

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 extrapolačních technik
- PEC = predicted environmental concentration = 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

Faktory nejistoty =  
bezpečnostní faktory

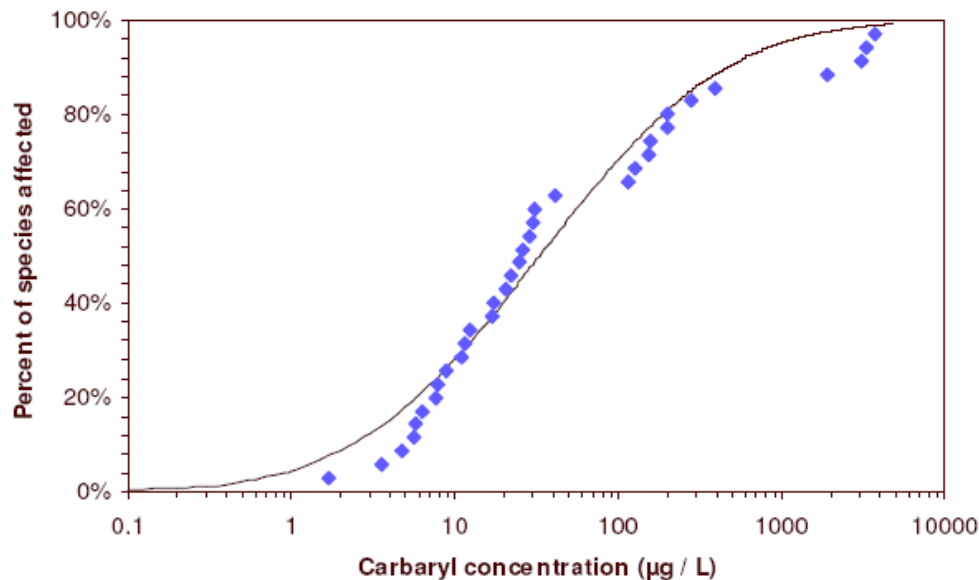
Assessment factors to derive a PNEC aquatic

	Assessment factor
At least one short-term L(E)C <sub>50</sub> 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 <sup>(c)</sup>
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

# Species Sensitivity Distribution

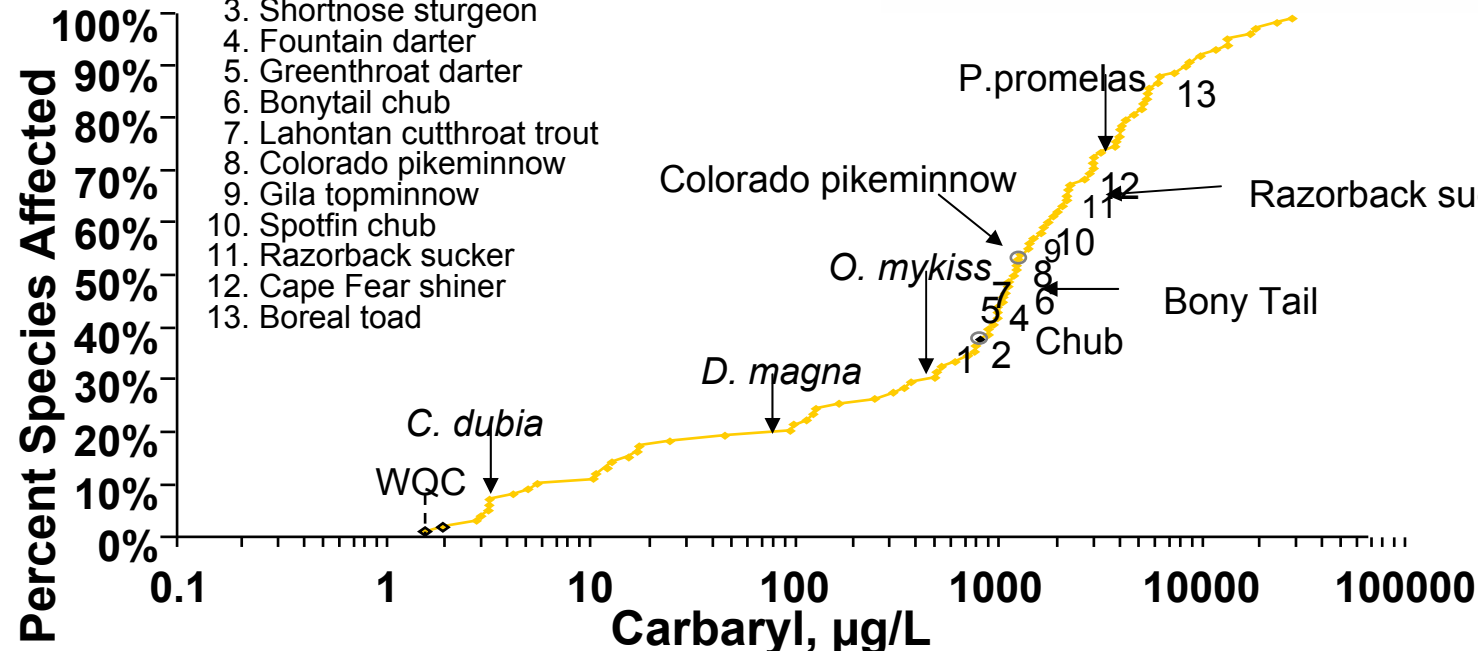
(SSD)

