryby	Monitoring and Research Programme of the Mediterranean Action plan, Holandsko	Indukce metallothioneinových proteinů vlivem určitých kovů (Zn, Cu, Cd, Hg)	Parametr expozice a disturbance metabolismu mědi a zinku
Indukce ethoxyresorufin-O-deetylázy (EROD) nebo cytochromu P450 1A	Ryby	Německo, Francie, Holandsko, UK, Belgie, Monitoring and Research Programme of the Mediterranean Action plan, Norsko	Indukce enzymů detoxikujících planární organické kontaminaty (PAU, planární PCB, dioxiny)	Možný prediktor patologie vlivem mechanistických propojení, senzitivní indikátor současné expozice
Inhibice Δ -amino levlulinové kyselina (ALA-D), indukce vitellogeninu	Samci a juvenilní jedinci ryb	Holandsko, UK	Estrogenní látky	Parametr feminizace samčích ryb a reprodukční poškození

Aplikace biomarkerů v akvatických testech

- Při přípravě testu nezbytné používat dobře charakterizovaný materiál – homogenní populaci
- faktory ovlivňující biomarkery - druh organismu, pohlaví, věk, vývojové stadium a výživa, environmentální faktory (teplota etc.)
- otestovat a nakalibrovat potřebné množství vzorku podle množství sledovaných parametrů, jejich limitu detekce a spotřeby biologického materiálu pro jednotlivé metodiky - u malých druhů směsné vzorky z více jedinců



Biomarkery - závěry

- Biomarkery = citlivé indikátory zatížení organismů environmentálními stresory a subletálních účinků
- Umožňují náhled do subletálních fyziologických procesů – charakterizují mechanismus účinku
- Specifické markery – informují o přítomnosti specifického stresoru
- Použitelnost určitého biomarkeru pro každý nový druh musí být validována a optimalizována, musí být posouzena jeho relevance a míra odpovědi pro nový druh
- Nezbytný multiparametrický přístup
- Studium spojení časných subletálních biochemických a buněčných změn s dlouhodobějšími negativními účinky na úrovni populace a společenstva

Speciální ekotoxikologické biotesty

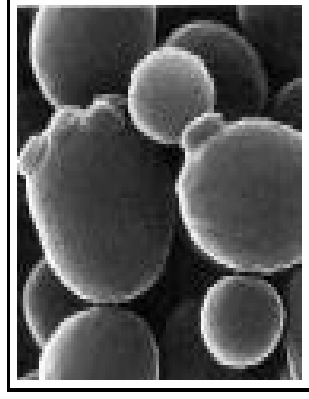
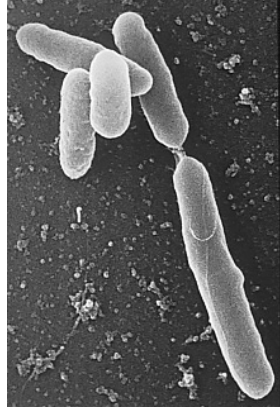
– *in vitro*

- standardní testy (normy ISO, ČSN, USEPA)
- optimalizace/vývoj nových testů
- Toxicita
- Specifické mechanismy neletálních účinků
 - Genotoxicita
 - Dioxinová aktivita
 - Mechanismy endokrinní disrupce – estrogenita, androgenita
 - Imunotoxicita
 - Biochemická ekotoxicita
- Testování čistých látek (environmentální polutanty)
 - modelových směsí
 - komplexních environmentálních extraktů

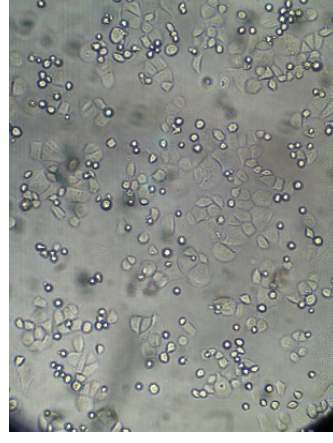
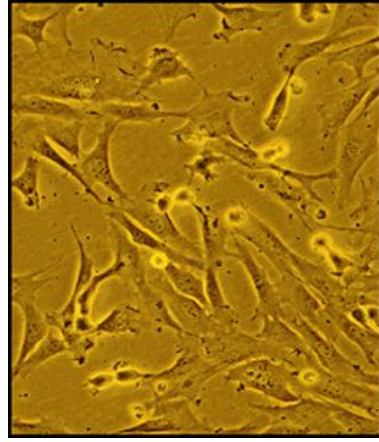


Testy na původních či geneticky modifikovaných prokaryotických
či eukaryotických buňkách

BAKTERIÁLNÍ TESTY, KVASINKOVÉ TESTY



TESTY NA TKÁŇOVÝCH KULTURÁCH



Využití tkáňových kultur (TK)

= Alternativní metoda k pokusům na živých organismů

Výhody TK: výrazné snížení množství zvířat použitých v experimentu

- zajištění vysokého počtu vzorků a možnost odběru kontrolních i experimentálních vzorků z tkáně jednoho zvířete, což minimalizuje variabilitu získaných výsledků.

Nevýhoda TK: možnost sledovat účinky testované látky pouze na konkrétním druhu tkáně, ze kterého byla TK připravena, tedy chybějící možnost posouzení zdravotního stavu a chování celého živočicha.

