

Hodnocení toxických
vlastností:

Vyhodnocení ekotoxikologických testů

Hodnocení ekotoxikologických účinků

Hodnocení vztahu dávka-odpověď:

ke stanovení „predicted no effect
concentration“ (PNEC)

= předpokládaná koncentrace nezpůsobující
žádný účinek

- Identifikace nebezpečnosti: identifikace škodlivých účinků

• Hodnocení dat

– Úplnost dat

– Správnost dat

- Spolehlivost: jak dobře je studie provedena, jak jsou interpretovány výsledky?
Jsou aplikovány a dodrženy standardní metodiky?
- Relevance: je použitý test vhodný?
Jsou výsledné parametry stanoveny za relevantních podmínek?
- Interpretace dat: nezbytné využití expertních znalostí
- Např. pokud je trvání testu odlišné, sledované parametry různé (NOEC -EC50)....

Faktory ovlivňující toxicitu

- Původ organismů
- Aklimatizace
- Abiotické faktory
 - Foto-indukovaná toxicita
 - pH
 - Tvrdost
 - Teplota
 - Obsah kyslíku
 - Organické látky
- Fyziologický stav
- Věk
- Pohlaví

Hodnocení ekotoxikologických účinků

- PNEC: $PEC < PNEC$: zajišťuje komplexní ochranu prostředí
- Výpočet PNEC:
násobení NOEC nebo EC50 přepočtovým faktorem (faktorem nejistoty) za využití statistických extrapoláčních technik
- $PEC = \text{predicted environmental concentration} = \text{očekávaná environmentální koncentrace}$
- Přepočtové faktory jsou používány k zohlednění nejistot

• Nejistoty:

- intra- a inter-laboratorní variabilita v toxikologických datech
- intra- a inter-druhové rozdíly (biologická variabilita)
- extrapolace z krátkodobých na dlouhodobé testy
- extrapolace z laboratorních dat na situaci v prostředí (synergistické, aditivní a antagonistické účinky...)

Hodnocení ekotoxikologických účinků

Akvatické prostředí:

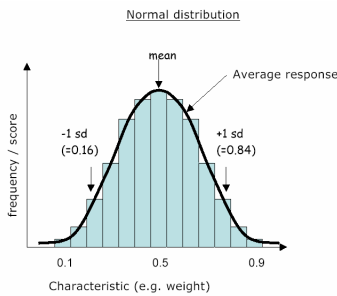
Základní data: akutní toxicita pro ryby
akutní toxicita pro bezobratlé
test inhibice růstu na řasách

Assessment factors to derive a PNEC aquatic

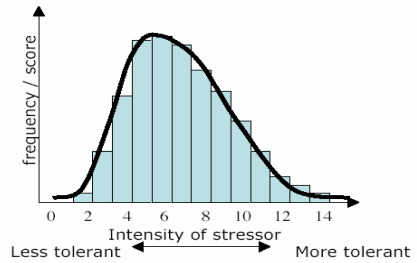
	Assessment factor
At least one short-term L(E)C ₅₀ from each of three trophic levels of the base-set (fish, Daphnia and algae)	1000
One long-term NOEC (either fish or Daphnia)	100
Two long-term NOECs from species representing two trophic levels (fish and/or Daphnia and/or algae)	50
Long-term NOECs from at least three species (normally fish, Daphnia and algae) representing three trophic levels	10 ¹
Field data or model ecosystems	Reviewed on a case by case basis
Species sensitivity distribution (SSD method)	5-1, to be fully justified on a case by case basis

Křivka dávka – odpověď:
základní nástroj pro hodnocení
toxických vlastností látek

Křivky dávka-odpověď jsou založeny na normálním rozložení biologických proměnných

