

**Experimentální a aplikovaná toxikologie a  
ekotoxikologie**  
**Experimentální přístupy a design**

Klára Hilscherová

RECETOX

[www.recetox.muni.cz](http://www.recetox.muni.cz)

# 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

# Experimentální toxikologie



**Biotest = proces**, při němž je testovací systém (tkáň, organismus, populace apod.) exponován v přesně definovaných podmínkách různými koncentracemi zkoumané chemické látky nebo směsného či přírodního vzorku.

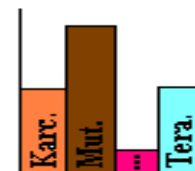
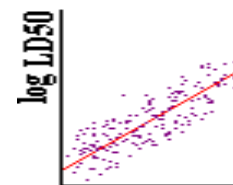
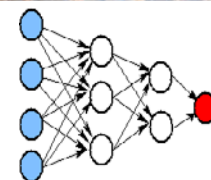
## Experimenty s živými organismy – *in vivo*

- nejčastěji používané, všechny vývojové stupně (bakterie až savci)
- standardizované metody – EU legislativa, Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) a International Organization for Standardization (ISO)

## Experimenty s částmi živých organismů – *ex vivo & in vitro*

- Izolované orgány
- Tkáňové kultury
- Buněčné organely a extrakty
- Purifikované biomakromolekuly

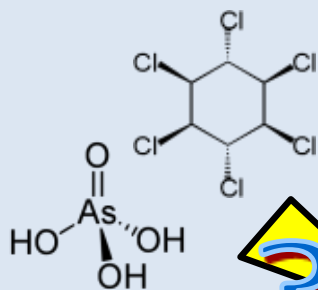
Minimalizace počtu experimentálních zvířat  
(metody *in silico*, stanovení výpočtem na základě matematických modelů – prediktivní toxikologie)



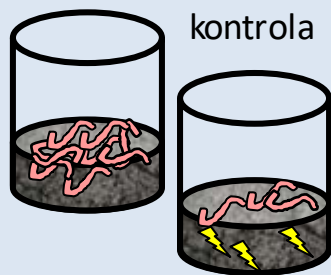
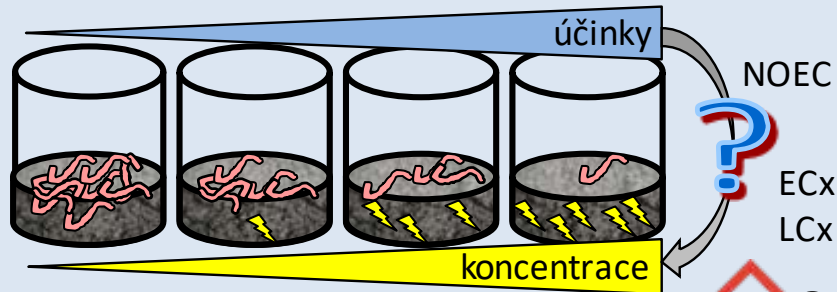
# Využití tox./ekotox. hodnocení

## PROSPEKTIVNÍ PŘÍSTUP

experimenty



biotesty  
látek či  
vzorků



mikrokosmy  
mesokosmy



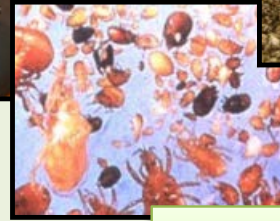
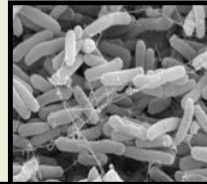
řízené polní  
pokusy



# Využití tox./ekotox. hodnocení

## RETROSPEKTIVNÍ PŘÍSTUP

pozorování, popis, analýza



Vlastnosti prostředí

kontaminace  
(monitoring)

bioindikace  
(biomonitoring)