Např. k testování účinků ED's se využívají TK z jater drápatky vodní. Za 6 až 8 dnů po expozici xenoestrogenním látkám začne TK produkovat vitelogenin. Bylo prokázáno, že hladiny vitelogeninu vyprodukovaného TK a játry živé drápatky se statisticky významně neliší

Nejznámější stabilní rybí buněčné linie využívané v testech toxicity jsou:

RTG-2 (fibroblasty gonád pstruha duhového), EPC (epithelioma papillosum cyprini), R-1 (fibroblastické buňky jater pstruha duhového, PLHC-1 (jaterní buňky *Poecilia lucida*).

Testy na buněčných kulturách

- využívány zejména pro teoretické objasnění účinku toxického agens.
- v poslední době i pro rutinní provádění testů toxicity.
- prováděny za využití primárních buněčných kultur a stabilních buněčných kultur. Primární buněčné kultury se získávají z jednotlivých tkání organismů, jsou nestandardní, což může významnou měrou ovlivnit výsledek testu toxicity (= nízká reprodukovatelnost).
- například stabilizované linie kožních buněk, nervových buněk, buněk srdečního svalu, buněk odvozených od tkání ledvin a pod.
- buněčný substrát pro založení kultury se kdysi získal většinou od lidského dárce (jako vedlejší materiál např. při operaci), pak se stabilizoval a uzpůsobil k neomezenému dělení a následné kultivaci.
- dnes se kupuje v buněčné bance, respektive Sbírece buněčných kultur.
- možno získat stabilní buněčné linie z různých orgánů a z různých druhů organismů
- tyto linie se velmi dobře přechovávají v hybernovaném stavu.
- podle předepsaných podmínek (výživa, teplota, vlhkost apod.) lze danou buněčnou kulturu rozpěstovat použít v toxikologickém testu.
- buňky se nasazují do speciálních nádob pro pěstování buněčných kultur, přidává se živné medium obohacené o antibiotika, případně antimykotika
- stabilizované linie se dobře pěstují, rychle rostou a lze vytvořit mnoho vzorků menších kultur, ke kterým se přidávají do kulturačního prostředí chemické či jiné látky a zkoumá se charakter toxických účinků dané látky.



Používané metody

Řada testů optimalizována na provedení v mikroděstičkách



Toxicita a genotoxicita: měření zákal či aktivity reporterového genu – spektrofotometricky, fluorimetricky či přirozená bioluminiscence

Cytotoxicita: hodnocena přímými a nepřímými metodami. Přímé metody = posouzení celkového počtu uhynulých buněk a rozsahu cytopatických efektů.

Nepřímé metody založeny na fyziologických reakcích buněk hodnocených na základě barevných reakcí. Mezi nejpoužívanější patří NR-test, který využívá schopnosti nepoškozených buněčných lysozomů přijímat neutrální červeně a dále MTT-test, založený na redukci MTT tetrazolové soli účinkem mitochondriální sukcinátdehydrogenázy. Výhodou těchto metod je jejich časová nenáročnost, možnost standardizace a miniaturizace.

Modulace receptorově-závislých odpovědí: aktivity reporterového genu, např. luminometrie - indukce nebo inhibice reporterové luciferázy, nebo spektrofotometrie – indukce nebo inhibice reporterové β -galaktosidázy

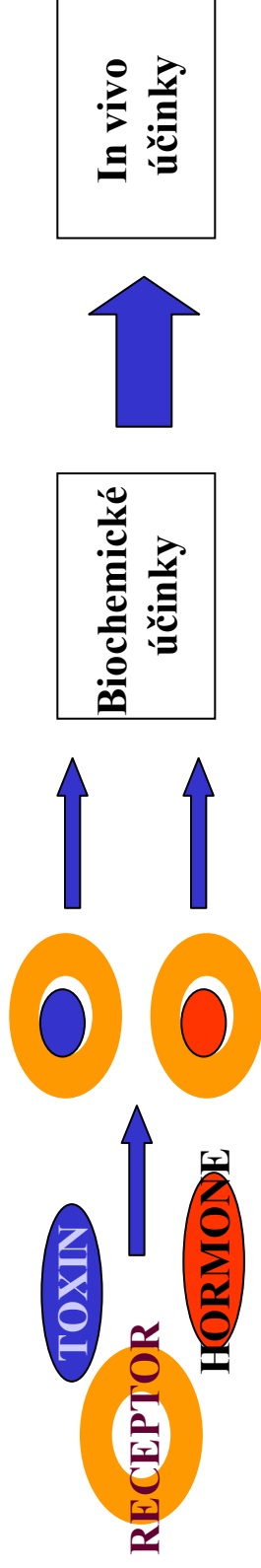
Stanovení hladin specifických mRNA a proteinových produktů – elektroforetické a imunoblotovací metody, Western blot, molekulárně biologické techniky

Řada autorů provedla porovnání výsledků testů in vivo s výsledky testů in vitro s cílem posoudit možnost náhrady testů na živých organismech. Výsledky testů in vivo a in vitro spolu korespondovaly, v řadě případů byly shodné a v některých případech byla citlivost testů in vitro nižší.