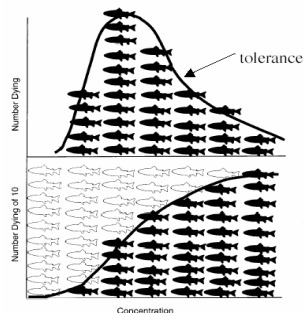


Populační odpověď na toxické látky je zpravidla skloněná nalevo

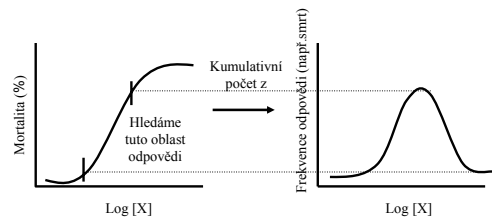


Koncept individuální tolerance: základ modelu vztahu dávky-odpovědi

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



Experimentální design pro testy toxicity



Testované koncentrace

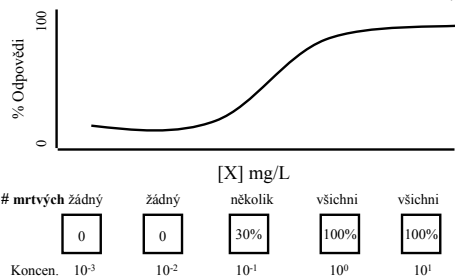
Kvalita výsledků je určena správným výběrem testovaných koncentrací

- Testované koncentrace by měly pokrývat rozmezí od koncentrací nevykazujících žádný účinek až po 100 % letální koncentraci
- Dobře vybraná koncentrační řada má jednu koncentraci blízko EC50, a nejméně dvě koncentrace s částečným účinkem pod a nad EC50 – rozložených symetricky.
- Koncentrační řada by měla být v geometrickém měřítku. Ředící krok (koeficient) obvykle 2 až 10
- Příklady koncentračních řad:
 - 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000
- látky s mírným sklonem odpovědi (některé pesticidy); koeficient ředění 10.
 - 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 ; přikrejší odpověď, koeficient 2.

Pokud nemáme podkladová data – pro úsporu materiálu při hledání lineární části odpovědi → doporučen dvoustupňový proces

Krok 1 – Skrínigový test

Exponovat 5 – 10 organismů 10x koncentrační řadě po 24 - 96 h
Cílem určit rozmezí kde se nachází 50 % letální koncentrace (LC50)



Krok 2 – Definitivní test

Z předchozích výsledků – stanovit rozmezí testu

$$\text{dolní} = 10^{-2} = 0.01 \text{ mg/L}$$

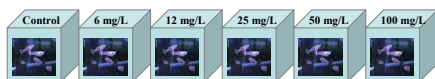
$$\text{horní} = 10^0 = 1.0 \text{ mg/L}$$

- Provést test s využitím logaritmického měřítka koncentrací, protože organismy zpravidla odpovídají logaritmicky na toxikanty
- Obvykle použít alespoň 5 koncentrací + kontrola
 - Kontrola – ověřuje toxicitu pozadí, ředící vody, media, zdravotní stav organismů, vliv stresu testovacího prostředí (testovací nádoby, osvětlení, teplota, atd.)
 - Validita testu!! např. úhyn >10% kontrolních organismů → neplatný test!

Příklad uspořádání definitivního testu

Pokus. zásah	Ředění	Koncentrace (mg/L)
1	10 ⁻²	0.01
2	10 ^{-1.5}	0.032
3	10 ⁻¹	0.1
4	10 ^{-0.5}	0.32
5	10 ⁰	1.0
Kontrola		0.0

Design testu toxicity



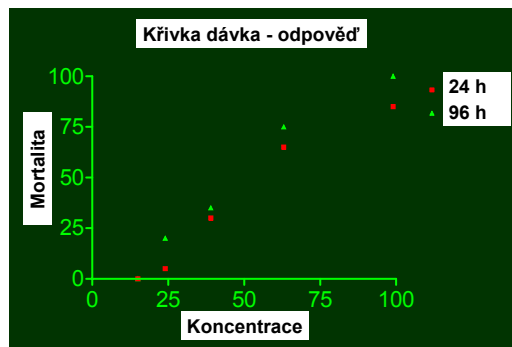
Exponováno 20 jedinců					
Odpověď po 24 hodinách, jedinců					
0	0	1	6	13	17
Odpověď po 96 hodinách, jedinců					
0	0	4	9	15	20