Acute LC<sub>50</sub> values of Carbaryl for 34 aquatic invertebrate species. The fitted log-normal SSD has a mean of 3.497 and a standard deviation of 2.063.



## List of tested endangered species

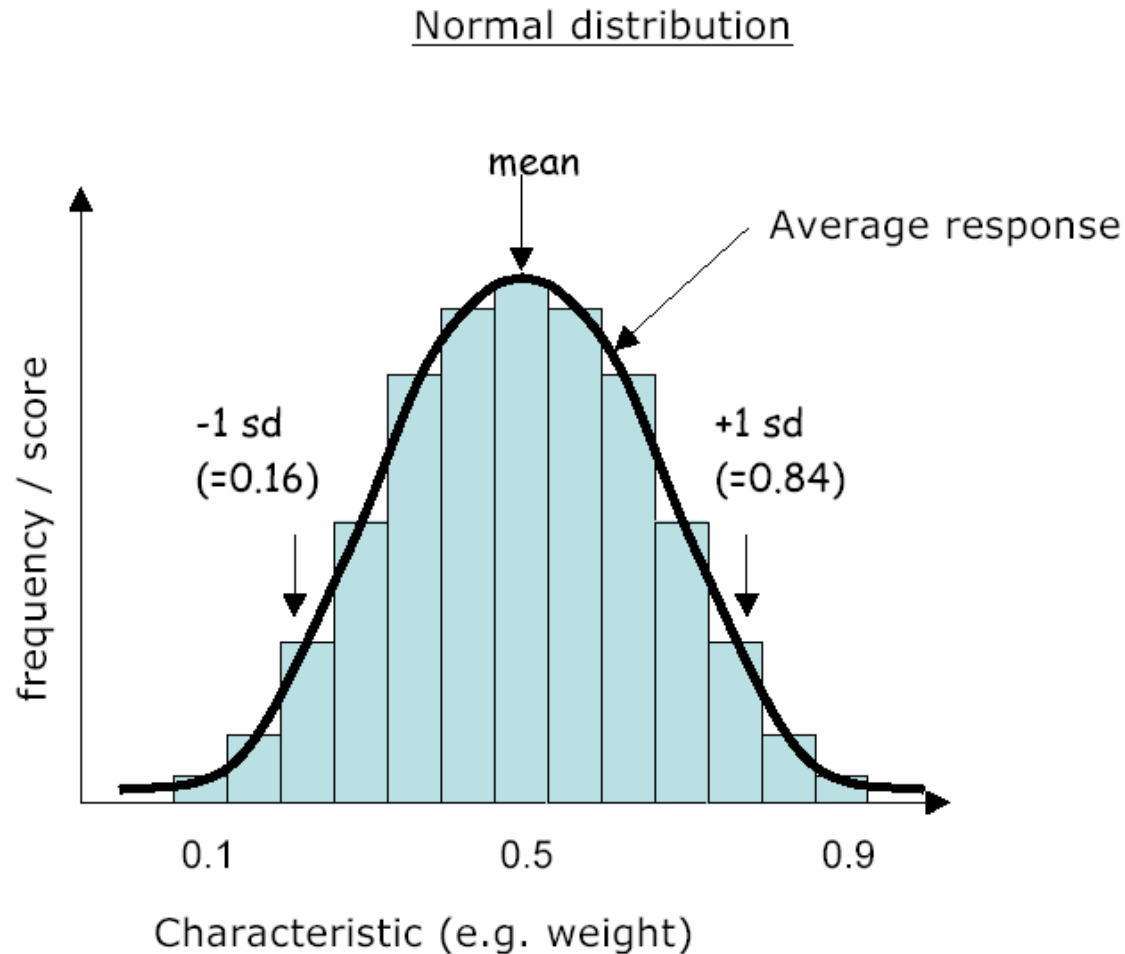
1. Apache trout
2. Greenback cutthroat trout
3. Shortnose sturgeon
4. Fountain darter
5. Greenthroat darter
6. Bonytail chub
7. Lahontan cutthroat trout
8. Colorado pikeminnow
9. Gila topminnow
10. Spotfin chub
11. Razorback sucker
12. Cape Fear shiner
13. Boreal toad