MECHANISMY

chronické toxicity polutantů

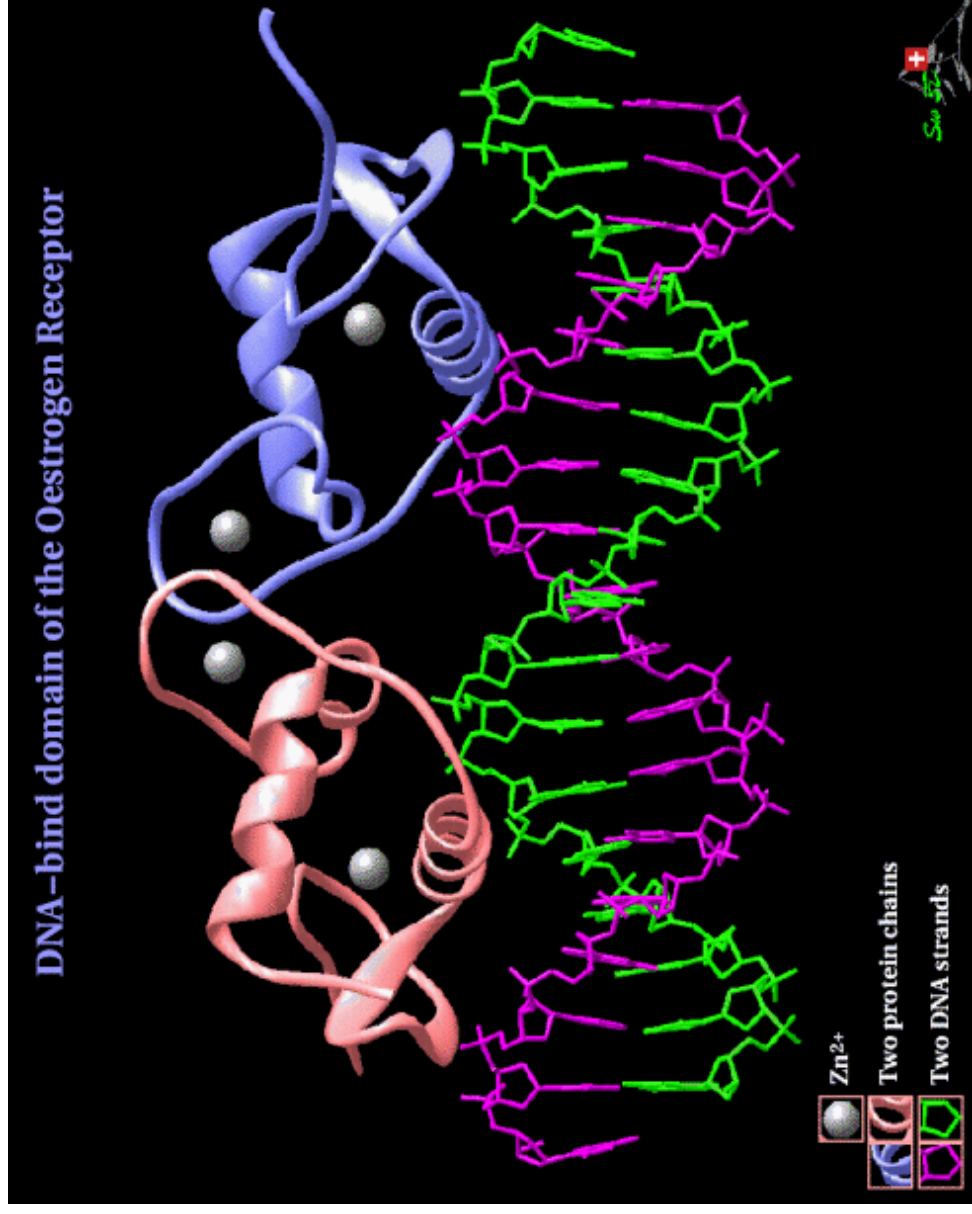
- Princip: různé chronické účinky chemické látky vycházejí ze společného biochemického mechanismu působení
 - Základní výsledky z mechanisticky založených *in vitro* testů



- zhodnocení *in vitro* účinků jednotlivých látek
 - Poznání zásadního mechanismu, predikce rizika
- Využití pro hodnocení rizik a/nebo monitoring
 - Určení relativních potenci ("toxických ekvivalentů") -> RA
 - Biomarkery *in vitro* – přímá charakterizace komplexních vzorků

Receptorově-mediované mechanismy toxicity

ESTROGENNÍ RECEPTOR - ER



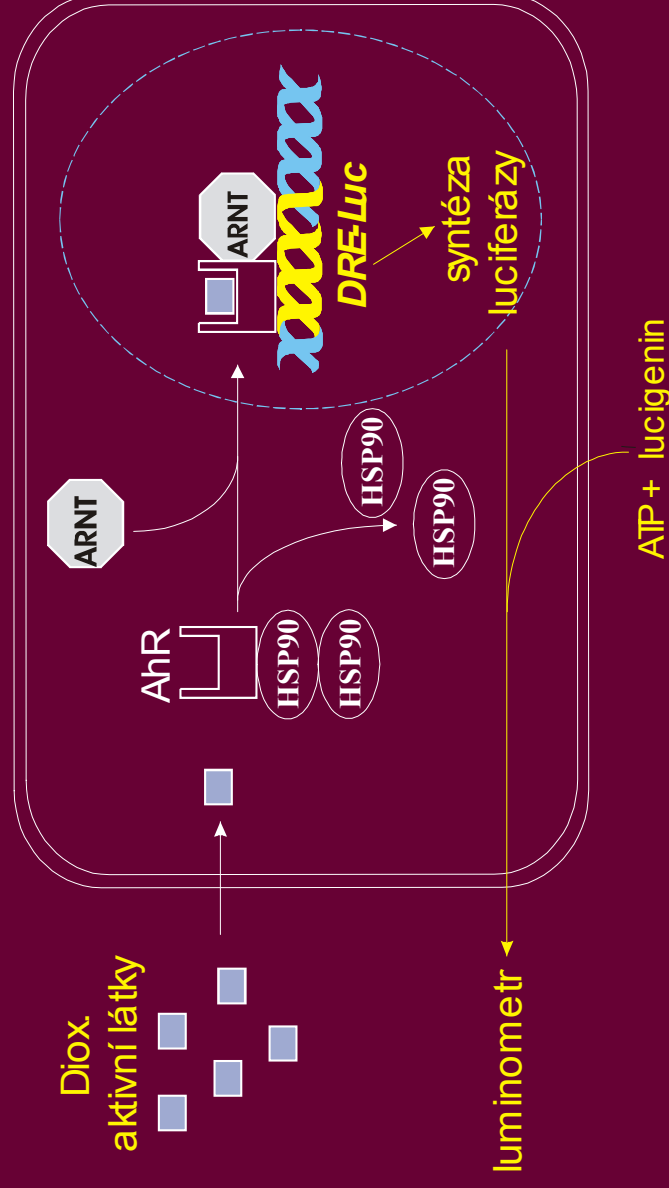
Testy receptorově-mediovaných mechanismů