Výsledek testu

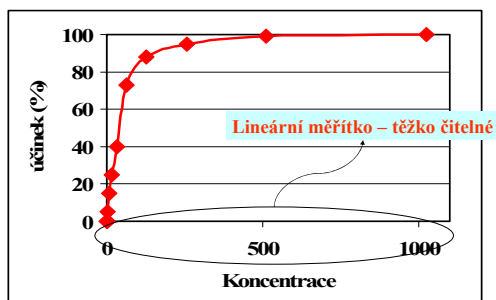
Koncentrace	Kontrola	6 mg/L	12 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L
Účinek 24 h	0%	0%	5%	30%	65%	85%
Účinek 96 h	0%	0%	20%	35%	75%	100%

Křivka dávka-odpověď

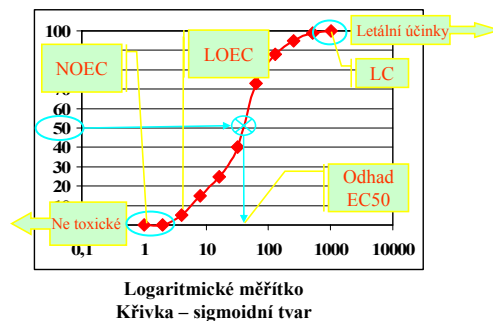
- Graf ukazující biologickou odpověď, např. enzymu, proteinu, populace či společenstva na rozmezí koncentrací polutantu
- Křivka mortality - obvykle zobrazována jako závislost kumulativní mortality na vzrůstající koncentraci



Ideální křivka dávka – odpověď



Ideální křivka dávka – odpověď



Vypočítané parametry

- EC 50 : účinná koncentrace způsobující 50% odpověď v testovací populaci.
- Účinná koncentrace, mg/L, ml/L
- Letální koncentrace LC50
- Inhibiční koncentrace IC50
- EC05, EC20, EC90, ...
- Rozmezí EC20 – EC80

Hodnocení ekotoxikologických účinků

- Sledované parametry testů toxicity
 - krátkodobé studie:
 - LC50 (letální koncentrace)
 - EC50 (účinná koncentrace)
 - dlouhodobé studie :
 - NOEC (no observed effect concentration)
 - LOEC (lowest observed effect concentration)
 - EC10 (10 % effects concentration)
 - ECx (x % effects concentration)
 - MATC (maximal acceptable toxicant concentration) geometrický průměr NOEC a LOEC, vypočítaný

Parametry které mohou být odhadnuty z křivky dávka-odpověď

- **LD₅₀** – odhadnutá dávka, která způsobí 50% mortalitu testovacích organismů
- **LC₅₀** – odhadnutá koncentrace, která způsobí 50% mortalitu testovacích organismů
- **EC₅₀** - odhadnutá koncentrace, která způsobí účinek (snížená reprodukce, růst atd.) u 50% testovacích organismů, či která způsobí 50 % maximálního účinku
- **IC₅₀** – odhadnutá inhibiční koncentrace, která sníží normální odpověď o 50%
- Další zahrnující jinou procentuální změnu (10%, 20%, atd.)

Stanovované parametry

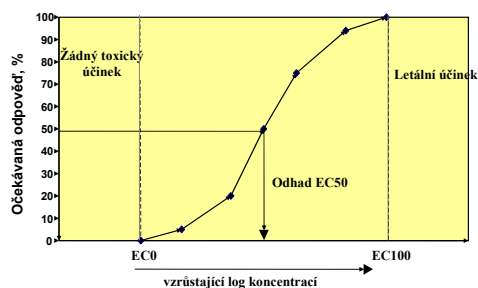
- **NOEC**: No Observed Effect Concentration. Nejvyšší testovaná koncentrace látky, která nezpůsobila statisticky významný účinek v porovnání s kontrolou
- **LOEC**: Lowest Observed Effect Concentration. Nejnižší testovaná koncentrace látky, která způsobila statisticky významný účinek v porovnání s kontrolou. Nejbližší vyšší koncentrace než NOEC.
- **NOEL**: No Observed Effect Level. Nejvyšší testovaná dávka látky, která nezpůsobila statisticky významný účinek v porovnání s kontrolou
- **NOAEL**: No Observed Adverse Effect Level. Nejvyšší testovaná dávka látky, která nezpůsobila negativní účinek. Je pozorován účinek, ale není považován za nebezpečný.

