

Experimentální a aplikovaná toxikologie a ekotoxikologie

Klára Hilscherová

RECETOX

www.recetox.muni.cz

		Téma	Přednášející
1	12.9. (po) od 11 hod	Úvod – organizace přednášek a cvičení. Přístupy v eko-toxikologii, principy hodnocení nebezpečnosti látek a vzorků – standardní přístupy, hledání alternativ, etické aspekty, 3R – in vivo, in vitro, in silico, individuální, populační, vícedruhové, ekosystémová úroveň, baterie testů.	Hilscherová
2	21.9.	Experimentální design, plánování a realizace experimentů, závislost odpovědi na koncentraci/dávce a čase, analýza a interpretace výsledků, testy jednotlivých látek, směsí, vzorků,	Hilscherová
3	29.9. (čt) RCX 411 od 10 hod	Uspořádání biotestů a přístupy k vyhodnocení výsledků z křivky dávka-odpověď, koncept rozložení citlivosti druhů, jeho interpretace, principy odvozování environmentálních limitů, limitů v potravinách, využití v hodnocení rizik	Hilscherová
4	5.10.	Legislativní rámec (CSN, ISO, OECD, US EPA), specifické legislativní požadavky na testy ekotoxicity i toxicity (dále značeno eko/toxicity) dle EU, ČR legislativy, REACH. Požadované, doporučené a alternativní testy. Ekotox a toxikologické databáze, jejich použití	Hilscherová
5	12.10.	Ekotoxikologické biotesty s producenty, testy na řasách a makrofytech. Faktory ovlivňující výběr biotestu, testovací design, způsoby vyhodnocení. Testy a vyhodnocování trofie.	Maršálek
6	19.10.	Mikrobiální testy – Testy ekotoxicity a genotoxicity s destruenty.	Čupr
7	26.10.	Ekotoxikologické biotesty – půda	Hofman
8	2.11.	Testy ekotoxicity s konzumenty – Ekotoxikologické biotesty s bezobratlými, Testy na včelách, Ekotoxikologické biotesty s obojživelníky, s rybami – akutní, chronické, embryonální, bioakumulační	Hilscherová
9	9.11.	Ekotoxikologické biotesty s ptáky, toxikologické testování na savcích, legislativa, 3R, alternativní přístupy	Hilscherová
10	16.11.	In vitro přístupy, biodetekční nástroje v ekotoxikologických biotestech – MIE, vývoj pokročilých buněčných systémů (3D, co-culture, mikrofluidika), HTS, HCA, TOXCAST, Tox21	Hilscherová
11	23.11.	Mikrokosmy, mezokosmy, in situ testy, biologické systémy včasného varování	Maršálek
12	30.11.	Eko/toxikologické metody vs. koncept AOP (dráhy škodlivého účinku) – od molekul po ekosystém Testování potenciálu endokrinní disrupce, EDSP program, OECD Framework – propojení od in vitro screeningu přes jednoduché in vivo testy k těm komplexnějším.	Hilscherová
13	7.12.	Biomarkery a histologické analýzy v biotestech a v terénních studiích, představení OMIC přístupů - úvod	Hilscherová
14	14.12.	představení OMIC přístupů 2, prediktivní eko/toxikologie, QSAR, read-across, extrapolace mezi druhy a látkami, PBPK, modelování účinků směsí	Hilscherová

Toxikologie

- věda, která se zabývá studiem nepříznivých účinků chemických, fyzikálních a biologických agens na živé organismy a ekosystémy včetně prevence a léčby těchto nepříznivých účinků. (Society of Toxicology)

- v užším slova smyslu - věda, která se zabývá škodlivými účinky chemických látek na živé organismy včetně jejich buněčných, biochemických a molekulárních mechanismů a odhadem jejich možného výskytu.

Hlavním cílem toxikologie je zjištění škodlivých a nežádoucích biologických vlastností (toxicity) chemických sloučenin i jejich směsí.

