

Design, vyhodnocení a interpretace biotestů

Klára Hilscherová

RECETOX

www.recetox.muni.cz

Ekotoxikologické testy

Dle trofické úrovně testovacích organismů (baterie)

- producenti
- konzumenti
- destruenti

Dle spektra testovacích organismů

- Jednodruhové
- Vícedruhové (laboratorní směsi kultur či přírodní populace)

Dle typu testovaného vzorku (tox i ekotox)

- čisté chemické látky (hydrofilní, hydrofobní, těkavé)
- směs látek (známých i neznámých)
- přírodní vzorky (většinou neznámé, směsné, s neznámými interakcemi) - nejsložitější interpretace

Eko-Toxikologické testy

Dle testované matrice

- chemická látka
- voda
- půda
- vzduch
- sediment
- odpad

Dle způsobu přípravy vzorku

- definované koncentrace chemických látek
- testování výluhů přírodních vzorků (extrakce org. rozpouštědly, DMSO, vodou, různé pH, teplota atd.) či jejich frakcí
- pasivní vzorkovače - semipermeabilní membrány
- přímé testy (Direct Tests, Solid Phase Tests, Whole Effluent etc.)

Dle stupně komplexnosti detekčního systému

- makromolekuly, enzymy, proteiny, DNA
- buněčné a tkáňové kultury *in vitro*
- intaktní živý organismus
- populace
- micro/mezo kosmos
- terénní experimenty

Dle testovacího uspořádání (akvatické testy)

- Statické
- Semi-statické
- Průtočné

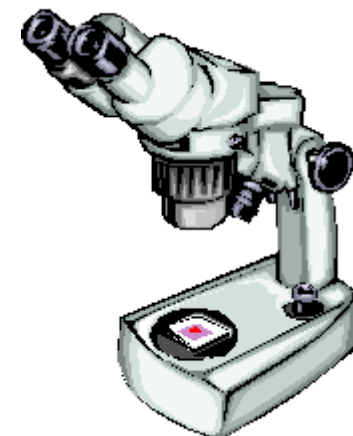
Speciální testy pro hodnocení rizik v životním prostředí

- trofie
- mutagenita/genotoxicita na bakteriích, na rostlinách, volně žijících zvířatech a rybách
- teratogenita, například na obojživelnících - *Xenopus laevis*
- embryotoxicita a reprodukční testy na rybách, korýších, obojživelnících, ptácích, hraboších apod.
- detekce spec. mechanismů (endokrinní disruptory, TCDD apod.)
- biokoncentrace/ biokumulace
- testy pro hodnocení biodegradability

Experimentální design

Základní etapy v experimentální práci

- Stanovení cíle (přesně definovat otázku)
- Výběr vhodné metody (technické řešení)
- Vypracování projektu (kdy, kde, kdo, jak...)
- Technická příprava studie (prostředky, protokoly)
- Pilotní studie (proveditelnost, možná úskalí, N)
- Modifikace projektu
- Vlastní studie (protokoly a pracovní deník)
- Vyhodnocování a interpretace výsledků (statistika, vedlejší výsledky)



Experimentální design

= protokol zahrnující kompletní plán experimentu i hodnocení dat

Toxikologické studie - dva základní cíle:

1. Zjistit, zda studovaný faktor (chemická látka) způsobuje nějaký účinek ve studovaném biologickém systému
2. Zjistit, jak je tento účinek velký/ významný

Objekty zkoumání = **experimentální jednotky**

- sledován vliv různých faktorů na experimentální jednotky

pokusný zásah = kombinace specifické hodnoty všech faktorů, které mohou potenciálně odpověď ovlivňovat



Nezávislá proměnná



Proměnná, která je záměrně měněna experimentátorem
(stimul, podnět)

Závislá proměnná



Proměnná, která charakterizuje odpověď - reakci na podnět

Sleduji vztah mezi testovanými faktory /nezávislé proměnné – např.koncentrace/ a proměnnými, které charakterizují účinek /závislé proměnné/ - odpověď v závislosti na působení toho faktoru

Typy sledovaných parametrů: spojitě

diskrétní /mohou nabývat jen určitých hodnot,
kategorií – např. pohlaví – žena/muž

Základní požadavky experimentálního designu

Reprezentativnost (zobecnitelnost výsledků)

Homogenita souboru (zvyšuje sílu testu)

Základní otázka:

Co jsou cíle a hypotézy studie, jaké otázky chceme zodpovědět?

Stanovení cílů studie (Objectives, Goals) – zjistit, zda.....

Stanovení hypotézy

- Hypotéza = tvrzení, domněnka, jejichž pravdivost se ověřuje pomocí experimentu
- Jaké nové otázky mohou vyplynout z výsledků studie? Mohla by být ta studie uspořádaná tak, aby tyto otázky rovnou zodpověděla?
- **Nulová hypotéza**
= žádný rozdíl mezi kontrolami a pokusným zásahem
- **Alternativní /výzkumná/ hypotéza**
= pokusný zásah způsobuje významný rozdíl mezi skupinami
- **Chyba 1. druhu** = testovaná nulová hypotéza je chybně zamítnuta (zamítneme nulovou hypotézu, i když ve skutečnosti platí). Pravděpodobnost této chyby volíme sami a označujeme ji jako hladinu významnosti (α).
- **P menší než 0,05** ($\alpha = 0,05$)
= pravděpodobnost pravdivosti nulové hypotézy je menší než 5% - zamítáme nulovou hypotézu, platí alternativní hypotéza