- Nejvíce studovaný – **Aryl hydrokarbon receptor** – umístěný v cytosolu
- Jaderné receptory zahrnují několik rodin receptorů: Androstanový receptor (AR), **estrogenní receptor (ER)**, progesteronový receptor (PR), glukokortikoidní receptor (GR) a mineralokortikoidní receptor (MR) jsou hlavními představiteli rodiny steroidních receptorů
- Receptory slouží jako poslové mezi genomem a extracelulárními signály, na které musí buňka reagovat, aby přežila.
- Buněčné receptory regulují na základě interakce s xenobiotiky expresi enzymů I. a II. fáze biotransformace a některých detoxifikačních transportérů.
- Ve většině případů se jedná o indukci exprese (up-regulaci) cílových genů, které se přímo podílejí na biotransformaci nebo exkreci xenobiotik.

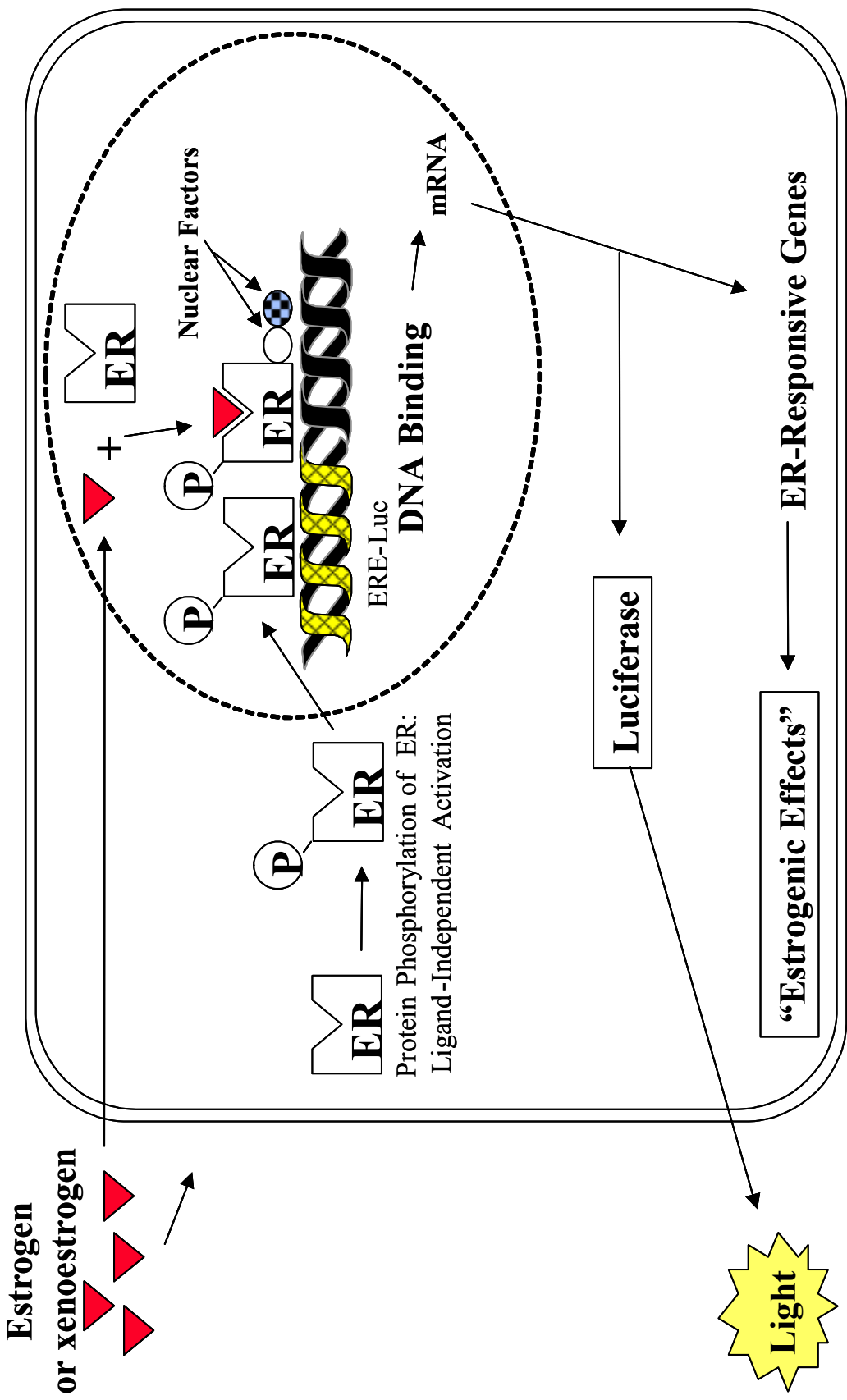
Princip testu: sledovaná aktivita reportérového enzymu odpovídá potenci látky či směsi pro interakci s receptorem

