

Hodnocení toxicity směsí

- Toxicita směsí kontaminantů není jednoduše predikovatelná z toxicity jednotlivých látek
- Jediná spolehlivá cesta hodnocení toxicity směsí je testování založené na porozumění mechanismů působení jednotlivých složek směsi - predikce jejich působení
- Toxicita směsí je velmi důležitá, neboť v prostředí jsou látky ve směsích

Testování toxicity látek

- 1) Jednotlivé látky
- 2) Komplexní environmentální směsi
- 3) Modelové směsi (definované složení)
- 4) Interakce látek ve směsi

Testování jednotlivých látek

- Známé koncentrace, vlastnosti, účinky
- Snadné provedení
- Snadné vyhodnocení
- Interakce s dalšími látkami???

Komplexní environmentální směsi

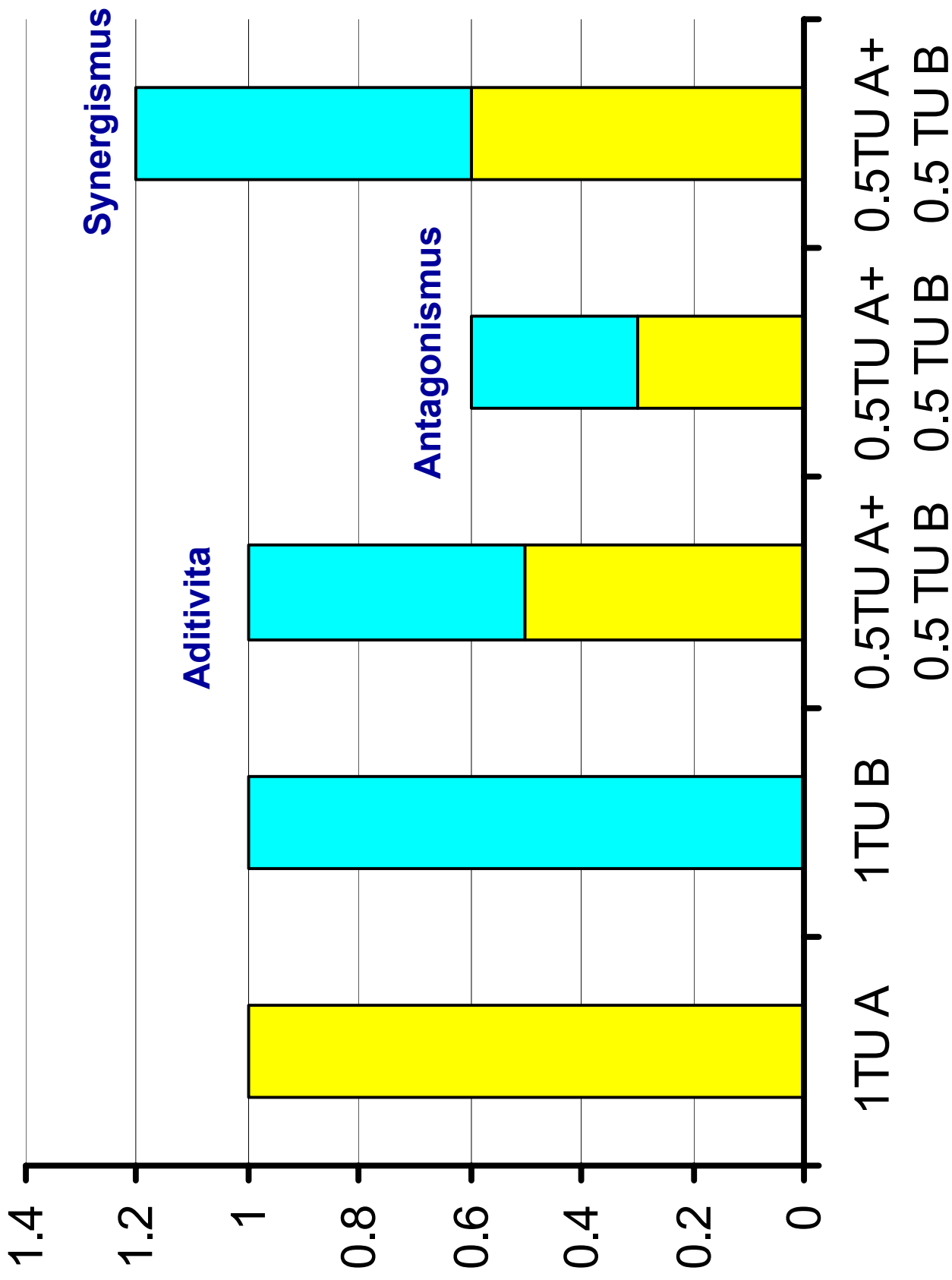
- Mnoho látek v jedné směsi, také dosud neznámé a neprostudované látky
- Různé mechanismy toxicity a různé účinky těchto látek
- Neznámé interakce látek ve směsi