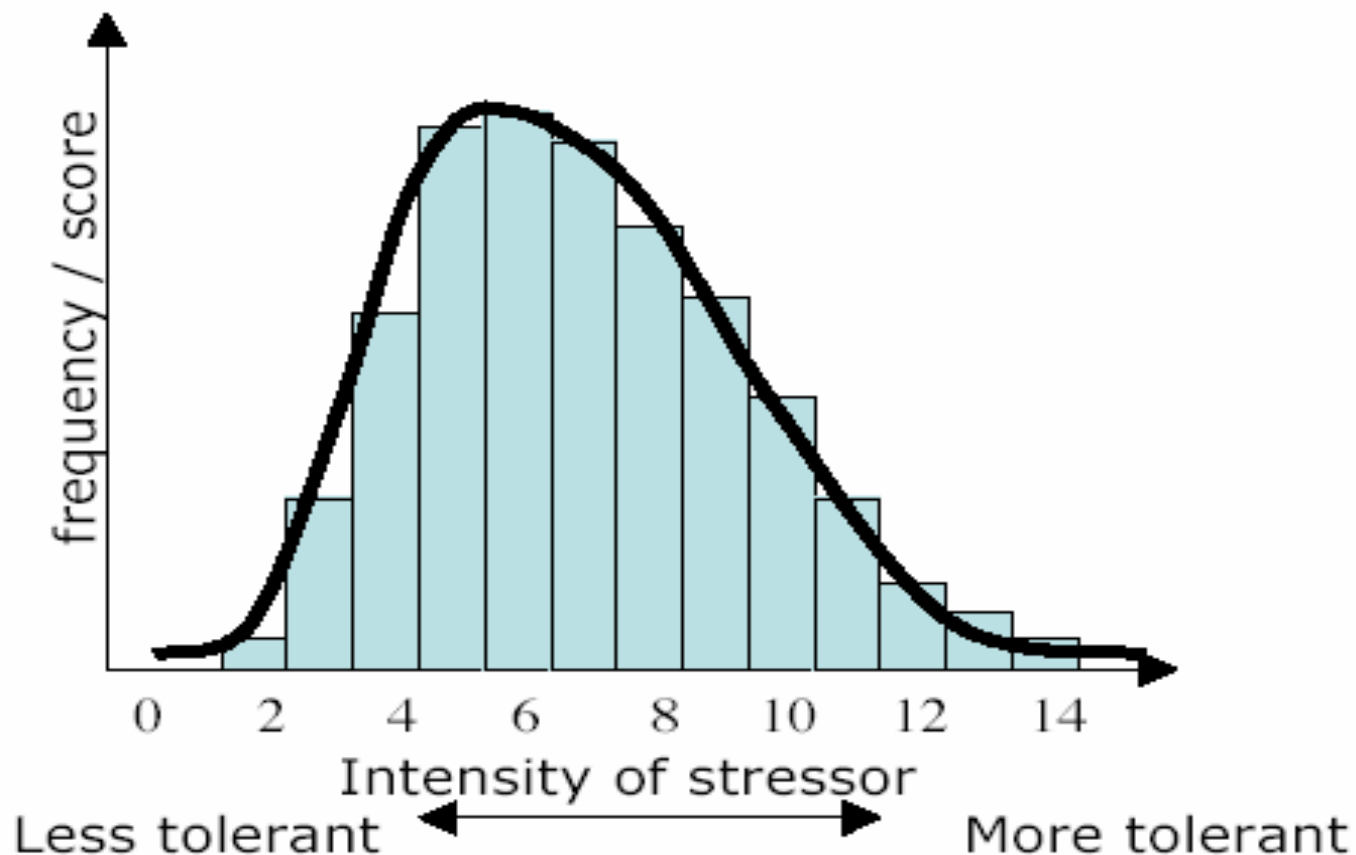


Křivka dávka – odpověď:  
základní nástroj pro hodnocení  
toxických vlastností látek