K jejím hlavním cílům patří stanovit bezpečné dávky a určit mechanismy působení biologických účinků chemických látek. Hledá preventivní opatření na ochranu před jejich škodlivými účinky, a pokud již k otravě dojde, pak také účinné způsoby diagnostiky a léčby.

Ekotoxikologie

Vědní disciplína zabývající se studiem toxického působení látek a faktorů antropogenního či přirozeného původu na živé organismy, jejich populace a společenstva.

Cíl: poznat interakce mezi živými organismy a chemickými látkami v prostředí na všech úrovních a využít těchto znalostí pro ochranu přírodních druhů a společenstev (celý ekosystém), predikce účinků

Toxikologie	Ekologie	Ekotoxikologie
Chránit člověka před toxickými účinky látek	Sleduje vztahy mezi organismy a mezi organismy a prostředím	Chránit populace mnoha druhů před toxickými účinky
Vychází z pokusů na zvířatech	Vychází z terénních studií	Využívá různé citlivosti druhů (bakterie, rostliny, bezobratlí, obratlovci)
Definuje mechanismy působení	Sleduje fyziologické stavy (teplota, vlhkost, světlo aj.)	Sleduje nefyziologické stavy (působení stresorů)
Standardizované testovací metody	Ekologické studie	Mnoho metod, málo standardních

Cílem toxikologie je vyvíjet a používat takové metody, které umožňují sledovat nepříznivý vliv látek na člověka za standardních, reprodukovatelných podmínek.

Cílem ekotoxikologie je vyvíjet a používat takové metody, které umožňují sledovat nepříznivý vliv látek na živé organizmy za standardních, reprodukovatelných podmínek.

Metody musí umožnit srovnání účinků různých látek či u různých organizmů mezi sebou a především srovnání odpovídajících výsledků z různých laboratoří.

- testy (eko)toxicity

Koncept eko-toxikologie

Sleduje změny na různých úrovních biologické organizace:

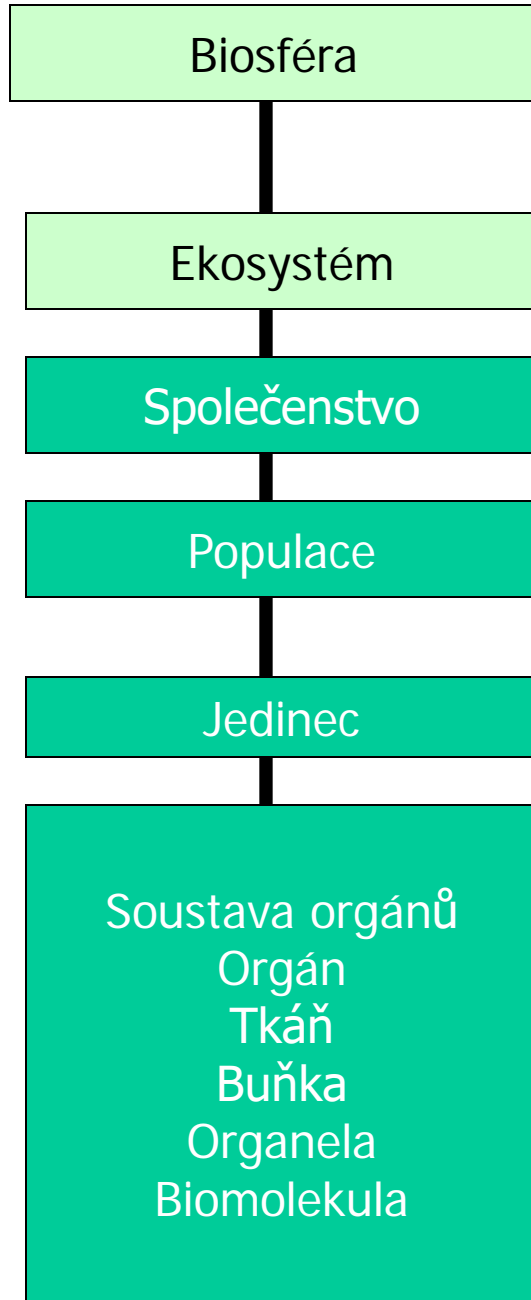
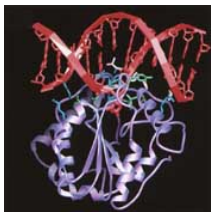
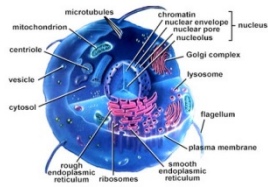
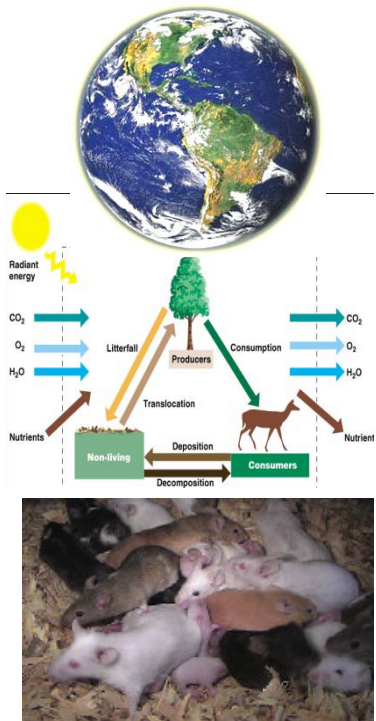
Molekuly - geny - buňky - orgán - organismus - populace
- společenstvo - ekosystém - biosféra