Základní principy experimentálního designu

1. **Kontrola** účinků **vnějších** /nestudovaných/ **faktorů** – kontrolní skupina
2. **Náhodnost** alokace organismů do pokusných a kontrolních skupin
3. **Opakování** a opakovatelnost
 - Pokud chci studovat vliv jednoho faktoru /jako koncentrace, doby expozice/ = nutno kontrolovat všechny další proměnné, které by mohly odpověď ovlivnit
 - jeden faktor jedna úroveň = vliv jedné koncentrace po určitém čase
 - většinou testováno několik úrovní sledovaného faktoru
 - Často stanovujeme vliv více faktorů současně = vícerozměrný design = vliv koncentrace na růst řas proměřovaný v čase, další parametry = intenzita záření, teplota

Pokusné a kontrolní skupiny

- porovnání exponované a kontrolní skupiny ze stejné výchozí populace = stejné organismy /buňky/ za stejných podmínek, liší se jen expozicí
- vždy je nutno do pokusu zahrnout všechny adekvátní kontroly
- negativní a pozitivní kontroly

- **Negativní kontroly**

- = blanky bez jakéhokoli zásahu

- = kontroly se slepým pokusným zásahem

- = všechny rozpouštědlové kontroly

- = pokud kombinace rozpouštědel - všechny kombinace

- Když opakované experimenty prokáží, že používané rozpouštědlo nemá v používané koncentraci žádný vliv na sledované parametry, je možno nadále používat pouze rozpouštědlovou kontrolu.

- **Pozitivní kontroly, Standardy**

- **Pokusné zásahy**

- = různé úrovně pokusného zásahu, různých testovaných faktorů

- = případně spárování kontrol a případů /párové testy jsou silnější/

Náhodná alokace organismů z populace do kontrolních a pokusných skupin – před zásahem všechny skupiny stejné = abychom se vyhnuli zkreslení výsledků kvůli rozdílnosti pokusných skupin.

Opakování experimentu na větším počtu objektů ke snížení náhodného rozptylu výsledků

- experimentální jednotky = jednotlivá opakování experimentu – např. ryby v sinicové expozici
- opakování pokusného zásahu
- pokud třikrát opakují měření mikrocystinu nebo biomarkeru v hepatopankreatu ryby – je to pouze opakování stanovení (technické opakování) pro lepší přesnost a pro stanovení opakovatelnosti měření (nejsou nezávislé hodnoty), ale není to opakování pokusného zásahu

Opakování pokusného zásahu na dostatečném počtu experimentálních jednotek, který umožní odhalení systematického účinku
počet opakování – pokud možno stejný ve všech skupinách - stejný počet pozorování pro každou úroveň znaku
Pro maximalizaci síly testu je třeba maximalizovat počet nezávislých opakování – Power analysis (analýza síly studie)

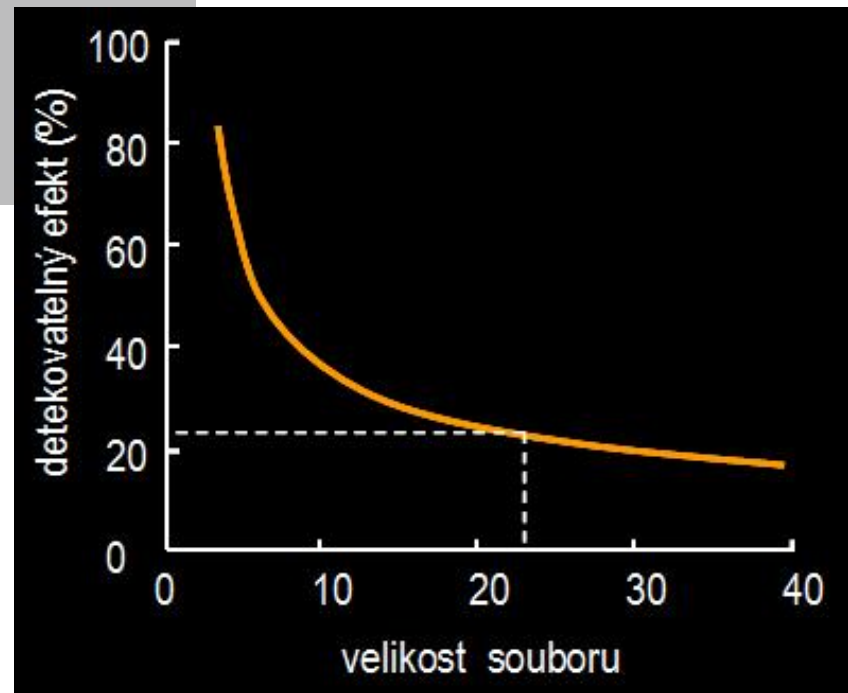
Dostatečná velikost pokusného souboru závisí na:

- variabilitě sledované veličiny
- počtu sledovaných nezávislých faktorů
- technických možnostech
- požadované míře jistoty
- velikosti očekávaného efektu
- Pozor na příliš velké soubory!



Analýza síly studie (power analysis)

- Jak velký rozdíl chceme detekovat?
- Jak velký rozptyl sledovaného parametru je v populaci?
- Určení vhodné velikosti vzorku
- Interpretace negativního výsledku studie



- Umožňuje předem zvolit nebo zpětně kvantifikovat pravděpodobnost chyby II. druhu.

chyba II. druhu = testovaná nulová hypotéza je **chybně nezamítnuta** – ve „skutečnosti“ hypotéza neplatí, ale test ji nezamítne
- její pravděpodobnost se označuje β .

Síla testu (S): $S = 1 - \beta$, tj. pravděpodobnost, že test správně zamítne hypotézu, která ve skutečnosti neplatí, tj. pravděpodobnost, že k chybě 2. druhu nedojde

- Obvykle se považuje za rozumnou hodnota 80%.

Součásti experimentálního designu I.