# Křivky dávka-odpověď jsou založeny na normálním rozložení biologických proměnných

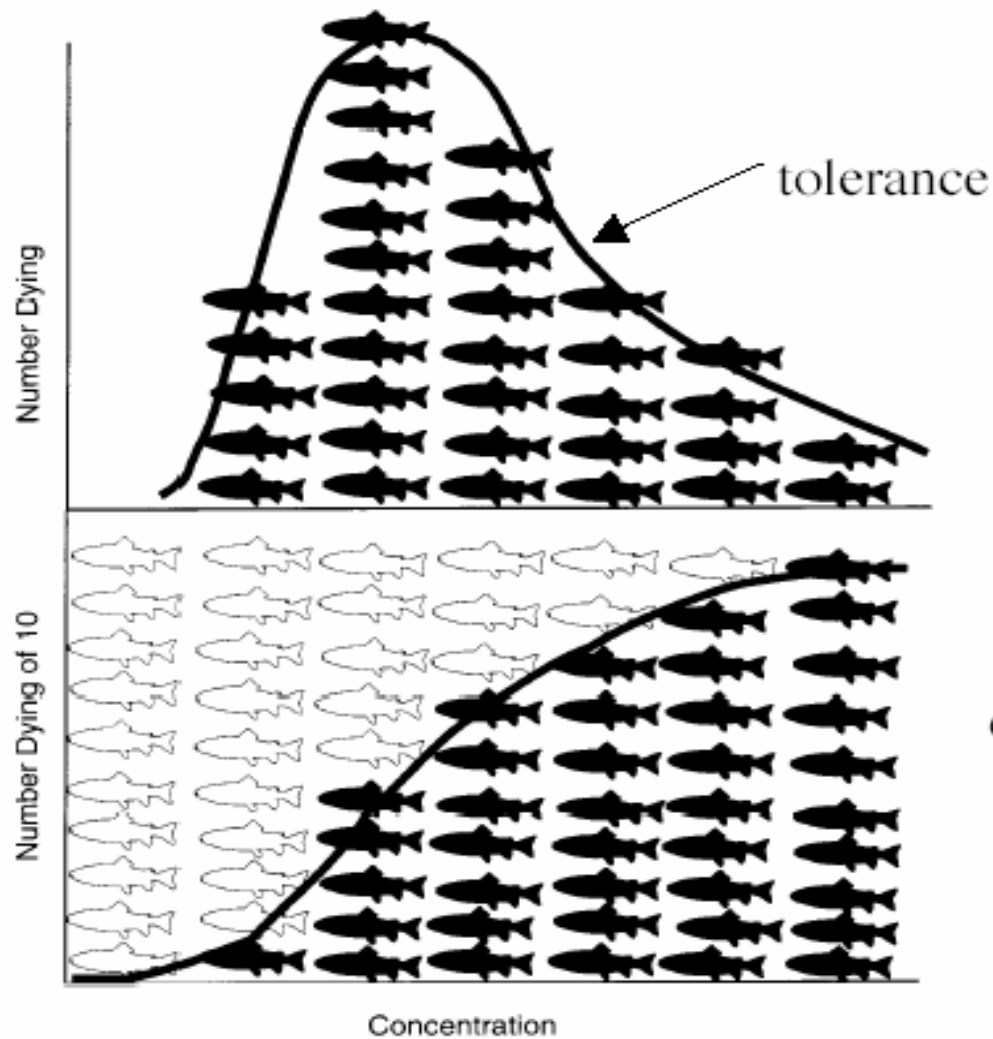


Populační odpověď na toxické látky je zpravidla skloněná nalevo



# Koncept individuální tolerance: základ modelu vztahu dávky-odpovědi

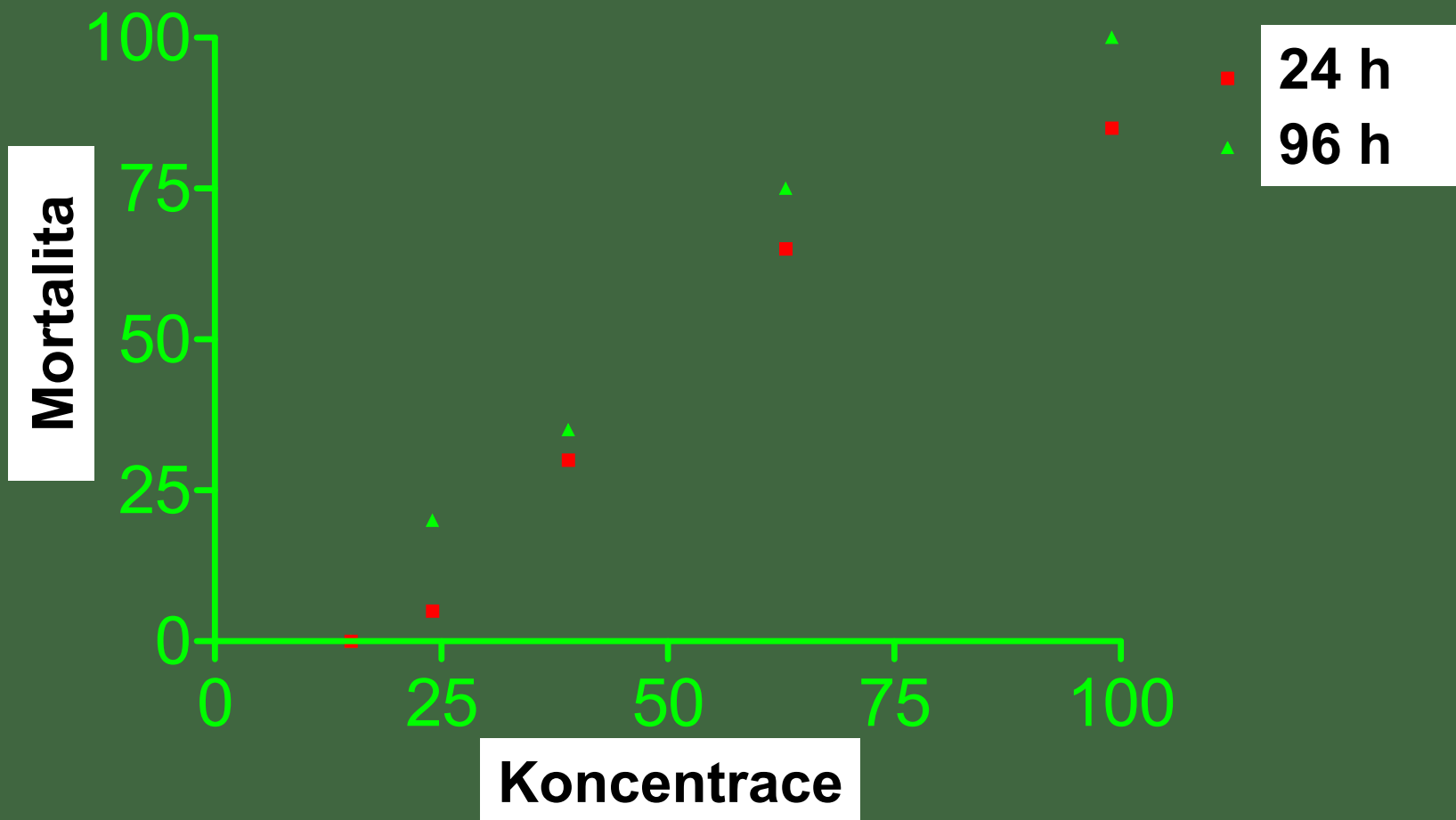
- individuální účinná dávka (IED) – minimální dávka vedoucí ke smrti jedince
- geneticky určená pro každého jedince