Všechny testy toxicity se snaží určit hladinu toxikantu, která způsobí nebo nezpůsobí žádný účinek

MATC

- Maximum Allowable Toxicant Concentration
- maximální povolitelná koncentrace toxikantu
 - geometrický průměr NOEC a LOEC
 - často nazývána "chronická hodnota"

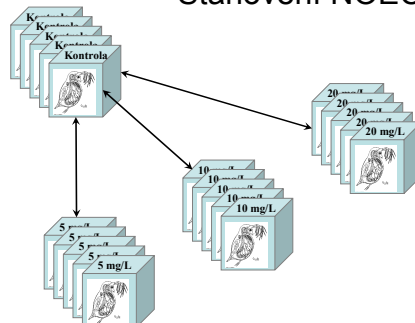
Výběr koncentrací



Stanovované parametry NOEC

- No Observed Effect Concentration = nejvyšší koncentrace, která ještě nevyvolává účinek statisticky významně odlišný od kontroly
- Odpověď populace v testovaných koncentracích je porovnávána s kontrolou
- Hledáme nejvyšší koncentraci, která nezpůsobuje toxickou odpověď

Stanovení NOEC



Příklad určení NOEC

Porovnáváme 3 testované koncentrace s kontrolou

Přežívající dafnie v kontrole	20	20	20	20	20
Přežívající dafnie v koncentraci 5 mg/L	19	20	20	20	20
Přežívající dafnie v koncentraci 10 mg/L	19	20	20	19	19
Přežívající dafnie v koncentraci 20 mg/L	18	19	19	19	19

Stanovení NOEC

- Studentův t-test
- ANOVA (Analýza rozptylu)
 - Dunnettův test
 - Williamsův test
 - LSD test

Studentův t-test

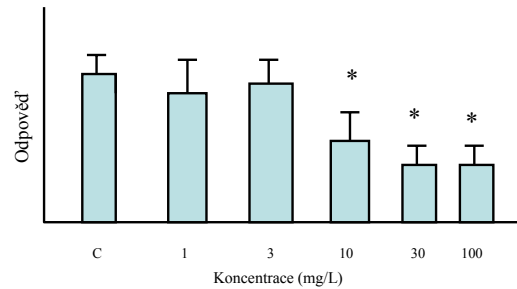
	Control	5 mg/L	Control	10 mg/L
Average value	20	19,8	20	19,4
Variance	0	0,2	0	0,3
No of observations	5	5	5	5
Difference		1		1
t stat		0,18695		2,44949
P(T<=t) (1)		0,131846		0,035242
t krit (1)		2,131846		2,131846
P(T<=t) (2)		0,373901		0,070484
t krit (2)		2,776451		2,776451

	Control	20 mg/L
Stř. hodnota	20	18,8
Rozptyl	0	0,2
Pozorování	5	5
Rozdíl		1
t stat		0,001941
P(T<=t) (1)		0,131846
t krit (1)		2,131846
P(T<=t) (2)		0,003883
t krit (2)		2,776451

NOEC

LOEC

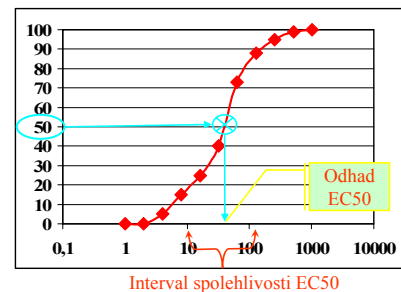
Výsledek analýzy rozptylu



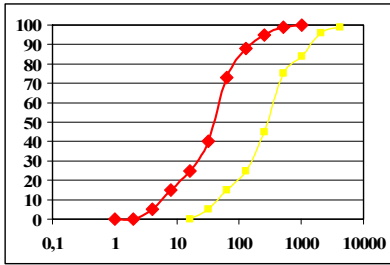
Nevýhody stanovených parametrů

- Jejich hodnota je silně závislá na designu experimentu a na:
 - Počtu opakování
 - Počtu testovaných koncentrací
 - Proceduře výběru koncentrací
 - Přirozené variabilitě systému
 - Použitých statistických metodách