In vitro stanovení dioxinové toxicity

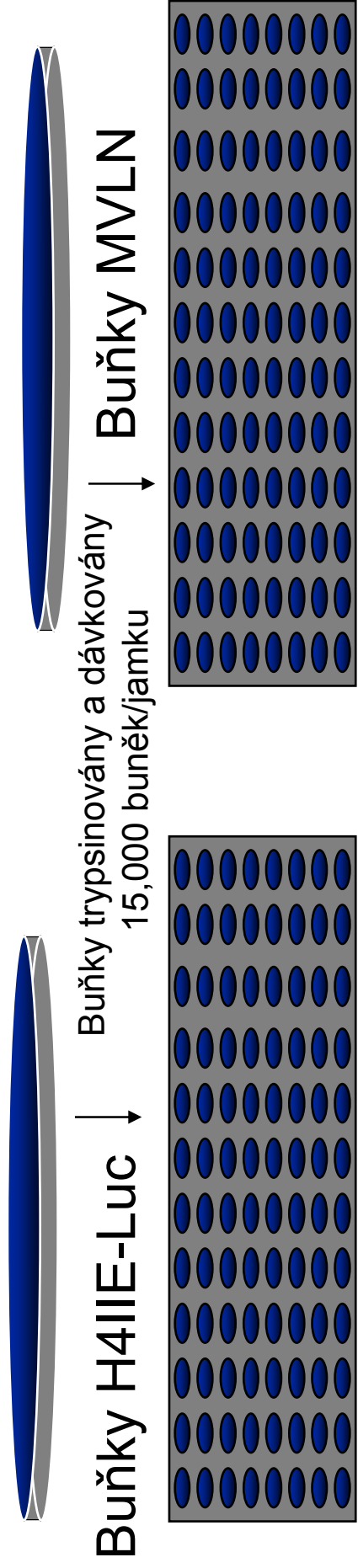
- Stanovení na buněčné linii krysího hepatomu H4IIE.luc
- Pod kontrolu AhR-responsivního elementu vložen gen pro luciferázu



In vitro stanovení estrogení aktivity

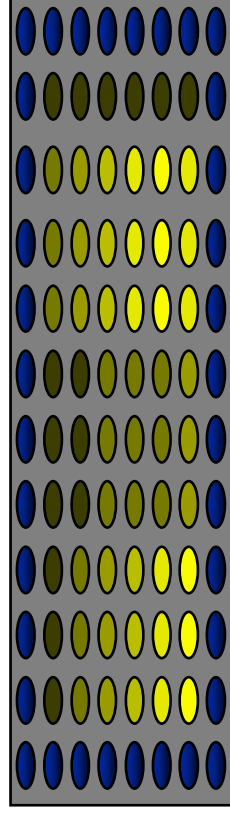
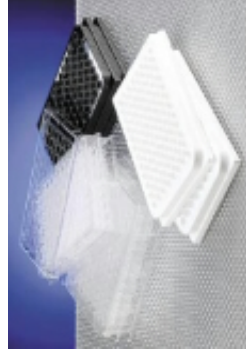