Růst - rozmnožování - interakce - metabolismus

Hlavní cíl:

Poznání interakcí mezi živými organismy a stresory v prostředí na všech úrovních

Využití těchto poznatků pro ochranu lidského zdraví (toxikologie), živých organismů, jejich populací, společenstev a ekosystémů



NÍZKÁ

VYSOKÁ

Ekologická
relevance
Trvání odpovědi
Dlouhodobější
následky

Flexibilita
Schopnost určit
příčinu
Specifita
Citlivost

VYSOKÁ

NÍZKÁ

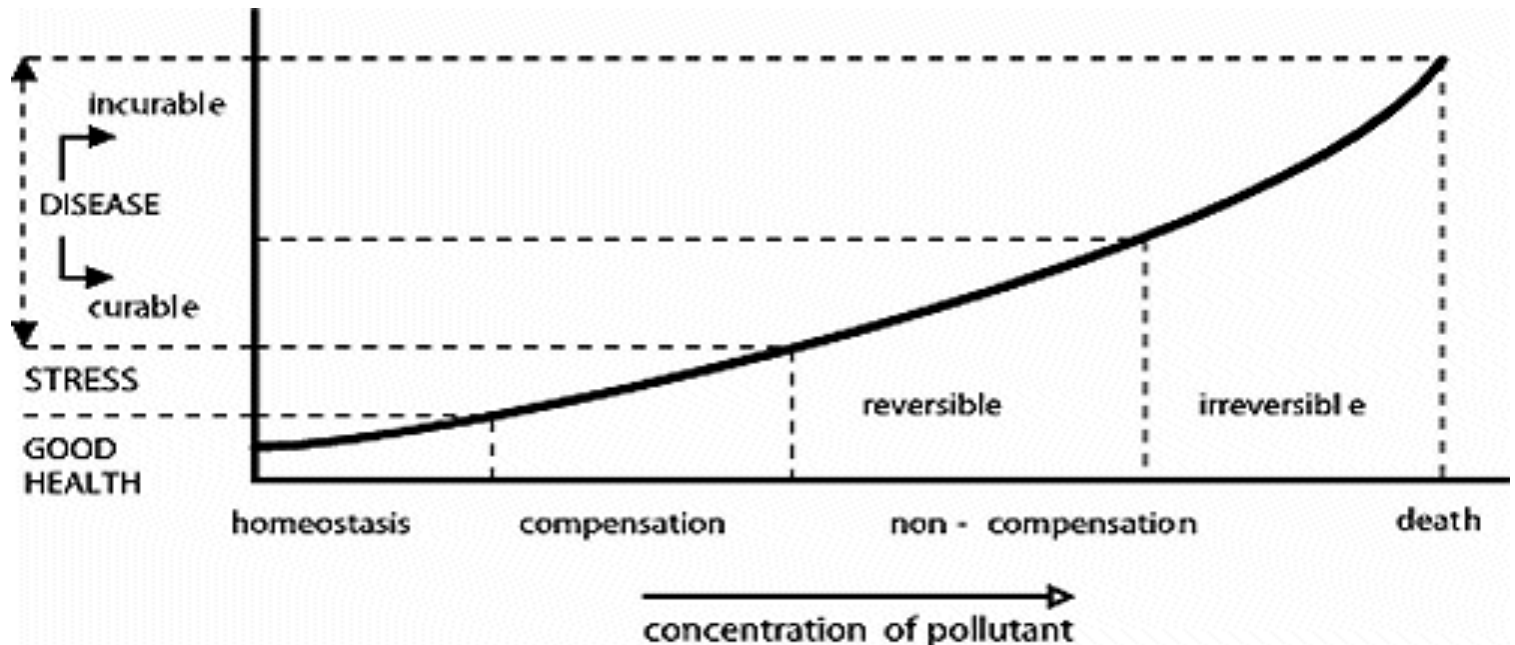
Stresory a jejich vliv

Stres: stav mobilizace obranných a nápravných procesů vůči podnětům přesahující obvyklý rozsah homeostázy a odpověď na podněty, které vytvářejí abnormální podmínky

Stresor: každý faktor či situace, které vedou k mobilizaci vnitřních rezerv a využívání abnormální energie pro udržení rovnováhy a stability (jedince, populace, ekosystému)

Poplachové stadium - resistance - vyčerpání

Opakované působení stresu může vést k **adaptaci**



Stres v prostředí

Fyzické změny prostředí

úpravy vodních toků, stavby vodních děl, železnic, silnic, průmyslových a obytných objektů. Změny užívání půdy.