Křivka dávka – odpověď

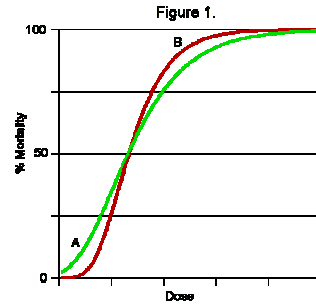


Srovnání dvou toxikantů



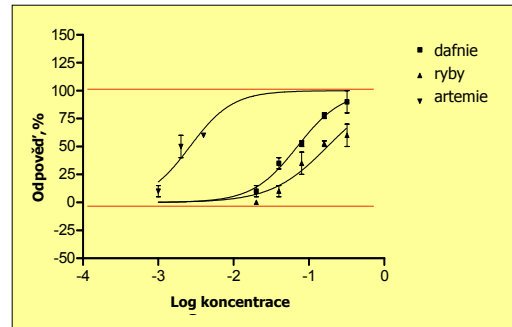
Látka s odpovědí, kterou zobrazuje červená křivka je toxičtější než ta se žlutou křivkou

Testy toxicity mohou být využity ke zhodnocení rozdílů v toxicitě dvou látek (pozor při interpretaci!)



Sklon křivky dávka – odpověď

- Důležitý pro odhad trendu toxicity.
- Toxikant s mírným sklonem může být nebezpečný na nízkých koncentracích i když EC50 je vysoká.



Výpočet EC50

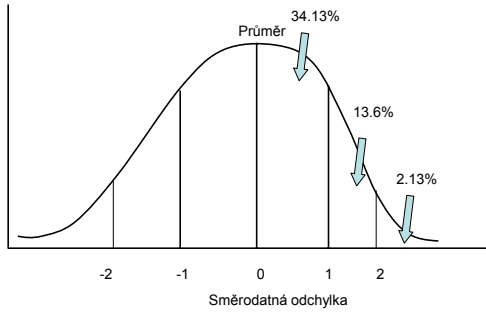
- Interpoláční metody
 - Dvou dávková metoda
 - Probitová analýza
 - Logitová analýza
 - Lineární regrese
 - Nelineární regrese

Dvou dávková metoda

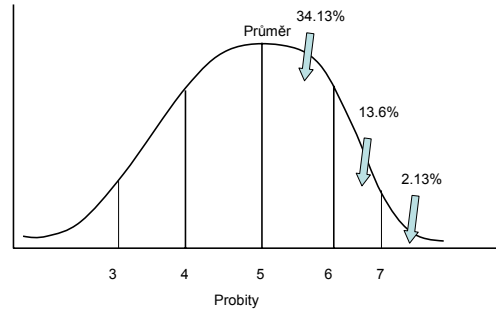
$$\log(EC50) = x_{s_0} = x_1 + \frac{0,5 - p_1}{p_2 - p_1} (x_2 - x_1)$$

- Nejjednodušší metoda odhadu
- Pokud je EC50 zhruba známá
- Jedna koncentrace v intervalu (20; 50)
- Druhá koncentrace v intervalu (50; 80)
- Interval (20; 80) je zhruba lineární pro účinek vs. Log. koncentrací

Vztah mezi normálním rozložením a směrodatnými odchylkami



Je složitější pracovat se směrodatnými odchylkami (34.13, 13.6, atd) – převedení SMODCH na probity