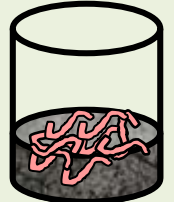
TRIAD

kauzalita

biotesty  
vzorků

testovaná  
půda

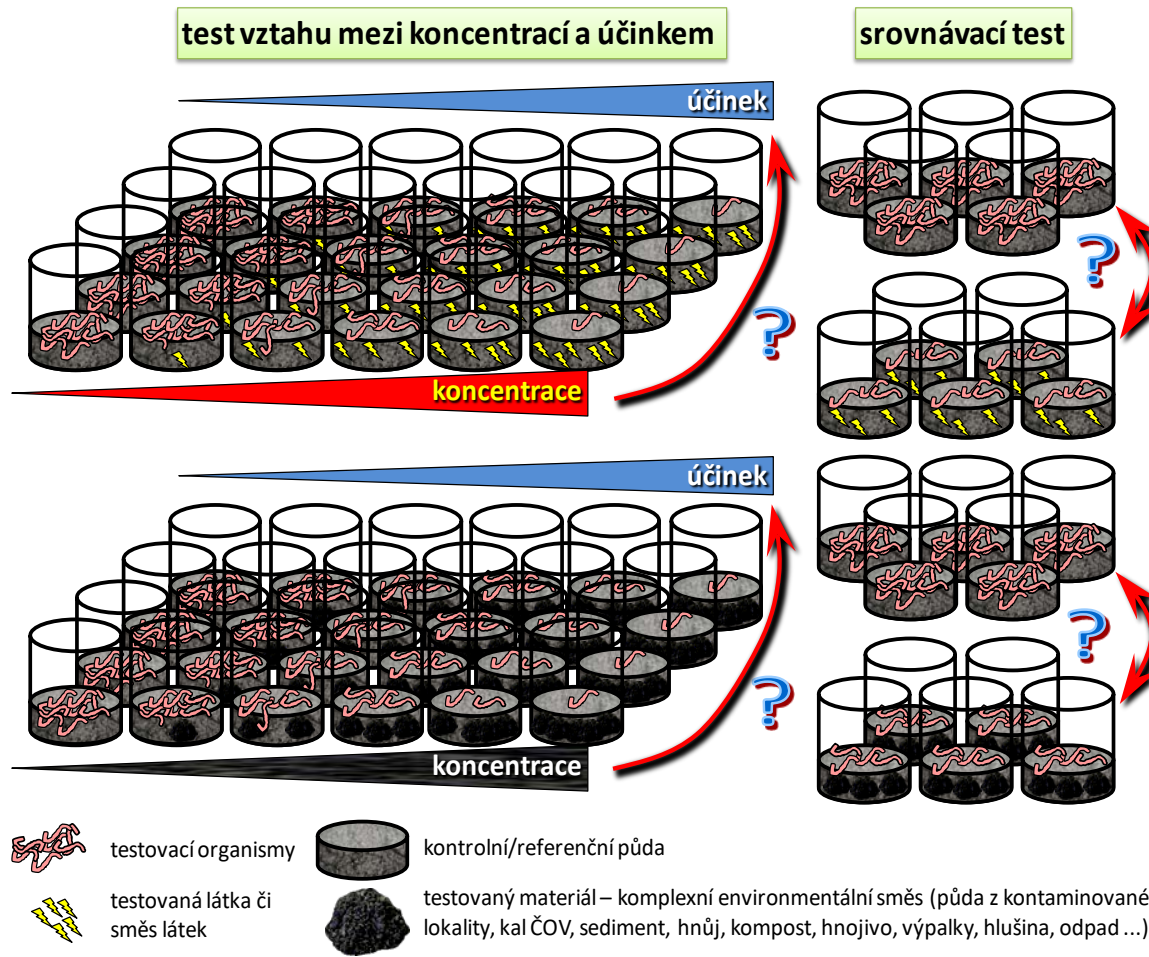
kontrolní  
půda



# Typy testů eko-toxicity

## dle experimentálního uspořádání

- limitní test
- srovnávací test
- test vztahu koncentrace – účinek, předběžný → finální