Vnášení nepůvodních druhů, nových organismů (**GMO**)

Uvolňování cizorodých látek a změny poměrů přírodních látek: globální změny - ozonová díra, skleníkový efekt, změny hydrologických poměrů. Změny přírodních ekosystémů, eutrofizace, toxicita pro živé organismy.

→ Chemický stres

Toxikanty: chemické látky uvolňované do prostředí, které mohou působit toxicky v relativně nízkých koncentracích a poškozovat ekosystém.

Antropogenní původ: průmyslové produkty, odpady, pesticidy a další látky v zemědělství, farmaceutika, domácí chemie, ropné produkty atd.

Přirozený původ: toxiny sinic - eutrofizace

Vnášení látek do prostředí

Zemědělská činnost: pesticidy, hnojiva

Průmyslová činnost: výrobky, vedlejší produkty výroby, odpady

Komunální činnost: odpady, spalování domácích odpadů

Produkty spalování

Doprava: emise, otěry, úniky, havárie

Humánní a veterinární léčiva, domácí chemie

Expozice chemickým látkám může pocházet z mnoha zdrojů:

- Environmentální
- Pracovní
- Terapeutická
- Dietární
- Náhodná, nehody
- Záměrná, úmyslná

Osud látky v prostředí

Distribuce - transformace:

Kompartmenty:

Akvatická: biota/voda, sediment/voda

Terestrická: atmosféra/biota, atmosféra/půda, biota/potrava. Biomagnifikace

Atmosférická: dálkový transport, fotochemické reakce

Transformace: biodegradace - dosažení rovnováhy

Změna struktury, degradace na menší molekuly (až CO_2 a H_2O)

Detoxikace/bioaktivace - vznik toxičtějších produktů

Biologické systémy

Toxikokinetika: co dělá organismus s látkou

příjem - transport - distribuce - metabolismus - eliminace

Toxikodynamika: co dělá látka s organismem

Biochemické interakce s receptorovými místy

Toxikologické projevy na úrovni:

Molekulární - buněčné - orgánové - organismální

Ekotoxikologie:

Efekty na úrovni populace a společenstev

Toxikokinetika - Vstup látek do organismu

(inhalace, ingesce, tělním povrchem) - distribuce k jednotlivým orgánům - interakce s cílovým orgánem

Jednobuněčné organismy:

Pasivní difuze přes membránu, selektivní vstup přes transportní systémy

Vícebuněčné organismy/řasy:

Difuze přes membránu a mezi buňkami

Terestrické rostliny:

Rozpuštěné ve vodě/půdě: vstup kořeny, listy

Plynné látky: vstup listy

Lipofilní látky: voskovou kutikulou

Toxikokinetika - Přívod látek do organismu:

živočichové:

Potrava, voda (biotransformace, mikroflóra)

Respirace:

Trachea u hmyzu, žábry, plíce

Povrch těla (větší význam u vodních organismů)

Toxikokinetika - transformace

Detoxikace, indukce biotransformačních systémů (u živočichů i rostlin)

Biotransformační schopnosti mikroflóry

Uložení xenobiotik:
v inertních tkáních

Živočichové: tuk, zuby, vlasy, rohy

Rostliny: vakuoly, kůra, listy (opadání)

Exkrece:

Močí, žlučí, střevem, dýchacími cestami

Vodní živočiši: žábry, žluč

Rostliny: ukládání ve vakuolách, vylučování plyných látek

Faktory ovlivňující osud, distribuci a toxicitu látek

- Chemicko - fyzikální faktory
- Koncentrace
- Rozpustnost ve vodě a v tucích
- Struktura látky
- Perzistence
- Faktory prostředí - teplota, vlhkost, intenzita světla, kontaminace prostředí

Vlastnosti toxikantů

Fyzikálně-chemické: rozpustnost, odpařování, transformace

Biochemické: bioakumulace, biotransformace, potenciace (inhibice detoxikace, zvýšení metabolické aktivace)

(Pato)fyziologické: letalita, subletální účinky, poruchy reprodukce atd.

Ekologické: zásah do klíčových procesů v ekosystémech - fotosyntéza apod.

Dávka – množství látky přijaté sledovaným biologickým objektem. Závisí na:

- * Expoziční koncentraci
- * Vlastnostech látky
- * Frekvenci expozice
- * Době trvání expozice
- * Expoziční cestě/ způsobu expozice

TOXICKÝ ÚČINEK

biologická odpověď na nepříznivé působení chemických látek na živý organismus
– může být na molekulární, buněčné, orgánové nebo organismální úrovni

= odpovídá množství chemické látky, které pronikne do organismu - dávce.

Projevy a míra toxického účinku závisí na :

1. vlastnostech toxické látky
2. charakteristikách biologického systému
3. parametrech expozice
4. na způsobu kontaktu chemické látky s organismem, bráně vstupu
5. dalších vlivech – vnější podmínky, fyzikální faktory, infekce, další stresory

Oblasti (eko)toxikologie:

- **Popisná** – zabývá se testováním a hodnocením toxicity látek, jejich nebezpečnosti. Je zaměřena buď jen na člověka (toxikologie - účinky polutantů, léků, drog, aditiv) nebo na jiné organismy (ekotoxikologie – účinky polutantů - ryby, ptáci, rostliny).
- **Mechanistická** – studuje mechanismy toxických účinků látek, převádí laboratorně stanovené vlastnosti (na zvířatech) na možné účinky na člověka či jiné cílové organismy. Uplatňuje se při vyhledávání alternativních látek a při terapii otrav, predikci účinků netestovaných látek, spolupůsobení látek ve směsích.
- **Regulační** – stanovuje praktickou použitelnost dané látky tak, aby nepůsobila toxicky. Pomáhá stanovit limitní hodnoty pro různá média a prostředí.