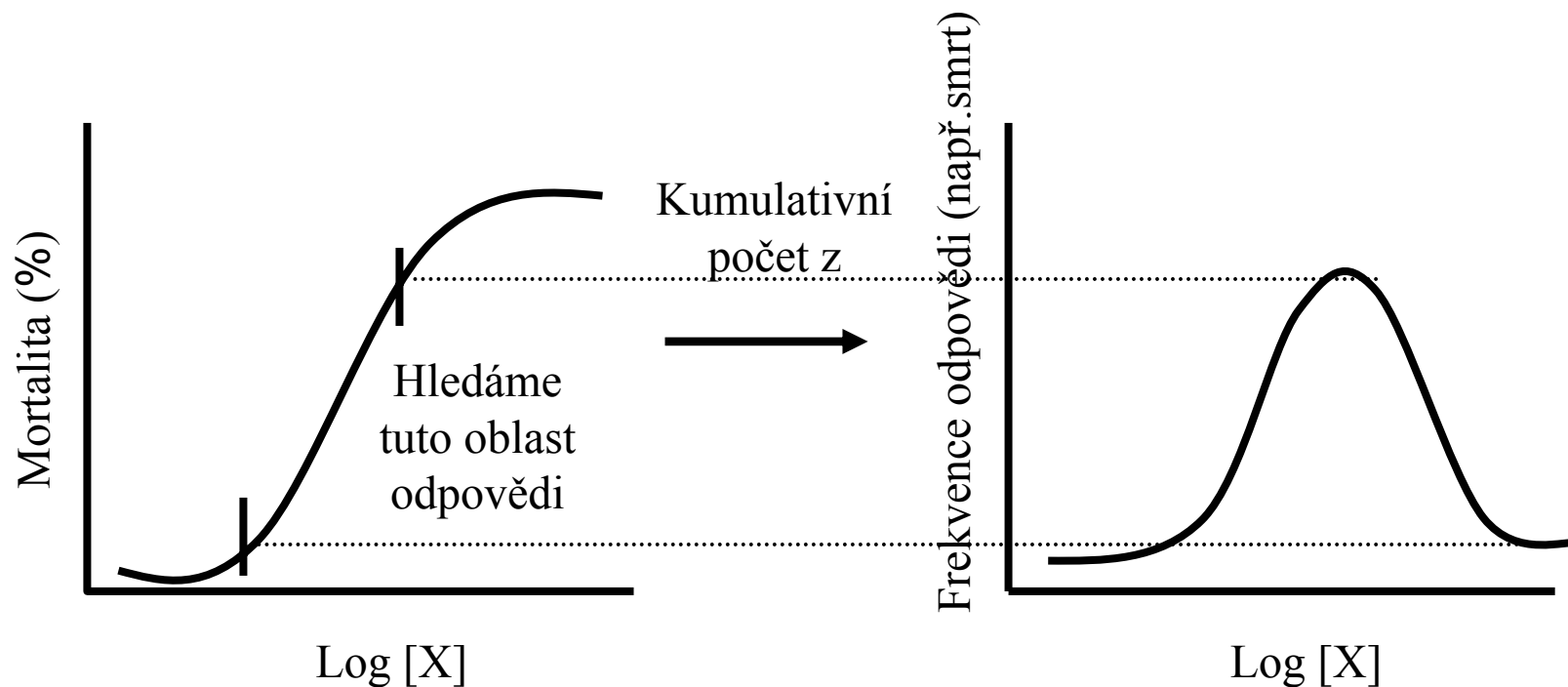
# Křivka dávka-odpověď

- 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

# Křivka dávka - odpověď



# 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 ; příkřejší odpověď, koeficient 2.

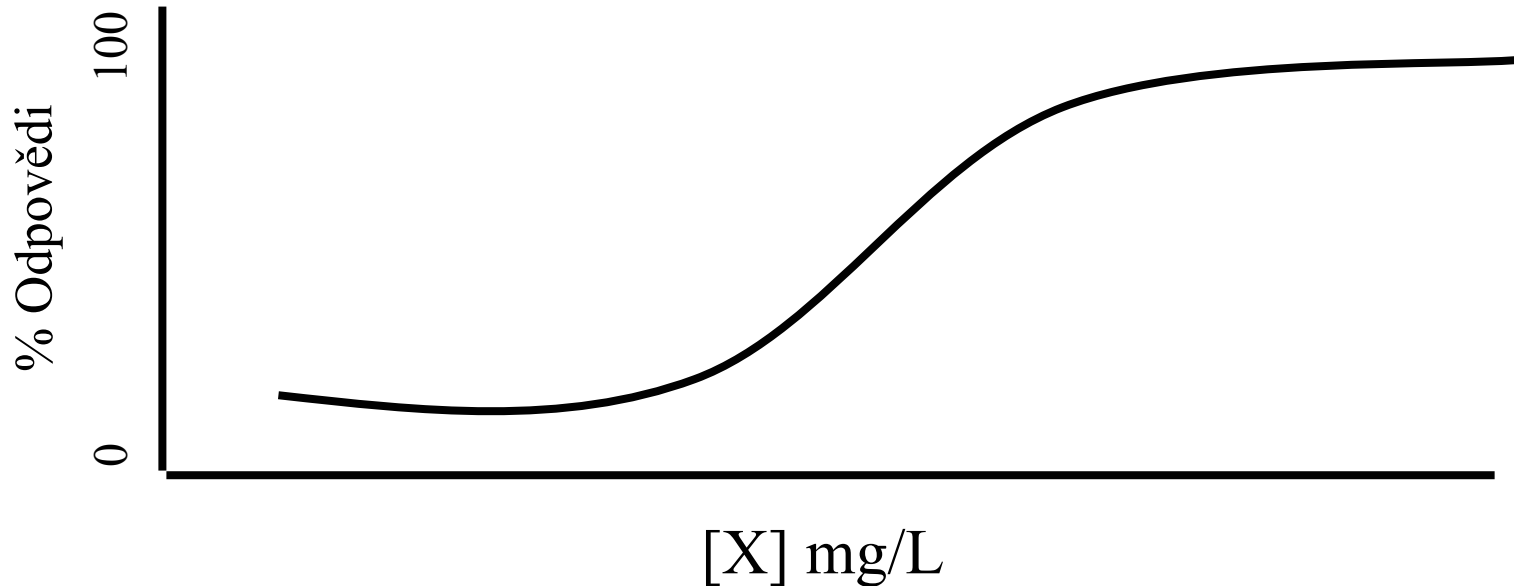


Pokud nemáme podkladová data – pro úsporu materiálu při hledání lineární části odpovědi → doporučen dvoustupňový proces