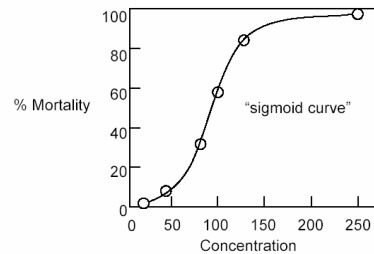


Příklad probitové analýzy

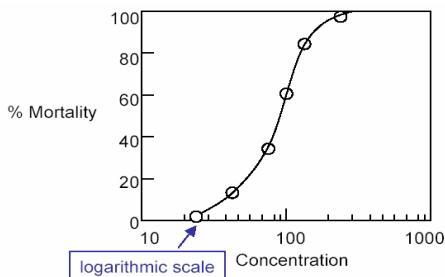
Koncentrace (mg/L)	Mortalita	%
Kontrola	0/10	0
0.3	0/10	0
1	0/10	0
3	1/10	10
10	4/10	40
30	9/10	90
100	10/10	100

Prohlédnout data → zřejmé, že LC50 by měla být mezi 10 a 30 mg/L
Graf → fit line by eye (cca stejný počet nad a pod křivkou)

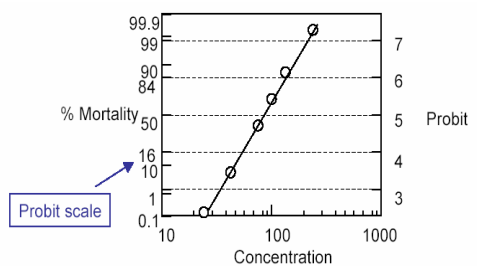
IED model – výsledkem log normální distribuce (sigmoidní křivka)

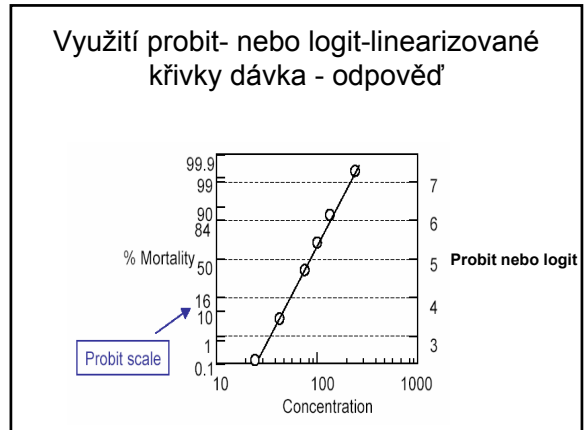
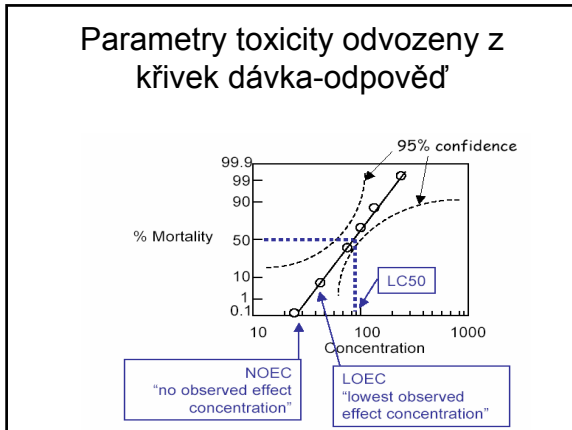
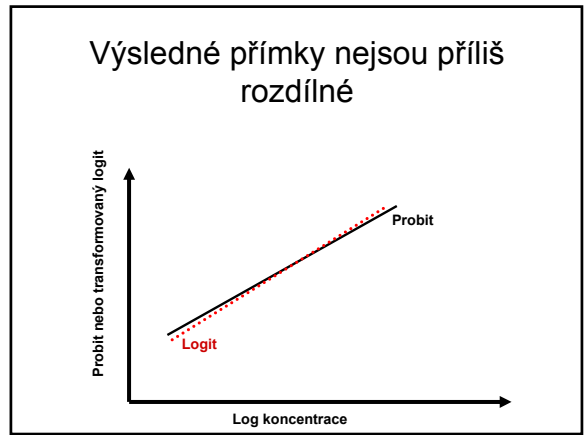
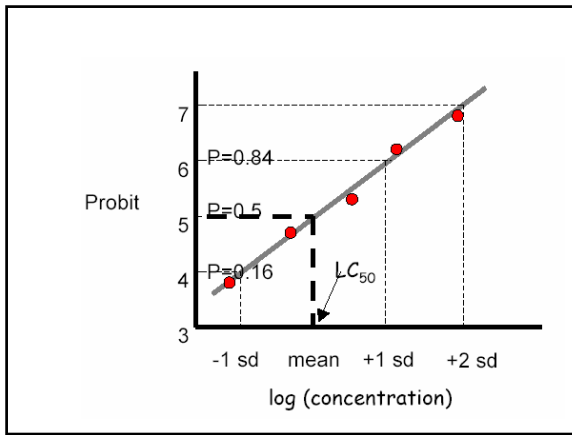