Modelové směsi

- Definované složení
- Známé účinky a vlastnosti studovaných látek
- Známé mechanismy toxicity
- Vhodné ke studiu interakcí mezi jednotlivými látkami

Působení látek ve směsích

- **Aditivita**
 - Toxicita směsi toxikantů A a B je stejná jako suma toxicit toxikantů A a B působících samostatně
- **Antagonismus**
 - Toxicita směsi toxikantů A a B je nižší než suma toxicit toxikantů A a B působících samostatně
- **Synergismus**
 - Toxicita směsi toxikantů A a B je vyšší než suma toxicit toxikantů A a B působících samostatně
- **Potenciace**
 - Jedna chemikálie, která samostatně není toxická, zvyšuje toxicitu další chemikálie ve směsi



Testování xenoestrogenity modelových směsí

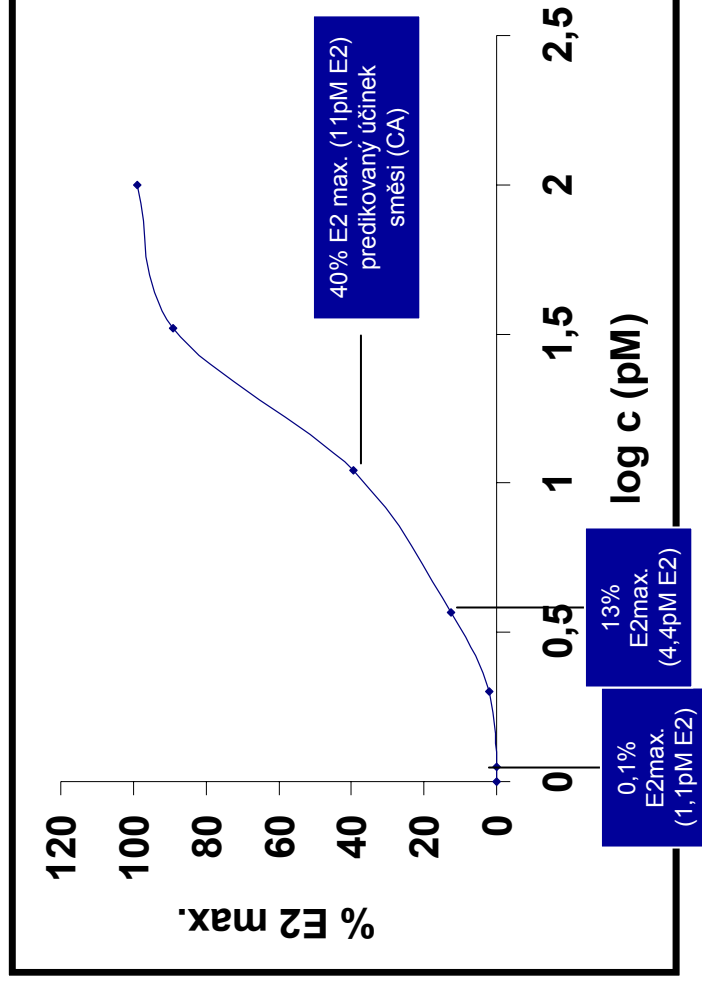
- Nejčastěji testovány modelové směsi farmak, PAHs, PCBs
- Látky působí stejným mechanismem (vazba na ER)
- Predikce aditivních efektů směsí (CA)
- Koncentračně-adiční model (CA)