- **Cíle** studie – co chci zjistit a jak to chci zjistit
- Stanovení nulové **hypotézy** a alternativní /výzkumné/ hypotézy
- Jaký pokusný zásah, jaké **faktory** /**nezávislé proměnné**/, jejichž účinky na experimentální jednotky budou sledovány
- Jaké **sledované parametry** /**závislé proměnné**/, jejichž odpověď na různou úroveň testovaných faktorů budeme sledovat **v jakých časech**
- Přesné **podmínky expozice**
- Naplánování **počtu opakování** a jejich uspořádání v experimentu

Součásti experimentálního designu II.

- **KONTROLY** - zařazení všech nezbytných **kontrol** /pre-test/
- Úroveň studovaného pokusného zásahu – všech faktorů
- Expozice čistou chemickou látkou : koncentrace v zásobních roztocích a pak finální koncentrace v expozici /molární konc./
- nutno znát rozpustnost ve vodě, nesmí být v testu překročena
- Standard /pozitivní kontrola/ - zahrnutí vhodných hodnot standardu
- **Časový design experimentu** – na více časových intervalech v závislosti na charakteru odpovědi, případně optimalizovat dobu expozice

Součásti experimentálního designu III.

- Pokud není hodnocení provedeno přímo po ukončení expozice, určit jak připravit a uchovávat vzorky před analýzou, jak jsou vzorky/standardy/reagenty při daném uchovávání stabilní
- Optimalizovaná metodika měření sledovaných parametrů v odpovědi na expozici /optimalizace předem/
 - koncentrací reagentů
 - množství vzorku
 - doby a teploty inkubace
 - podmínek měření apod.
- Vícefaktorové uspořádání: vliv koncentrace za různých světelných či tepelných podmínek při různých dobách expozice
- Jak budou získaná data hodnocena



Nezbytnost a výhody experimentálního designu

- důkladné promyšlení a naplánování experimentu
- snadná návaznost dalších experimentů – přesně popsány všechny podmínky – pro navazující experimenty netřeba přepisovat, jen překopírovat, doplnit a zvýraznit změny
- přehlednost, snadné dohledání důležitých informací
- výborně využitelné i po delší době pro psaní publikací a pod.
- snadné doplňování, zapisování změn – k designu je nutné doplnit krátký report o průběhu experimentu, pokud něco významného oproti designu – např. velká změna pH nebo teploty apod.
- odkazem možno propojit design na soubor s výsledky

Hodnocení toxických
vlastností:

**Uspořádání a
vyhodnocení eko-
toxikologických testů**

Důležité otázky při každém hodnocení dat:

- Jak dobře je studie provedena?
- Jsou aplikovány a dodrženy standardní metodiky?
- Je použitý test vhodný?
- Jsou výsledné parametry stanoveny za relevantních podmínek?
- Je interpretace dat správná?

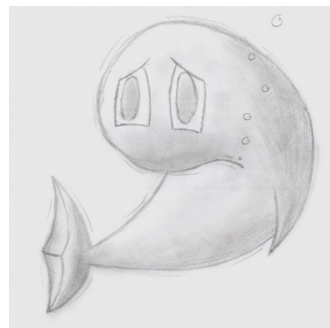
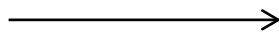
VZTAH DÁVKA-ODPOVĚĎ

Křivka dávka – odpověď:

základní nástroj pro hodnocení toxických vlastností látek

Graf ukazující biologickou odpověď, např. enzymu, proteinu, či organismů na rozmezí dávek (koncentrací) toxické látky

Např.: Křivka mortality - závislost kumulativní mortality na vzrůstající koncentraci



VZTAH DÁVKA - ODPOVĚD

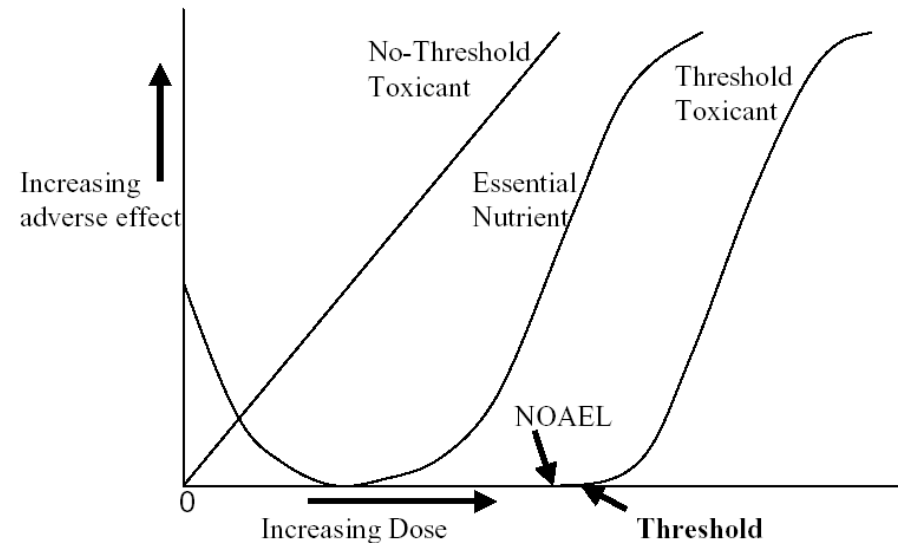
„Všechny látky jsou jedy, záleží pouze na dávce. Správná dávka odlišuje jed od léčiva.“