Transformace dat : Krok 1 změnit osu "koncentrací" na logaritmické měřítko



Transformace dat: Krok 2 Převést % odpovědi na lineární formu – např. probit nebo logit





Odhad LC/EC z přímky lineární regrese

$Y = a + bX$

- Y – transformovaný logit/probit,
- X - log C,
- b – sklon regresní přímky,
- a – intercept regresní přímky

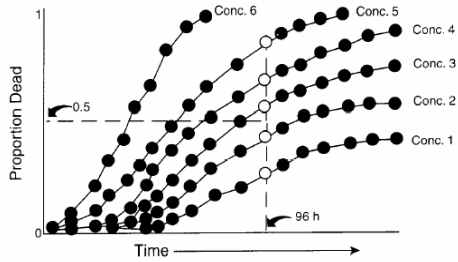
vypočítat $\log(LC_{50})$

vypočítat $LC_{50} = 10^{\log(LC_{50})}$

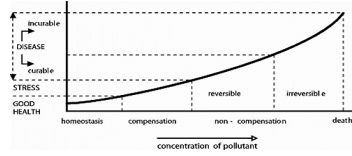
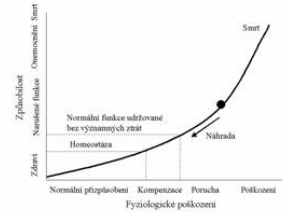
Využití LC_{50}

1. Aplikační faktor
 - $LC_{50} \times n = \text{---} = \text{povolená dávka}$
 - Dobrá pokud nemáme lepší informaci (chronické testy)
2. Zhodnocení rizika → nižší LC_{50} = toxičtější
3. Vede k chronickému testování
 - LC_{50} z akutního testu neposkytuje ekologicky relevantní výsledek → potřeba testování na více ekosystémové úrovni
 - Probit je kompromis mezi proveditelností, náklady a možností získat dostatečná data pro rozhodnutí o environmentální toxicitě látky

Modely vztahu čas-odpověď



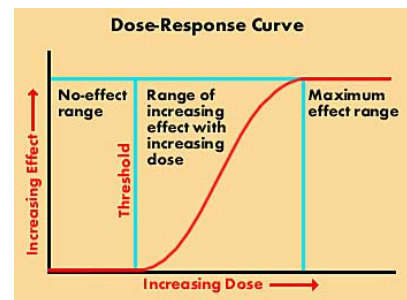
Teorie zdravotní kondice ve vztahu k expozici toxickou látkou



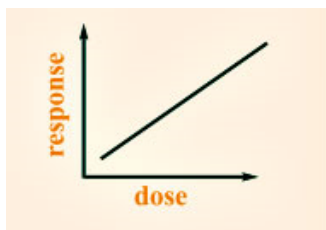
Odpověď na stres: prahová, bezprahová a hormeze

- **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 (příp. naopak?)