Koncentračně-adiční model (CA)

- Předpokladem pro jeho použití je stejný mechanismus účinků jednotlivých látek ve směsi (např. vazba na receptor)
- Principem této metody je možnost nahrazení jedné látky ve směsi druhou látkou
- Každá jednotlivá látka tak přispívá k účinku směsi v poměru k její koncentraci, nikoli účinku!
- Stejný princip je i základem pro výpočet TEQ při posuzování účinků environmentálních směsí

Princip CA a TEQ

- Př. Směs E2 o koncentraci 4pM vykazující účinek 12% E2 max. + 6 xenoestrogenů vykazující účinek 0,1% E2 max.
- Každou ze 6 látek lze teoreticky nahradit koncentrací E2 způsobující stejný efekt 0,1% (což je 1,1 pM E2) a přičíst tyto koncentrace ke 4,4 pM E2 a zjistit výsledný účinek směsi z křivky dávká-odpověď pro E2 (Obr.2).



Rovnice používané pro výpočet CA účinků směsí

- Pokud známe EC50, EC25 apod. jednotlivých látek, lze na základě této rovnice vypočítat predikovanou EC50 směsi

$$EC_{mix} = (p1/ECx1 + p2/ECx2 + \dots + pn/ECxn)$$

P = podíl složky jednotlivé látky v dané směsi

EC_{mix} = koncentrace směsi, která způsobí x% účinek

EC_{xi} = koncentrace samostatné látky, která způsobí x% účinek

Rovnice používané pro výpočet CA účinků směsí

- Další rovnici lze použít pro případ srovnání s modelem součtu účinků, musíme ale znát sklon křivky u jednotlivých látek, tzv. slope faktor

$$E_{mix} = 1 / 1 + (1 / ((c_1 / EC_{50_1})^{p_1} + (c_i / EC_{50_i})^{p_i} + \dots + (c_n / EC_{50_n})^{p_n}))$$

E_{mix} = účinek směsi (v % maxima)

c_i = koncentrace i-té látky v dané směsi

EC_{50_i} = EC_{50} dané látky

p_i = slope faktor křivky dávka-odpověď u dané látky

Další modely pro predikci účinků směsí

- Model nezávislého působení (independent action, IA) – látky způsobují daný účinek nezávisle na sobě – jiným mechanismem

$$E_{mix} = 1 - \prod[1 - E(c_i)]$$

E_{mix} – predikovaný efekt směsi o daném složení
 $E(c_i)$ – účinek vyvolaný koncentrací látky ve směsi pokud je aplikována samostatně, nesmí být vyšší než 1!

- Model součtu účinků (ES, effect summation) - možno použít pouze v případě lineární odpovědi u křivek dávká-odpověď pro jednotlivé látky

Model nezávislého působení

■ Naměřené a predikované účinky směsi 16 biocidů působících různými mechanismy v testu toxicity u řas

■ Zatímco model CA (čárkovaně) nadhodnocuje účinky směsi, model IA (plná čára) odpovídá naměřeným hodnotám