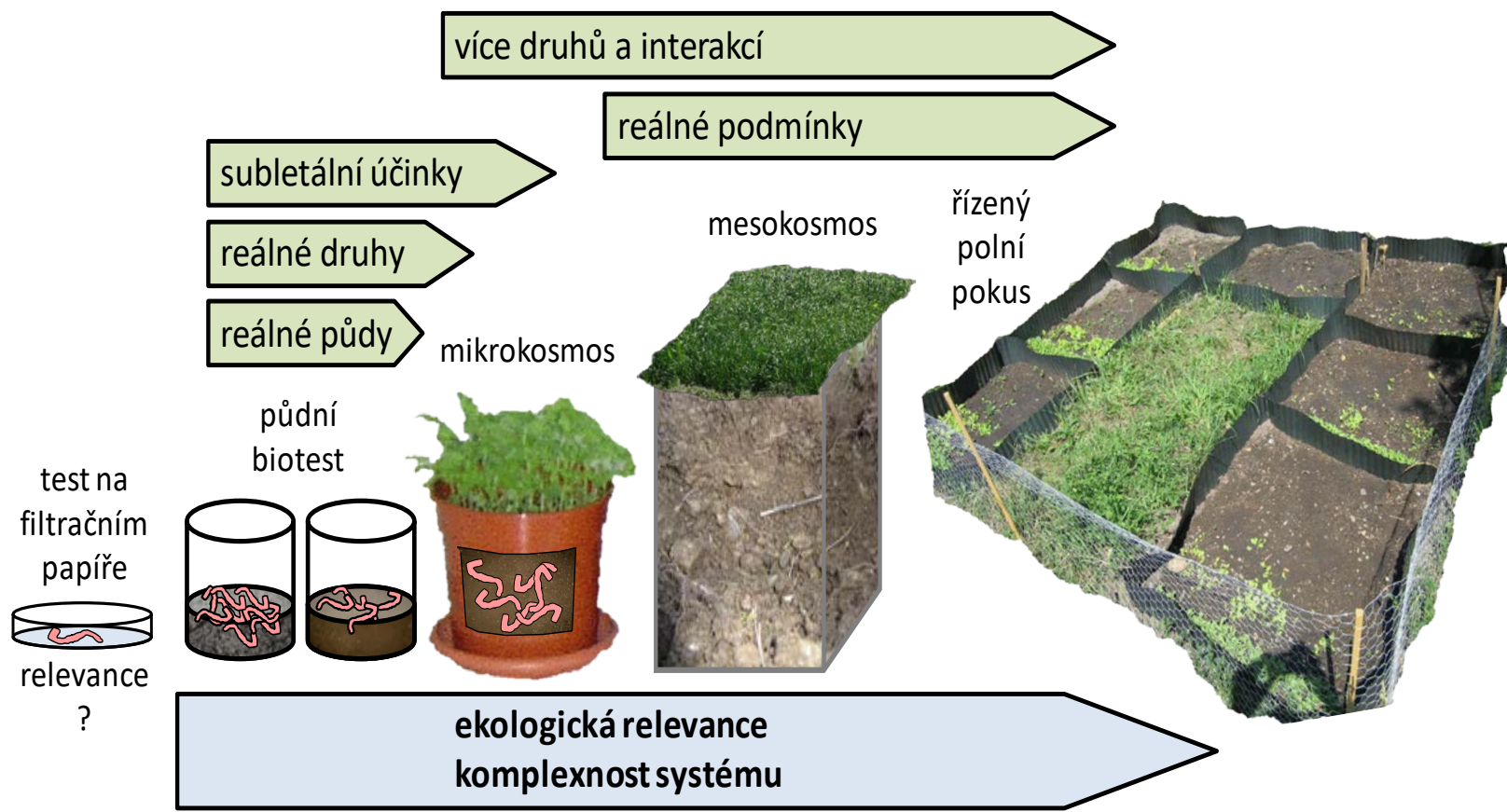
# Biotest vs. reálný ekosystém

laboratorní test - modelový druh, modelová environmentální matrice, standardní sledované parametry

zvýšení ekologické relevance testu (tj. přibližování se reálnému ekosystému)

- použitím reálné matrice, reálných druhů, reálných podmínek, zapojením subletálních parametrů, prolongací testů apod.

Čím vyšší je tato relevance, tím nižší je potřeba výsledky testu před použitím pro odhady rizika pro reálné ekosystémy nějak upravovat, extrapolovat a podobně.





# TOXIKOLOGIE & EXPERIMENTY NA ZVÍŘATECH

- Eticky diskutabilní - tlak odborné i laické veřejnosti
- **Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely**  
aktivní podpora vývoje, validace a zavádění metod v souladu s 3R principem
- **„Cosmetic Directive“ 76/768/EEC**  
platí zákaz testování kosmetických produktů a přísad na zvířatech a zákaz marketingu takových produktů v EU
- **ECVAM JRC** European Centre for Validation of Alternative Methods, Joint research Centre, EU, Ispra, Itálie
- **USA** – zákony na státní úrovni (California, New Jersey, New York)



# 3R princip - zásady práce s pokusnými zvířaty

Russel a Burch (1959)

## Replacement (nahrazení in vivo experimentů alternativami)

- pokus se provádí na zvířeti jen tehdy, neznáme-li žádnou alternativu, jinak dáme přednost alternativě (tkáňové kultuře atd.)
- využití databází a počítačových programů – QSAR, rešerše, .....
- testy „*in vitro*“ - tkáňové kultury, bílé krvinky, jaterní buňky, testy na nižších organismech (bakterie, řasy, červi, houby, kvasinky, hmyz, semena rostlin)

## Reduction (snížení spotřeby laboratorních zvířat)

- racionální a efektivní využití laboratorních zvířat
  - screeningové a pilotní studie
  - vhodný statistický design studie
  - nahrazení „skupinových testů“ individuálními
- zmenšení počtu zvířat, délky pokusu, pokus se nesmí na stejném zvířeti znovu opakovat
- alternativy „klasických“ testů toxicity, použití technik „Acute toxic class“ „Up and down procedure“ .....