In vitro biotesty k detekci dioxinové a estrogenní aktivity



Po 24 hodinách vyměněno medium, dávkovány testované látky

Expoziční doba : 3-72 hod

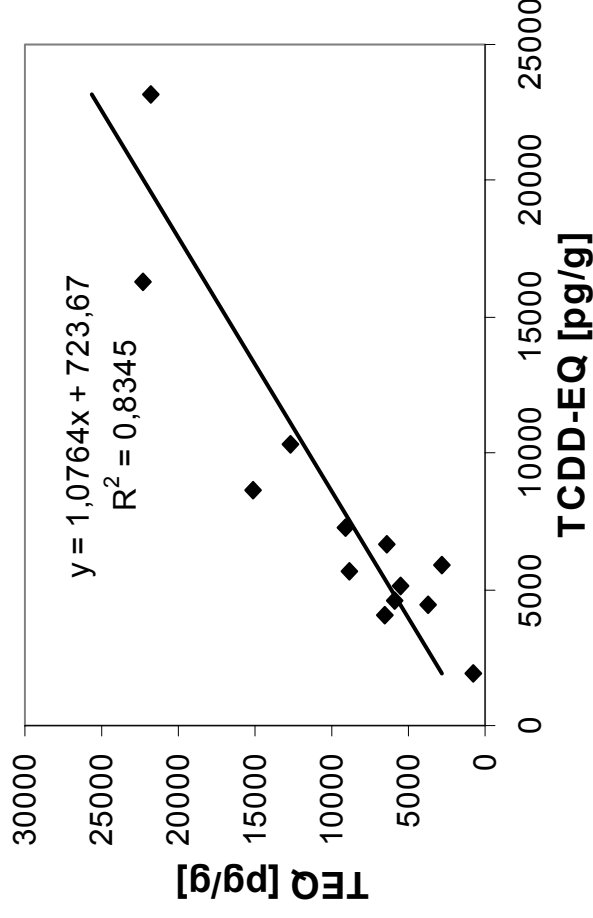
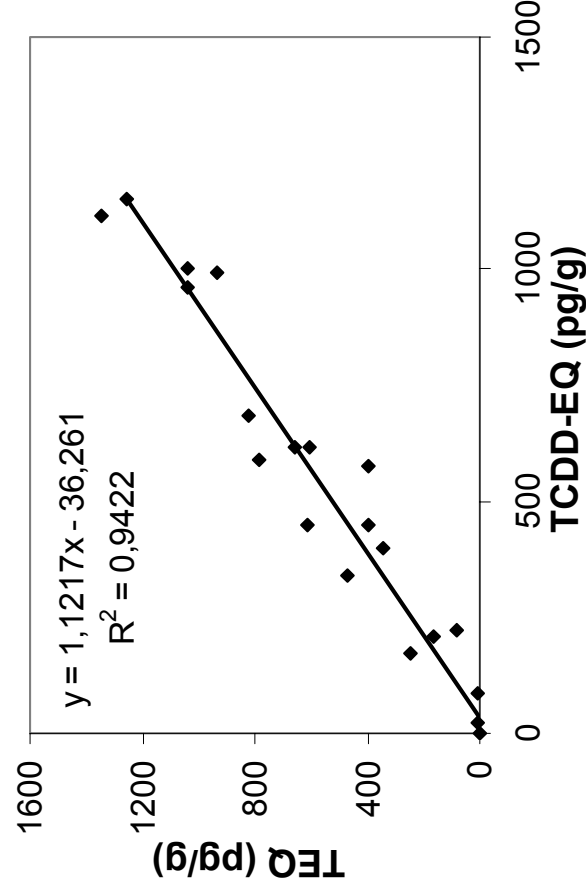


- Po expozice odstraněno medium, buňky vymyty puřem a přidán Lucilite reagent.
- Po 20 minutách měřena aktivita luciferázy v destičkovém luminometru.

In vitro testy na buněčných liniích

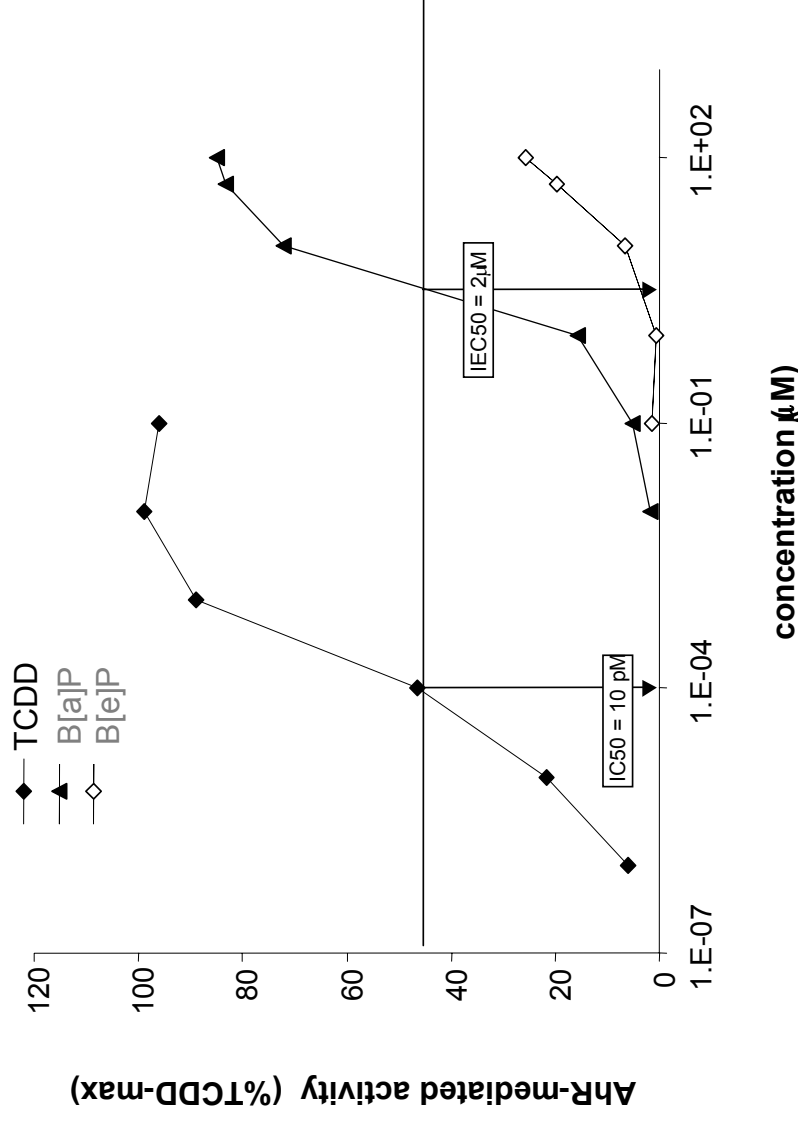
- hodnocení expozice látkami se specifickým mechanismem účinku (látky s dioxinovou, estrogenní aktivitou)
- reportérové buněčné linie transfekované genem luciferázy, který je indukován po navázání ligandu na receptor
- kalibrace odpovědi standardním ligandem (2,3,7,8-TCDD pro dioxinovou aktivitu, 17 β -estradiol pro estrogenní aktivitu)