Paracelsus

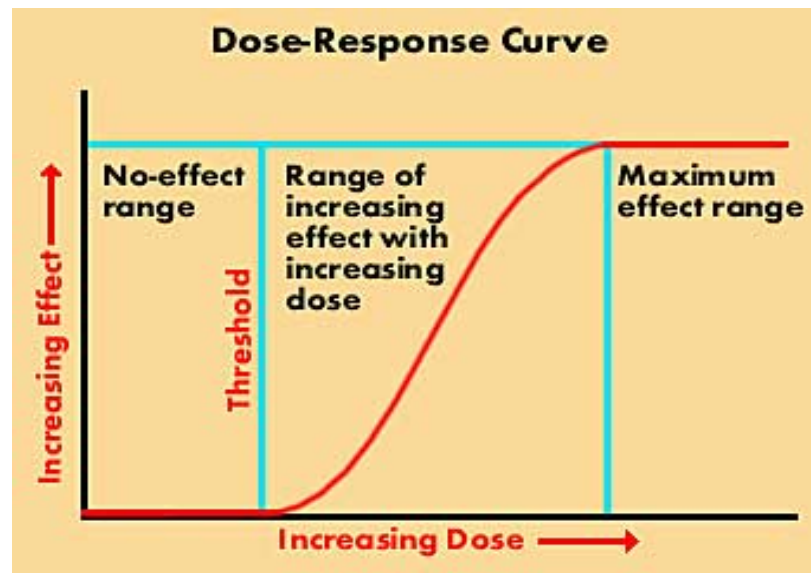
Toxicita látky nezávisí pouze na toxických vlastnostech látky, ale hlavně na její koncentraci/dávce.

Odpověď na stres

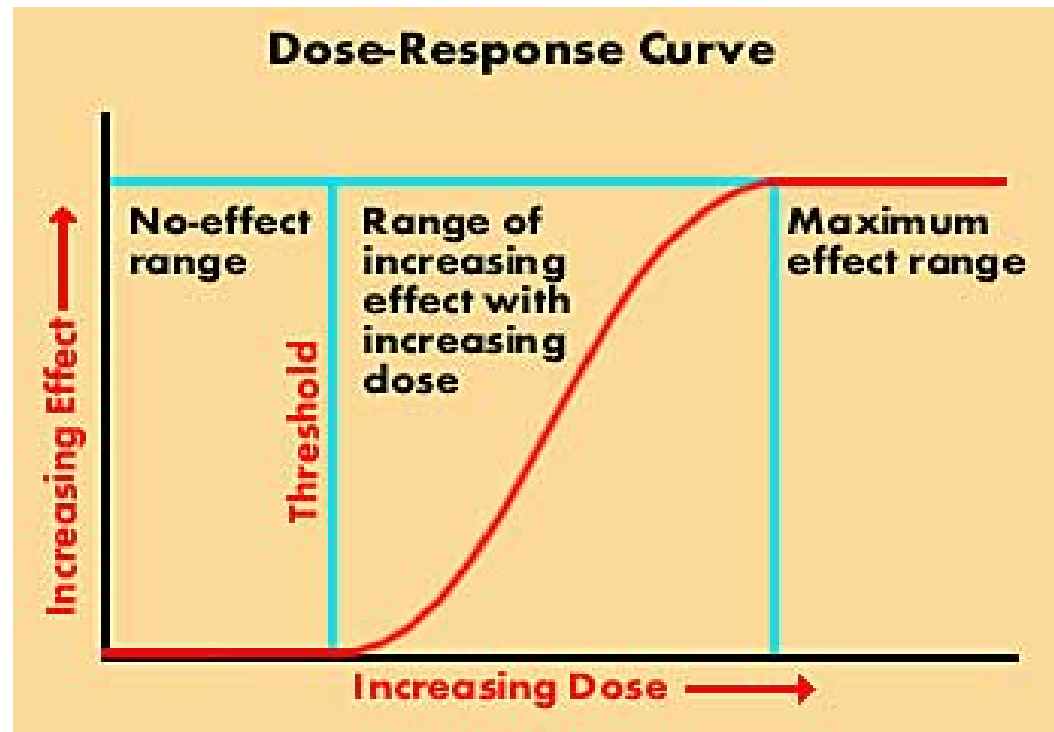
- Prahová – žádná biologická odpověď při nízké dávce, pak se odpověď projeví se vzrůstající dávkou
- Bezprahová – bez biologické odpovědi pouze na nulové koncentraci
- Hormeze – počáteční biologická odpověď na toxikant je pozitivní, při vzrůstu koncentrace se stává negativní, nebo naopak



Křivka dávka – odpověď pro látky s prahovým účinkem



Odpověď na stres prahová



Prahová dávka

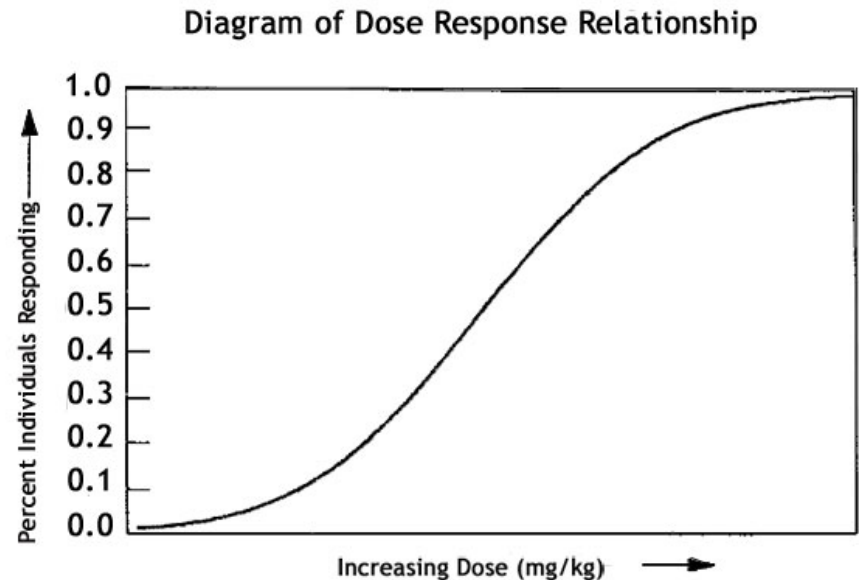
~ dávka, pod níž není možné v exponované populaci detekovat škodlivý účinek toxické látky

(tato dávka platí pro všechny jedince v dané populaci)

~ tzn. dávka pod kterou nedojde k žádnému úmrtí zvířete, k žádným patologickým změnám, k žádným biochemickým změnám ...