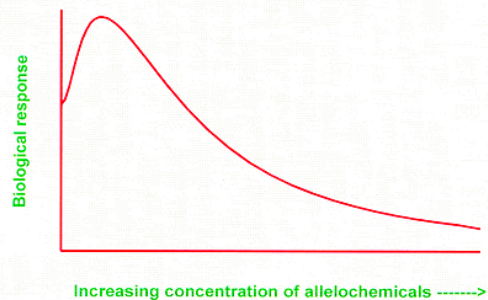
Prahová odpověď



Bezprahová odpověď



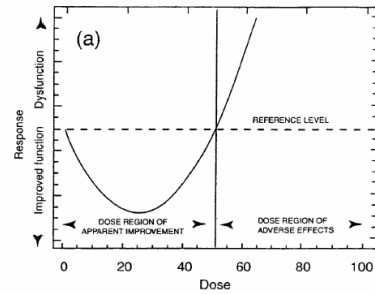
Hormeze



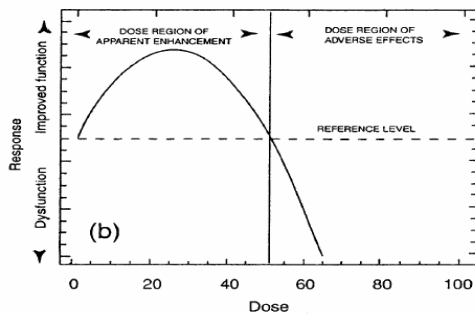
Hormeze

- Vztah mezi expozicí kontaminantu a odpovědí organismu může být komplikovanější než se dříve věřilo
- Vysoké a nízké dávky kontaminantu mohou mít na organismus rozdílný vliv (hormeze neznamená, že účinky nízkých dávek jsou prospěšné, jenom to že jsou odlišné!!)
- Zpracování konceptu hormeze do ekotoxikologie a hodnocení ekologických rizik je v současnosti limitováno nedostatečnou znalostí mechanismu hormeze

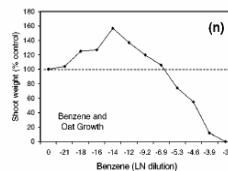
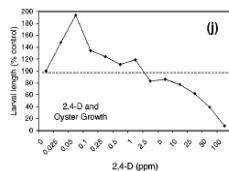
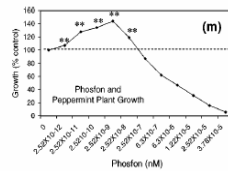
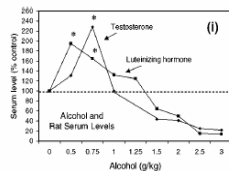
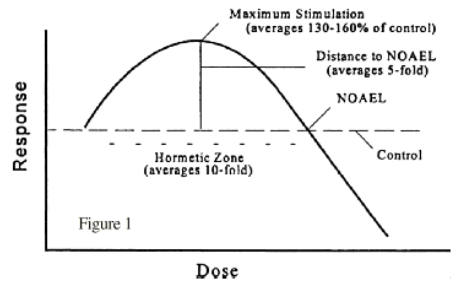
Teoretická křivka hormeze I



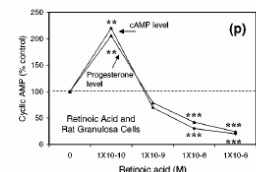
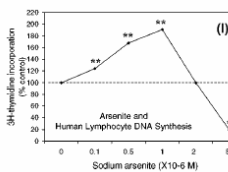
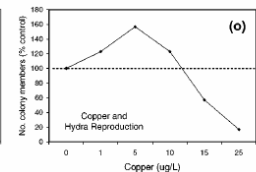
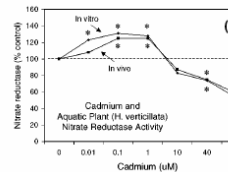
Teoretická křivka hormeze II



Teoretická křivka hormeze III



Calabrese and Baldwin (2003)



Calabrese and Baldwin (2003)

Regulační souvislosti

- Obecně používán [prahový model](#) pro ne-[karcinogeny](#), a [lineární bezprahový model](#) pro karcinogeny (včetně radiace; EPA, FDA, a NRC).
- Přechod na model hormeze by pravděpodobně zmírnil některé limity pro polutanty ve vzduchu, vodě, potravinách a půdě.
- To by mohlo vést ke zmírnění nákladů na dodržování environmentálních limitů a na remediační projekty.
- Tato změna ale není moc pravděpodobná, i když s ukazuje, že mnoho toxikantů vykazuje prahové nebo hormezní působení v nízkých dávkách