## 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)



# mrtvých žádný

0

žádný

0

několik

30%

všichni

100%

všichni

100%

Koncen.  $10^{-3}$

$10^{-2}$

$10^{-1}$

$10^0$

$10^1$

## Krok 2 – Definitivní test

Z předchozích výsledků – stanovit rozmezí testu

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

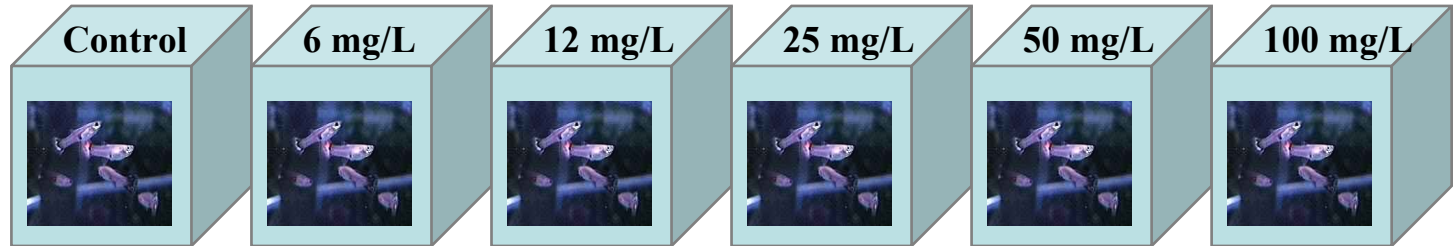
$$\text{horní} = 10^0 = 1.0 \text{ mg/L}$$