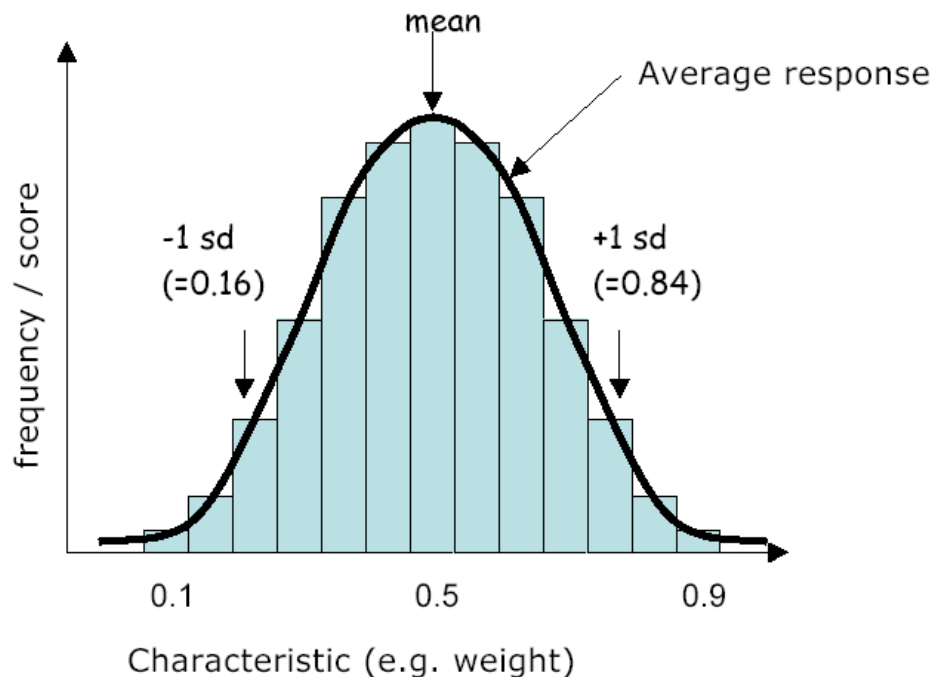
Křivka dávka-odpověď

- čím vyšší dávka, tím vyšší toxický efekt
- dávka určuje biologickou odpověď
- vztah mezi dávkou a účinkem je logaritmický
- po zlogaritmování - grafickým vyjádřením tohoto vztahu je obecně křivka ve tvaru sigmoidy
- z ní je možno odvodit důležité parametry toxicity