Vztah mezi dioxinovými toxickými ekvivalenty stanovenými v biotestu na buněčné linii (TCDD-EQ) a spočítanými z výsledků chemických analýz



Srovnání různých látek -> Použití v hodnocení rizik

- Kvantifikace účinků (EC₅₀) - relativní potence
- Srovnání s účinkem referenčního toxikantu (2,3,7,8-TCDD)
- Vyjádření jako relativní potence/ Ekvivalenční Faktor (~ TEF)



TCDD: IC₅₀
PAH: IEC₅₀

Relativní potence

$$\text{IEF} = \text{IC}_{50} / \text{IEC}_{50}$$

Toxické ekvivalenční faktory pro PCDDs, PCDFs a PCBs:

Table 4. Toxic Equivalent Factors established by the WHO (WHO-TEFs) for dioxins and dioxin-like PCBs [4]

PCDD Congener	WHO-TEF	PCDF Congener	WHO-TEF	PCB Congener	WHO-TEF
2,3,7,8-TCDD	1	2,3,7,8-TCDF	0.1	Non-ortho PCB#81	0.0005
12,3,7,8-PeCDD	1	12,3,7,8-PeCDF	0.05	PCB#77	0.0005
123478-HxCDD	0.1	23478-PeCDF	0.5	PCB#126	0.1
123678-HxCDD	0.1	123478-HxCDF	0.01	PCB#169	0.01
12,3,7,89-HxCDD	0.1	123678-HxCDF	0.1	Mono-ortho PCB#105	0.0001
1234678-HpCDD	0.01	234678-HxCDF	0.1	PCB#114	0.0005
OCDD	0.0001	12,3,7,89-HxCDF	0.1	PCB#118	0.0001
		1234678-HpCDF	0.01	PCB#123	0.0001
		1234789-HpCDF	0.01	PCB#156	0.0005
		OCDF	0.0001	PCB#157	0.0005
				PCB#167	0.00001
				PCB#189	0.0001

Eljarrat & Barceló, Trends Anal. Chem.22: 655

Testování komplexních vzorků ze životního prostředí

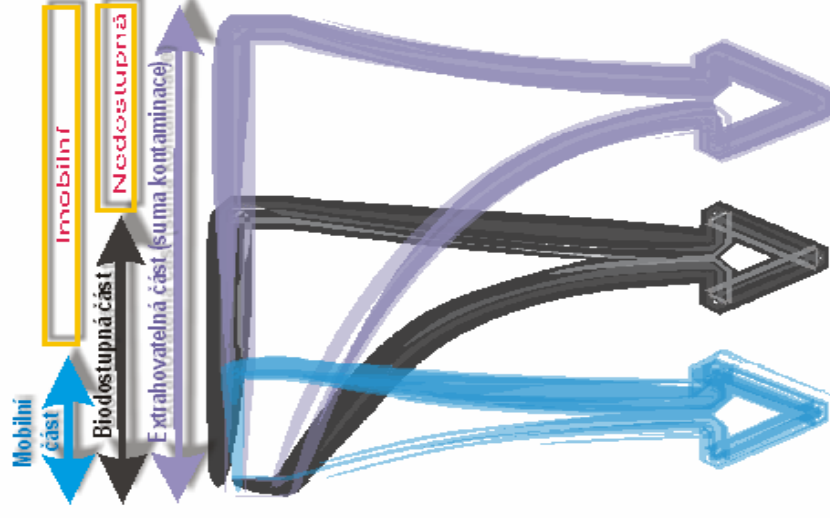
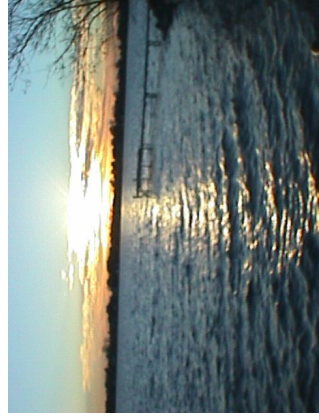
prostředí

- vzorky vzduchu, sedimentů, půd
- rychlý screening znečištění
- hodnocení toxicita, genotoxicita, dioxinová a estrogenní aktivity
- **výběr vzorků pro podrobnější studium/analýzu**
- **spojení s analytickou chemií, frakcionace**