- 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

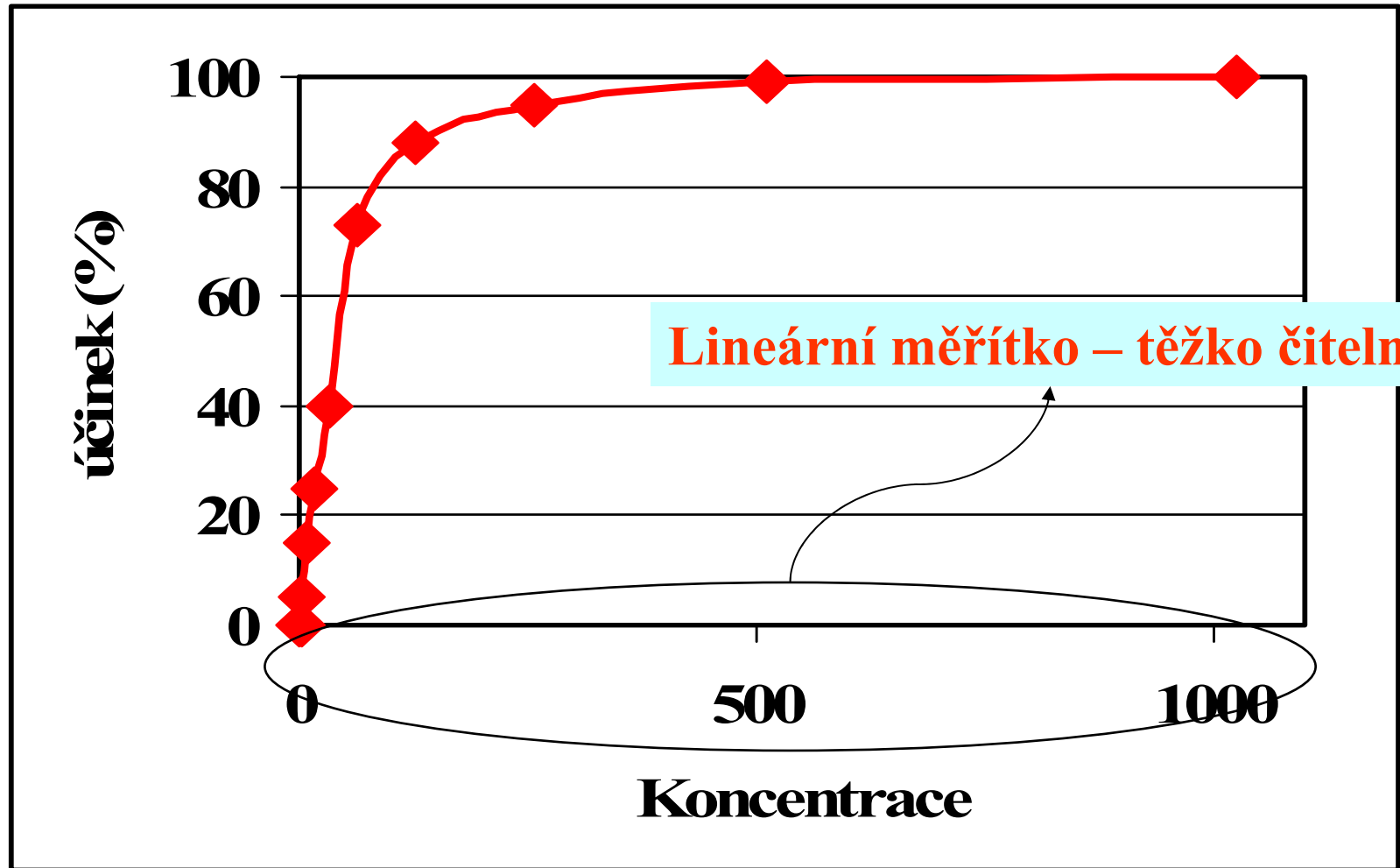


Exponováno 20 jedinců					
Odpověď po 24 hodinách, jedinců					
0	0	1	6	13	17
Odpověď po 96 hodinách, jedinců					
0	0	4	9	15	20