## Refinement (zjemnění)

- provádět testy tak, aby docházelo k co nejmenšímu utrpení zvířat
- dobrá obživa, adekvátní zacházení školenými pracovníky, prostor pro život, pokusy v anestézii, nepoužívat extrémní koncentrace (dermální testy)

# 3 R PRINCIP

## Ochrana zvířat a etika práce s laboratorními zvířaty

- **Zákon č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání** - novelizován zákonem č. 359/2012
- **Vyhláška č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat**, ve znění pozdějších předpisů

**Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU** o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely

- použití minimálního počtu zvířat, při němž lze zajistit spolehlivé výsledky, co nejšetrnější metody
- upravuje odbornou přípravu k získání kvalifikace a odborné způsobilosti pracovníků provádějících experimenty na zvířatech – musí absolvovat náležité vzdělání a odbornou přípravu

Doporučení Komise týkající se pokynů pro umístění zvířat používaných pro pokusné a jiné vědecké účely a péči o ně (2007/526/ES)

- stanoví podmínky chovu a ochrany pokusných zvířat

# Ochrana zvířat a etika práce s laboratorními zvířaty

## státní orgány ochrany zvířat v České republice:

- **ministerstvo zemědělství ([www.eAGRI.cz](http://www.eAGRI.cz))**

### **Výbor pro ochranu zvířat používaných pro vědecké účely (VOZPVU)**

- poradenství, pokud jde o získání, chov a umístění pokusných zvířat, péči o ně a používání pokusných zvířat k pokusům

<http://eagri.cz/public/web/mze/ochrana-zvirat/kontakty/vybor-pro-ochranu-zvirat-pouzivanych-pro/>

### **Ústřední komise pro ochranu zvířat (ÚKOZ) - výbor pro ochranu pokusných zvířat (VOPZ)**

<http://eagri.cz/public/web/mze/ochrana-zvirat/kontakty/ustredni-komise-pro-ochranu-zvirat/>

<https://www.svscr.cz/zdravi-zvirat/ustredni-komise-pro-ochranu-zvirat/>

### **Orgány státní veterinární správy**

<https://www.svscr.cz/zdravi-zvirat/>

- pracovníci provádějící experimenty na zvířatech musí být držiteli osvědčení odborné způsobilosti pro práci s pokusnými zvířaty podle § 17 zákona 246/1992 Sb.
- pracoviště musí splňovat podmínky zákona 167/1993 Sb. o Státním veterinárním dozoru a být držitelem akreditace uživatelského zařízení a osvědčení pro chovné a dodavatelské zařízení dle zákona 246/1992 Sb. v platném znění (uděluje MZe)
- akreditované pracoviště - nezávislá odborná komise dle zákona - posuzuje a schvaluje všechny projekty pokusů podle předpisů, dohlíží, ověřuje odbornou způsobilost

# DOBA EXPOZICE

- doba, po kterou je organismus vystaven účinku škodlivých látek. Škodlivý účinek se může objevit bezprostředně, nebo až po delším časovém období.
  - » **EXPOZICE AKUTNÍ** - do organismu vniklo najednou nebo v krátké době větší množství látky. Trvá krátkou dobu ve srovnání s dobou života organismu vystaveného expozici. Účinek se projeví okamžitě nebo ve velmi krátkém čase. Může mít vážné následky až smrt, ale může být i vratný.
  - » **EXPOZICE CHRONICKÁ** - dlouhodobé a opakované působení nižších dávek nebezpečných chemických látek. Opakovaná expozice po dobu delší než přibližně 10% života. Účinky mohou být patrné až za delší dobu (opožděná odpověď) a často jsou nevratné.
  - » **DLOUHODOBÁ EXPOZICE NÍZKÝM HLADINÁM** - dlouhodobé vystavení organismu malým koncentracím chemických látek.
  - » **SUBAKUTNÍ, SUBCHRONICKÁ**