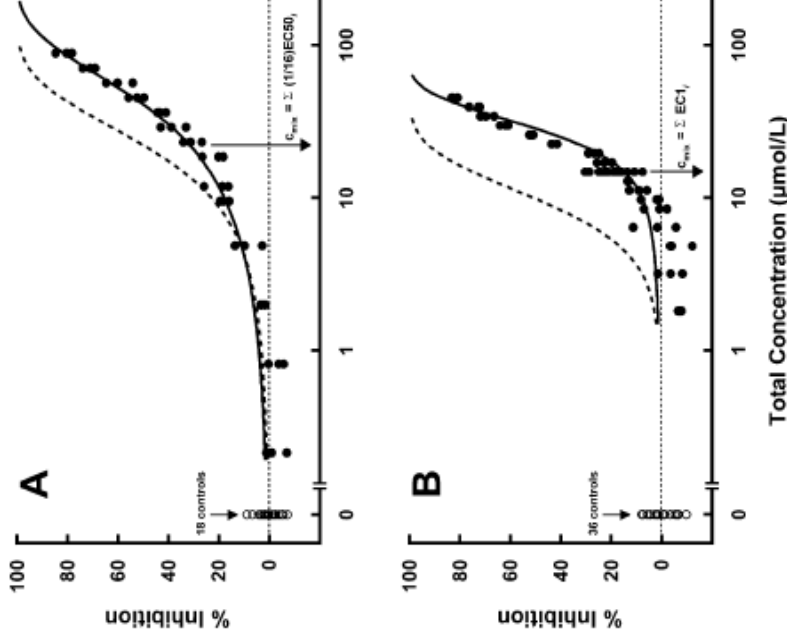
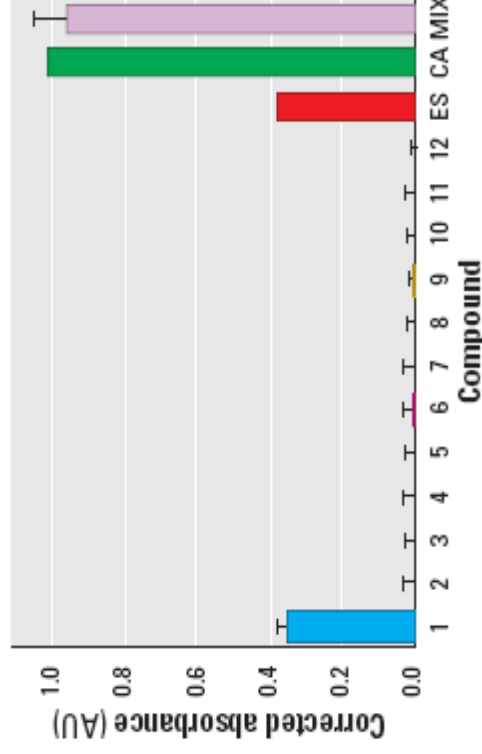


Fig. 3. Observed and predicted algal toxicity of mixtures of 16 dissimilarly acting substances. (A) Mixture 1: components mixed in the ratio of their individual EC50 values. (B) Mixture 2: components mixed in the ratio of their individual EC1 values. (●) experimentally observed toxicity; (○) controls; (—) prediction according to concentration addition; (---) prediction according to independent action.

Testování xenoestrogenity modelových směsí

Příklad: Testování účinků 10 xenoestrogenních látek ve směsi
(testy na kvasinkách)



Již nízké neúčinné koncentrace jednotlivých látek mohou ve směsi způsobovat významný účinek!

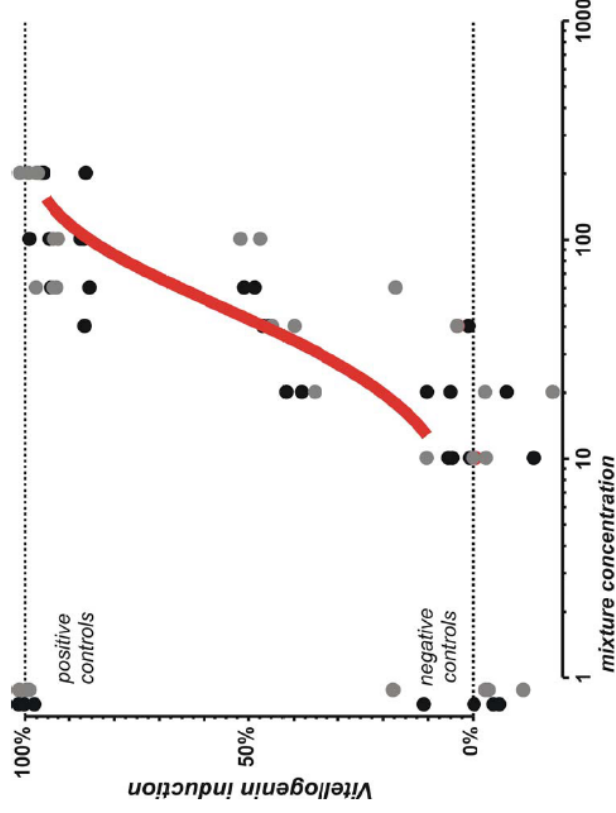
Zatímco podle predikce založené na koncentračně-adičním modelu (CA) jsou efekty aditivní, podle modelu součtu účinků (ES) by se jednalo o významný synergismus!