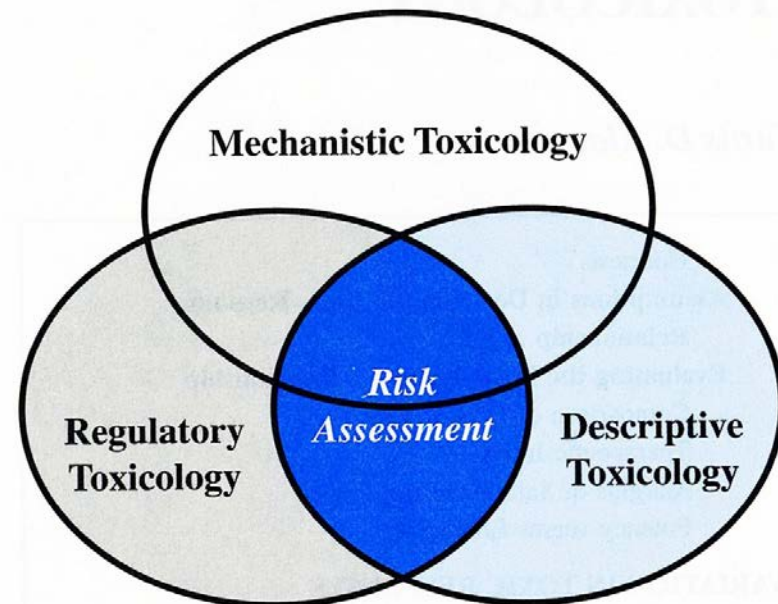


Figure 2-1. Graphical representation of the interconnections between different areas of toxicology.

Prospektivní a retrospektivní (eko)toxikologie

Prospektivní - prevence znečištění prostředí,
testování nových chemických látek
před jejich použitím

- zhodnocení míry humánního či ekologického rizika
při použití nových látek a pro využívání a
recyklace odpadů

Retrospektivní - hodnocení již používaných chemických látek

- hodnocení starých zátěží
- sledování varovných příznaků nežádoucích
účinků (náhlé úhyny, změny biodiverzity apod.)

Typy empirických studií v eko-toxikologii

- **pozorovací studie** - pozorování objektů a měření proměnných, bez pokusného zásahu
- **experimentální studie** (intervenční studie) – studium účinků specifických pokusných zásahů, které nás zajímají. Můžeme kontrolovat prostředí pokusného zásahu, a držet na konstantní úrovni faktory, jejichž vliv nás momentálně nezajímá, ale které by mohly ovlivnit výsledky

Vysoké náklady (na čas, materiál, práci, etické aspekty) – každý experiment by měl získat co možná nejvíce informací k zodpovězení studované otázky

- Experimentální design (viz. přednáška č.2)

Zjišťování toxicity látek a materiálů

Případové, terénní a epidemiologické studie (retrospektivní i prospektivní)

- v pracovním prostředí
- v životním prostředí
- v důsledků havárií apod.
- záměrná kontrolovaná expozice

Epidemiologické studie
Terénní studie



Klinické studie
Řízené polní pokusy

Experimentální metody (prediktivní)

- Experimenty s živými organismy – *in vivo*
- Experimenty s částmi živých organismů – *ex vivo*
- Experimenty s *in vitro* modely

Počítačové simulace a modelování – *in silico* (prediktivní)

- metody předpovědi toxicity