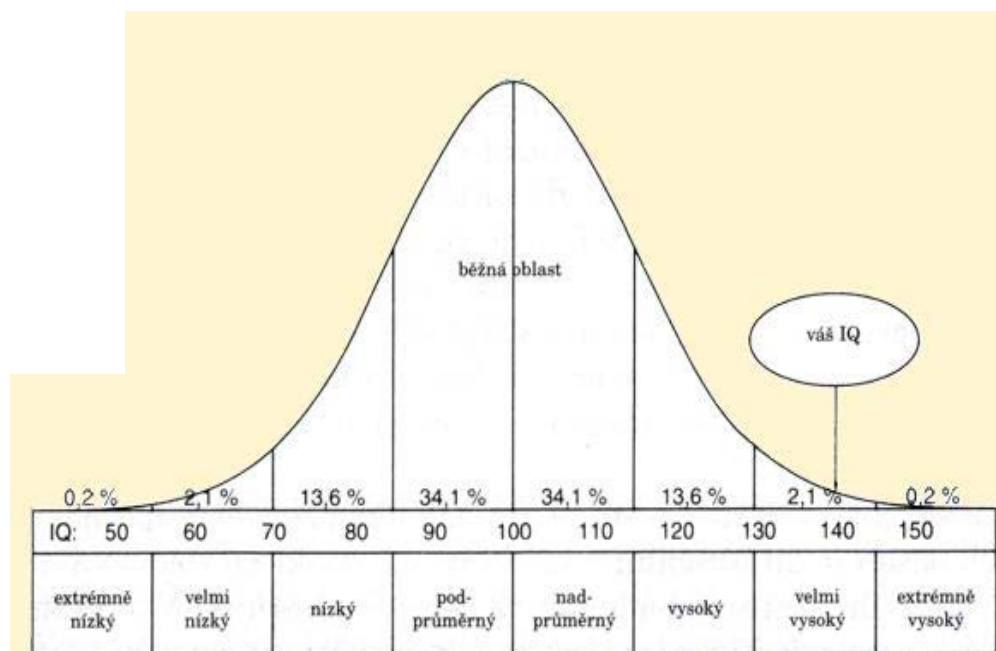


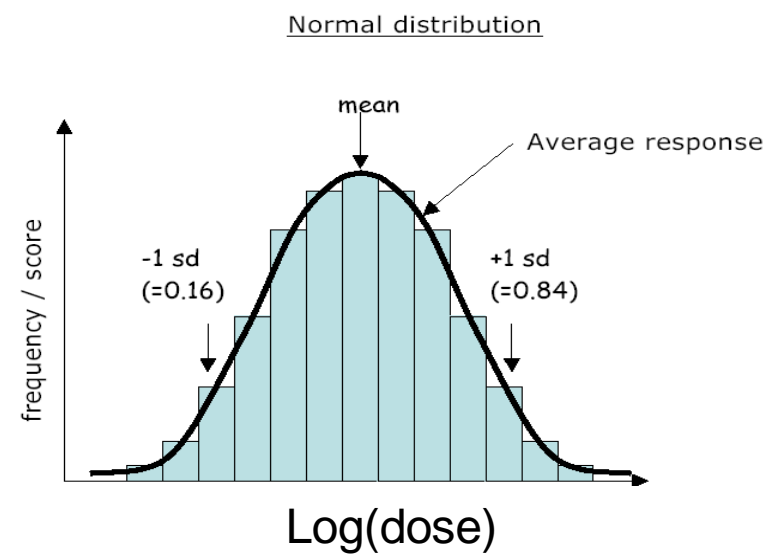
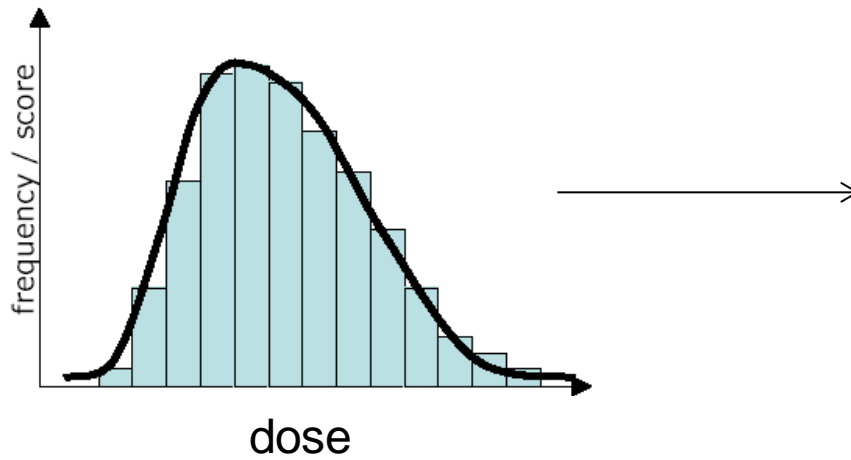
Křivky dávka-odpověď jsou založeny na normálním (Gaussově) rozložení hodnot

Normal distribution



Příklad – rozložení inteligence ve společnosti



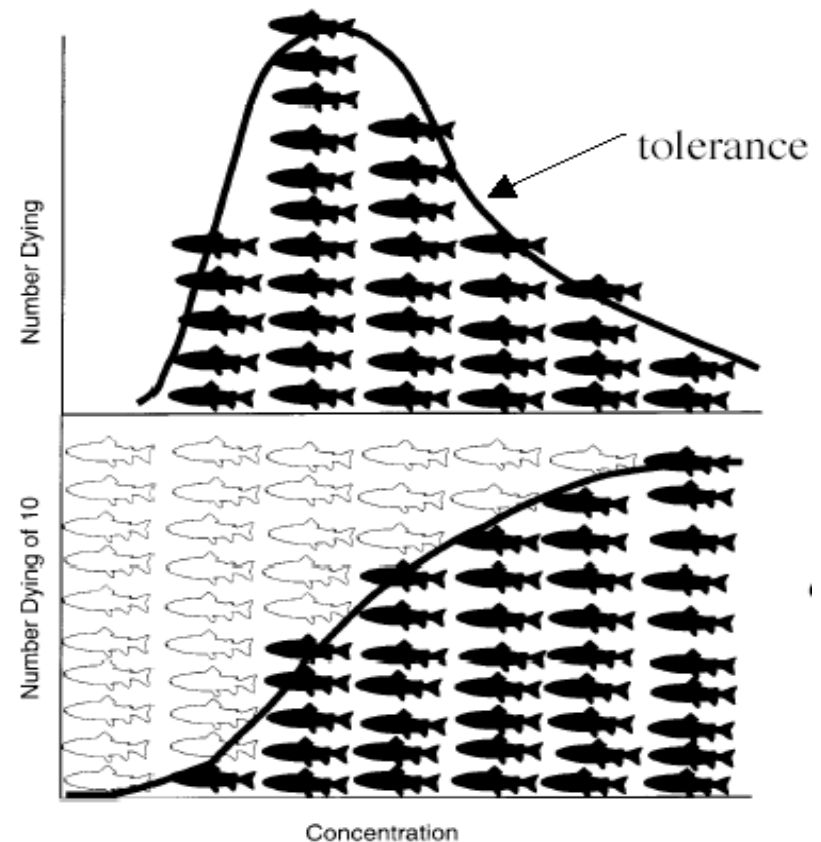


! Populační odpověď na toxické látky je zpravidla skloněná nalevo !