# Typy expozice (trvání) – záleží na studovaném druhu a době jeho života

Akutní	$\leq 24$ h	často jednorázová expozice
Subakutní	$\leq 1$ měsíc	opakované dávky
Subchronická	1-3 měsíce (<10% života)	opakované dávky
Chronická	> 3 měsíce (>10% života)	opakované dávky

**Frekvence expozice (jednorázová/opakovaná)** = v jakých časových intervalech expozice probíhá a jaká je délka jednotlivých intervalů (délky působení chemické látky a délky přestávek).

ovlivňuje toxicitu látky v závislosti na jejím osudu v organismu:

- při dostatečně dlouhých intervalech může díky metabolizaci látky na netoxické produkty nebo díky vylučování látky dojít k tomu, že každá další expozice probíhá jako akutní jednorázová expozice. Podobně v případech, kdy dochází k obnovení (reparaci) narušených biochemických pochodů, biologických struktur a tkání.
- při krátkých intervalech může absorpce látky být vyšší než rychlost její biotransformace a exkrece a docházet tak k hromadění látky v organismu. V čase se může akumulovat a redistribuovat množství látky v těle, může dojít k překonání obranných a odstraňovacích mechanismů. Kumulace vede k postupnému zvyšování koncentrace chemické látky v některých orgánech, což může vést k jejich nevratnému (ireversibilnímu) poškození.

# Interakce stresoru a živého systému

Organismy a prostředí jsou v neustálé interakci

*In vitro* studie - poznání mechanismů účinku

Testy toxicity s jednotlivými organismy:

Akutní expozice - akutní toxicita - letalita

Chronická expozice - chronická toxicita (karcinogenita, reprodukční poruchy, imunotoxicita atd.)

Ekotoxikologie populační, společenstev a ekosystémů:

Polní studie: populační změny, změny společenstev a ekosystémů



# Hodnocení efektů v eko-toxikologii

Ekotoxikologie	Toxikologie	Úroveň molekulární, buněčná	Laboratoř
		Jednotlivé organismy	Laboratoř, epidemiologie
		Populační efekty	Laboratoř, kontrolované pokusy, epidemiologie
	Společenstva	Polní studie, terénní pozorování	
	Ekosystémy	Terénní pozorování	

# Účinky stresorů (toxikantů)

## Na molekulární a biochemické úrovni:

interakce s DNA, změny enzymových aktivit, zásahy do regulačních drah, narušení průchodnosti membrány, gradientů na membránách, porušení redox potenciálu, kompetice se substráty, indukce stresových proteinů, mitochondriální jedy, inhibice enzymů, interakce s receptory (např. estrogení a androgení účinek)

## Na úrovni organismu:

Respirace a fotosyntéza, příjem potravy, růst, reprodukce (páření, hnízdění), endokrinní změny, neurotoxicita, behaviorální změny (schopnost lovit, únik před predátory, reprodukční rituály), imunotoxicita, rozvrácení homeostázy, smrt

Neurofyziologické - porucha komunikace mezi receptory (insekticidy)

Behaviorální - změny chování, pohybu, lovu apod.,

Reprodukční - endokrinní modulátory (disruptory)

# Účinky stresorů

**Na úrovni populací a společenstev:**

Změny počtu, změny demografie (věk, pohlaví apod.),  
změny zastoupení druhů

**Na úrovni ekosystémů:**

Změny toků látek, energií a informací, narušení  
stability, katastrofy

Vztah mezi predátorem a kořistí, hostitelem a  
parazitem

# Eko-toxikologické testy

**Laboratorní:** studium mechanismů účinku, biomarkery

Porovnání citlivosti různých druhů (indikátorové organismy)

**Polní řízené studie** s jednotlivými druhy (vodní, terestrické), intervenční epidemiologické studie

**In situ hodnocení efektů** (terénní pozorování, epidemiologické studie)

# Ekotoxikologické testy se používají

Pro stanovení ekotoxicity různých látek a jejich směsí na druhy na různých úrovních potravního řetězce

Pro stanovení toxicity různých druhů vod

Pro posouzení rizikovosti průmyslových odpadů a kalů

Pro základní informace při ekologických haváriích

Pro čistírny odpadních vod

Pro testování výrobků přicházejících do styku s pitnou vodou

Pro posuzování kontaminace půdy, vlivu skládek na okolní půdu a vodu

Pro kontrolu efektivity dekontaminačních procesů

# 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)
- vzorky z prostředí (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 ( $\alpha$ ).
- **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