Testování xenoestrogenity směsí

- Testy *in vivo* – měření vitelogeninu v rybách – potvrzení aditivního účinku podle modelu CA u střevle pro směs pěti xenoestrogenů

Fathead minnows

Brian *et al.*
(2005) EHP
113, 721



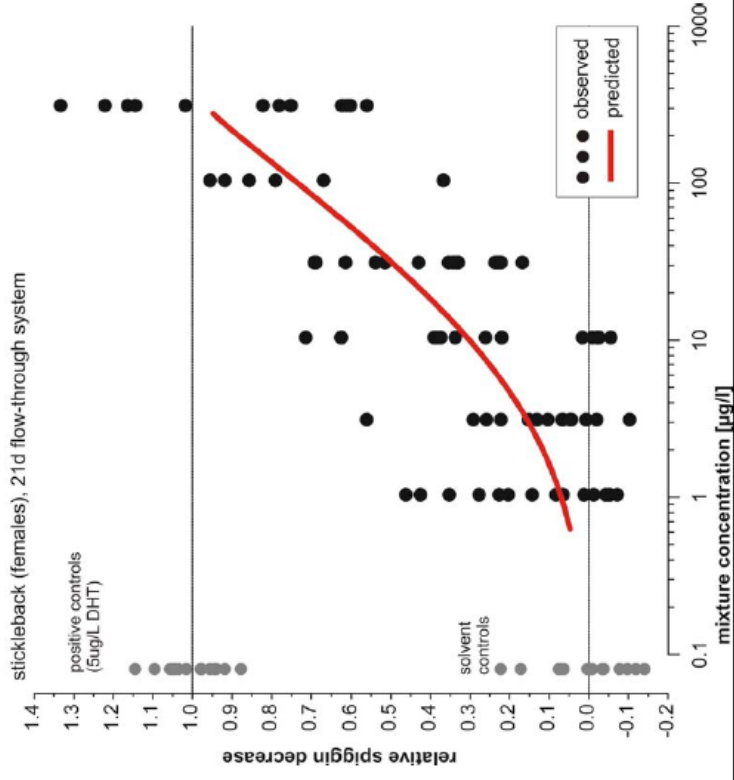
Testování antiandrogenity ve směsích

- U některých antiandrogenních látek bylo zjištěno také koncentračně-adiční působení ve směsích
- Tyto testy byly prováděny *in vivo* – modelovým organismem byla koljuška tříostná a sleduje se pokles produkce spigginu u samic, indukovaný vnějšími androgeny (DHT)