→ Normálnímu rozložení se přiblížíme logaritmickou transformací dávky toxikantu

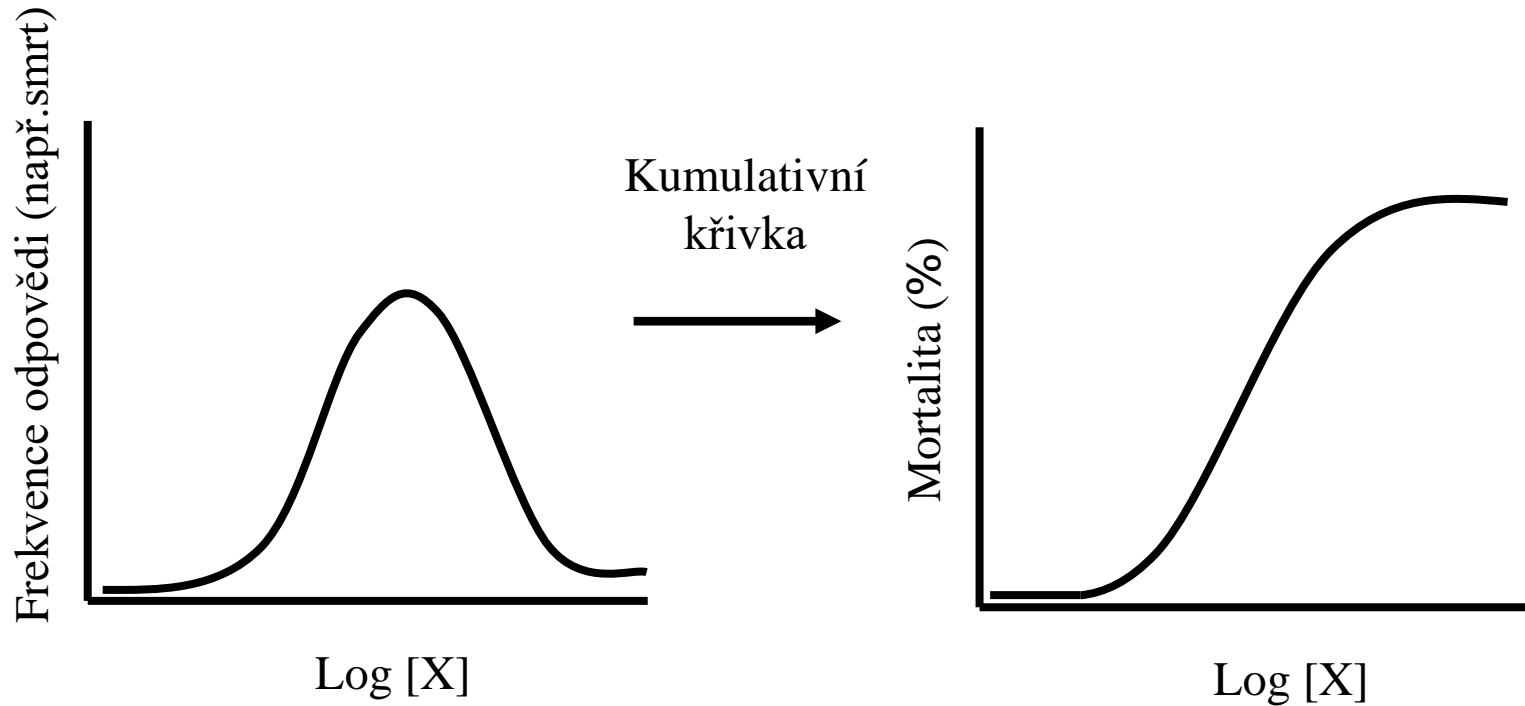
založeno na konceptu individuální tolerance

- ~ individuální účinná dávka (IED) – minimální dávka vedoucí ke smrti jedince
- ~ geneticky určená pro každého jedince



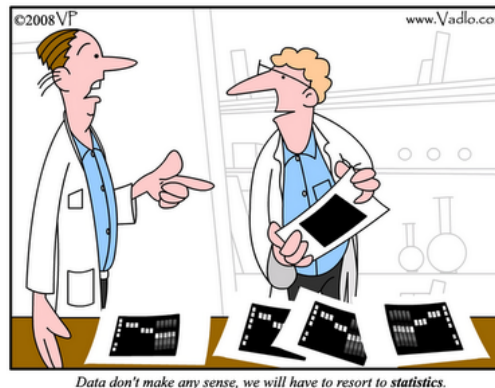
Křivky dávka-odpověď jsou založeny na normálním (Gaussově) rozložení hodnot

Získ typické křivky dávka – odpověď pro prahový účinek:

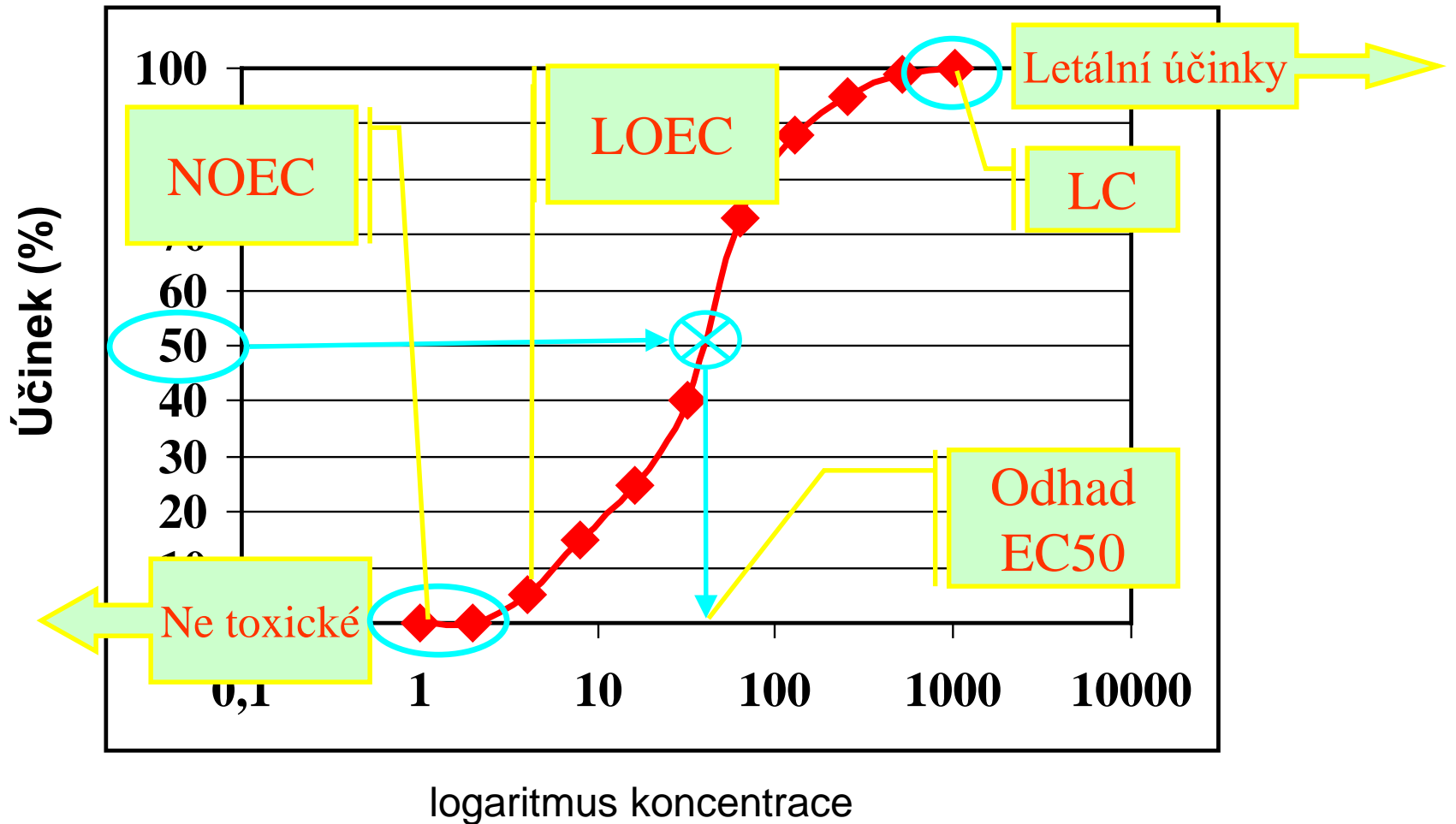


Hodnocení ekotoxikologických účinků

(látky s prahovým účinkem)



Ideální křivka dávka – odpověď



Logaritmické měřítko
Křivka – sigmoidní tvar

Sledované parametry testů toxicity

krátkodobé studie:

- LC50/LD50 (letální koncentrace/dávka pro 50% testovaných organismů)
- EC50/ED50 (účinná koncentrace/dávka pro 50% testovaných organismů)

dlouhodobé studie :

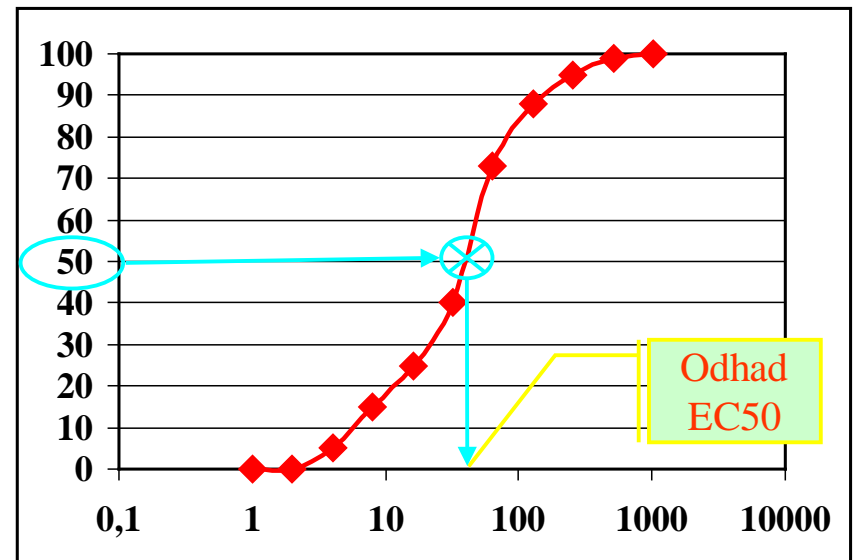
- NOEC, NOEL (no observed effect concentration/dose)
- LOEC, LOEL (lowest observed effect concentration/dose)
- MATC (maximal acceptable toxicant concentration)

další možné :

- EC10 (10 % effects concentration)
- ECx (x % effects concentration)

a) Parametry které mohou být vypočítány z křivky dávka-odpověď

- **LD₅₀** – účinná dávka, která způsobí 50% mortalitu testovacích organismů
- **LC₅₀** – 50% letální koncentrace - účinná koncentrace, která způsobí 50% mortalitu testovacích organismů
- **EC₅₀, ED₅₀** - účinná koncentrace/dávka, která způsobí účinek (snížená reprodukce, růst atd.) u 50% testovacích organismů, či která způsobí 50 % maximálního účinku, 50% odpověď v testovací populaci (mg/L, ml/L...)
- **IC₅₀** – inhibiční koncentrace, která sníží normální odpověď o 50%
- Další zahrnující jinou procentuální změnu (10%, 20%, atd.)
EC05, EC20, EC90, ...
- Rozmezí EC20 – EC80



b) Parametry které se neodvozují z křivky dávka-odpověď

- **NOEC** - No Observed Effect Concentration. Nejvyšší testovaná koncentrace látky, která nezpůsobila statisticky významný účinek v porovnání s kontrolou.
- **LOEC** - Lowest Observed Effect Concentration. Nejnižší testovaná koncentrace látky, která způsobila statisticky významný účinek v porovnání s kontrolou. Nejbližší vyšší koncentrace než NOEC.
- **NOEL** - No Observed Effect Level. Nejvyšší testovaná dávka látky, která nezpůsobila statisticky významný účinek v porovnání s kontrolou.
- **LOEL**
- **NOAEL** - No Observed Adverse Effect Level.
- **LOAEL** – Lowest Observed Adverse Effect Level