Problém reprezentativního vzorkování, uchovávání vzorku

„pseudopersistentní látky“

– kontinuální expozice nízkým dávkám



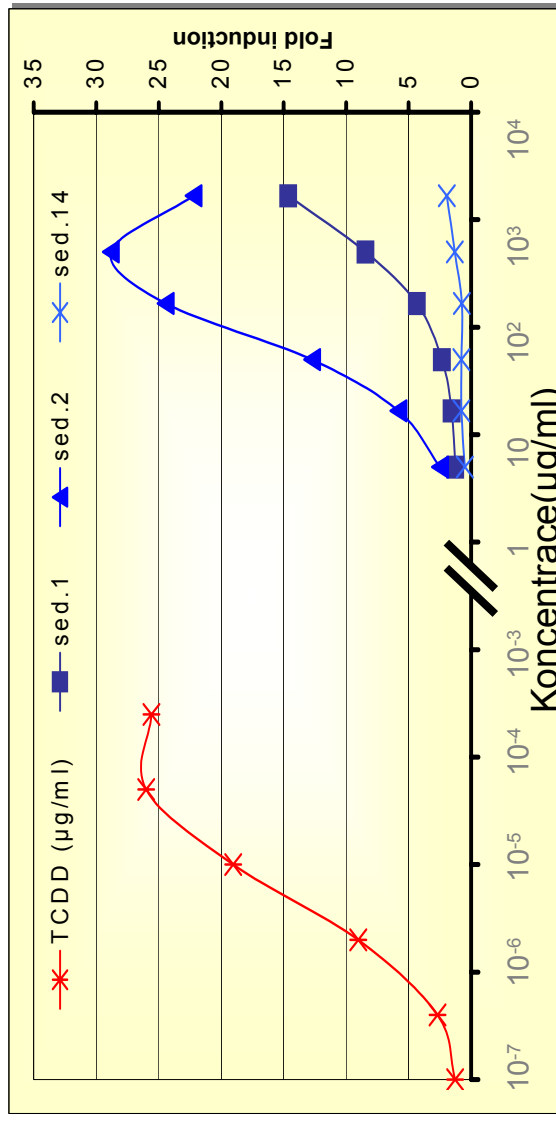
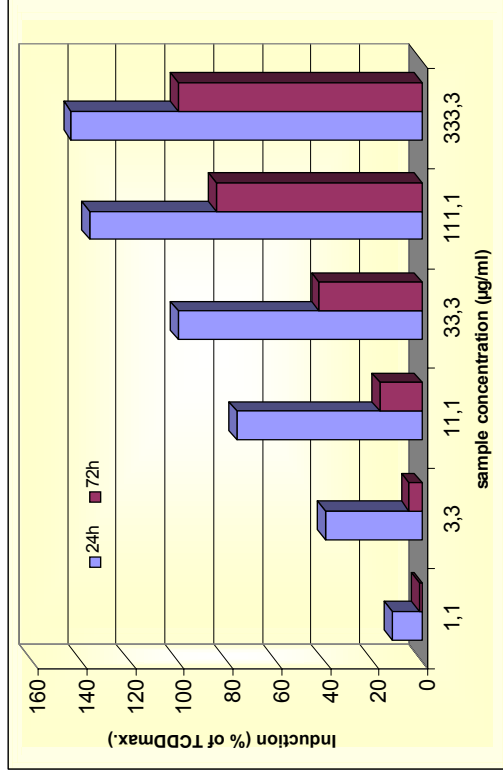
Toxicita vodného výluhu - ve vodě rozpustná (mobilní) část kontaminace

Kontaktní test toxicity - biodostupná část kontaminace

Toxicita organického extraktu - celková (extrahovatelná část) kontaminace

Hodnocení přítomnosti látek se specifickým mechanismem toxicity v komplexních vzorcích. Příklad: AhR-aktivita

- 1) Srovnání toxicity různých vzorků, identifikace problematických
- 2) Identifikace nejdůležitějších toxických látek ve sledované oblasti: PAHs



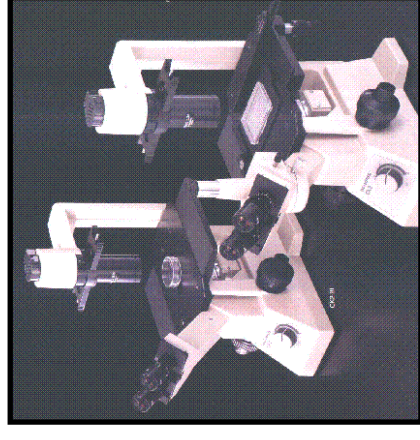
Sample No.	Locality	AhR-activity (TEQ/g sed.)		H ₂ SO ₄ treated (24h)	ER-activity (EEQ/g sed.)		Chemical analysis		
		24 h	72 h		24 h	72 h	TEQ(PAH)*	Σ PAH**	Σ PCB***
1	Litvínov	5363	2939	1419	4347	8650	280	3081	133,5
2	Litvínov	551439	120743	4220	69873	15255	5005	65346	45,6
3	Litvínov	1761	w.i.	w.i.	w.i.	w.i.	169	1941	13,1
4	Zubří	22725	996	w.i.	w.i.	w.i.	641	4207	32,1
5	Chropyně	7426	w.i.	w.i.	w.i.	w.i.	586	3458	9,7
6	Chropyně	7281	1162	w.i.	w.i.	w.i.	1763	10278	37,0
7	Kroměříž	6179	741	w.i.	w.i.	w.i.	911	5263	13,6
8	Otrokovice	19282	1162	10	w.i.	w.i.	1198	9428	14,8

Výhody toxikologických in vitro testů

- rychlost, citlivost, reprodukovatelnost, snadnost provedení, menší náklady
- ukazují celkovou biologickou aktivitu látek, které působí specifickým mechanismem
- možnost provést screening velkého množství vzorků
- mohou poukázat na přítomnost toxikologicky významných látek, které nejsou běžně analyticky stanovovány
- sledují i možné interakce (jako synergismus či antagonismus) působení látek v komplexních směsích

Nevýhody toxikologických in vitro testů

- nezohledňují biotransformaci látek v organismu
- nemohou plně nahradit enzymaticko-imunitní reakci živého organismu
- neposkytují informaci o tom, které jednotlivé látky ze směsí vyvolaly odpověď
- poskytují informaci jen o celkové aktivitě látek působících určitým specifickým mechanismem



Závěr: Testy toxicity na buněčných kulturách jsou vhodný screening před provedením baterie testů na živých organismech.