Koncentračně-adiční mechanismus pro směs 4 antiandrogenů *in vivo*

Mixture of E1, E2, EE2 and NP



Aktivita dioxinového typu a modelové směsi PAHs

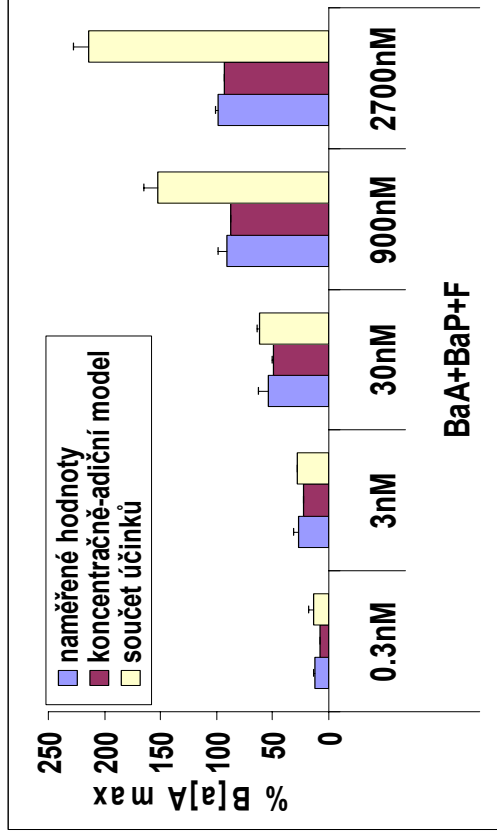
- U aktivity dioxinového typu je často používán u environmentálních směsí koncept toxických ekvivalentů (TEQ), který určuje, kolikrát je látka toxičtější, než nejtoxičtější 2,3,7,8-TCDD
- Platí ale pouze pro toxicitu zprostředkovanou aktivací AhR. Některé studie využívají tento koncept také při hodnocení aktivit modelových směsí dioxinově aktivních látek

Aktivita dioxinového typu u modelových směsí PAHs

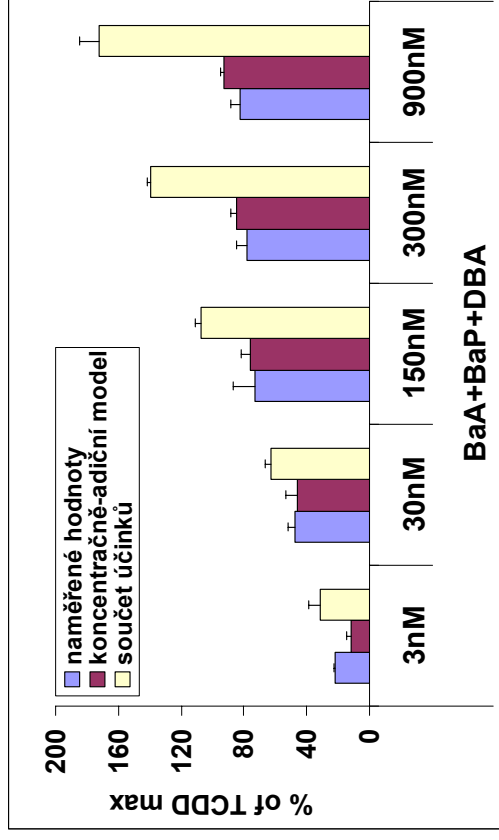
- Př. Binární a ternární směsi PAHs – naše studie
- Potvrzení aditivních účinků na testech s kvasinkami i se savčími buňkami a to podle modelu koncentračně-adičního
- Při srovnání s modelem ES (effect summation, součet účinků) je zjevné, že tento model většinou nadhodnocuje účinky modelových směsí

Aktivita dioxinového typu u modelových směsí PAHs

Kvasinkový model



H4IIE.luc



Aktivita dioxinového typu u modelových směsí PAHs

- Jiné studie ukazují i synergistické nebo antagonistické působení PAHs

Alnafisi (2007) – ukazuje aditivní a synergistické působení směsí některých PAHs na kvasinkách

Villeneuve (1998) – využívá EROD na rybích buňkách, některé směsi PAHs působily spíše synergisticky, některé antagonisticky, používá koncept TEQ

Shrnutí

- Pro správnou predikci účinků modelových směsí látek je potřeba dobře znát mechanismus účinku jednotlivých látek i jejich fyzikálně-chemické vlastnosti
- Pro látky působící stejným mechanismem účinku se jeví jako vhodný pro predikci aditivity koncentračně-adiční (CA) model
- Pro látky působící odlišným mechanismem je vhodný spíše model nezávislého působení (IA)
- Model součtu účinků (ES) – často nadhodnocuje, použitelný pouze v v úzkém lineárním rozmezí odpovědi pro jednotlivé látky