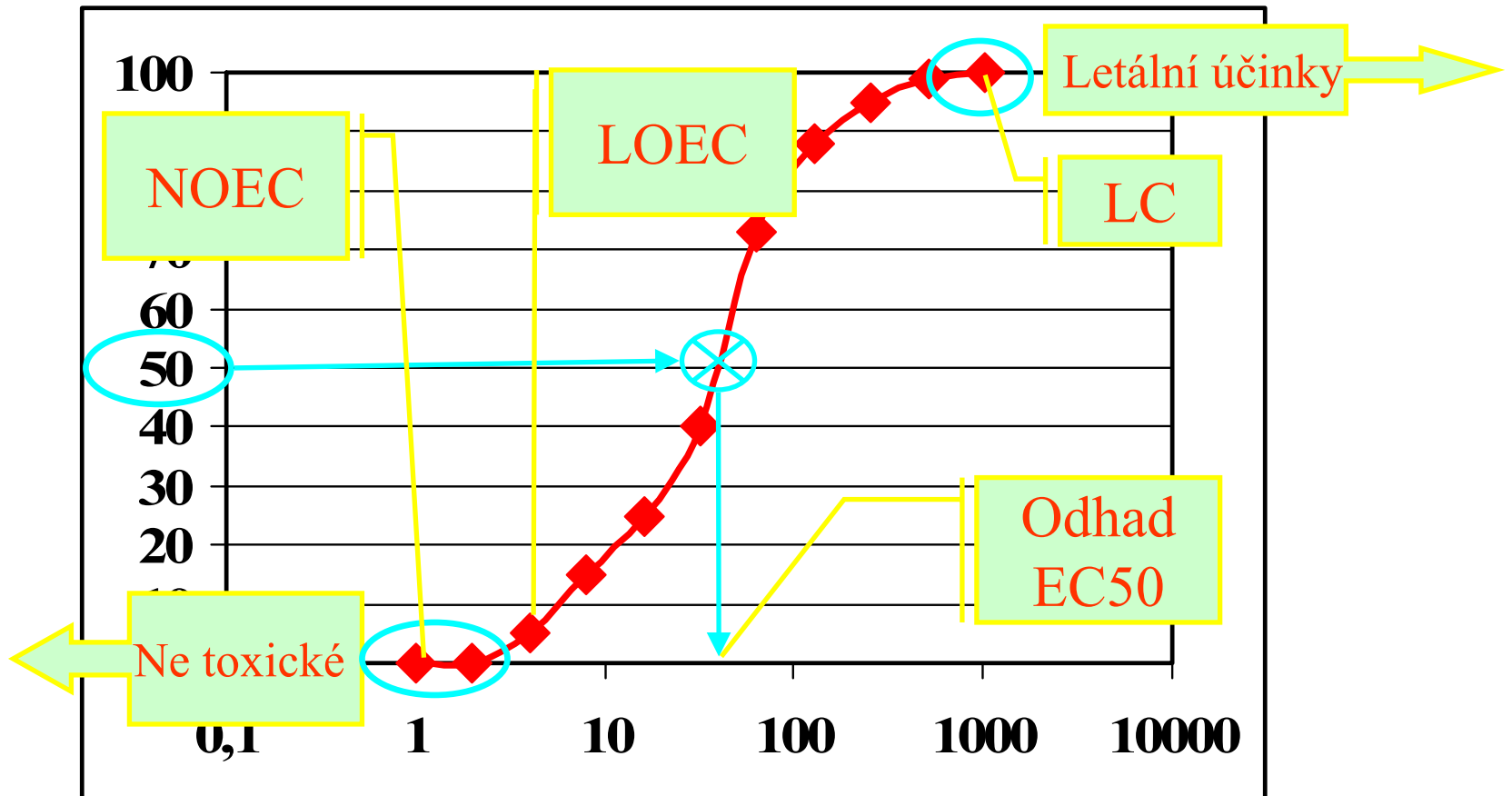
# Výsledek testu

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%

# Ideální křivka dávka – odpověď



# Ideální křivka dávka – odpověď



Logaritmické měřítko  
Křivka – sigmoidní tvar

# 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)



# Parametry které mohou být vypočítány z křivky dávka-odpověď

- **LD<sub>50</sub>** – účinná dávka, která způsobí 50% mortalitu testovacích organismů
- **LC<sub>50</sub>** – 50% letální koncentrace - účinná koncentrace, která způsobí 50% mortalitu testovacích organismů
- **EC<sub>50</sub>** - účinná koncentrace, 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...)
- **IC<sub>50</sub>** – inhibiční koncentrace, která sníží normální odpověď o 50%
- Další zahrnující jinou procentuální změnu (10%, 20%, atd.)  
EC05, EC20, EC90, ...
- Rozmezí EC20 – EC80

# Stanovované parametry

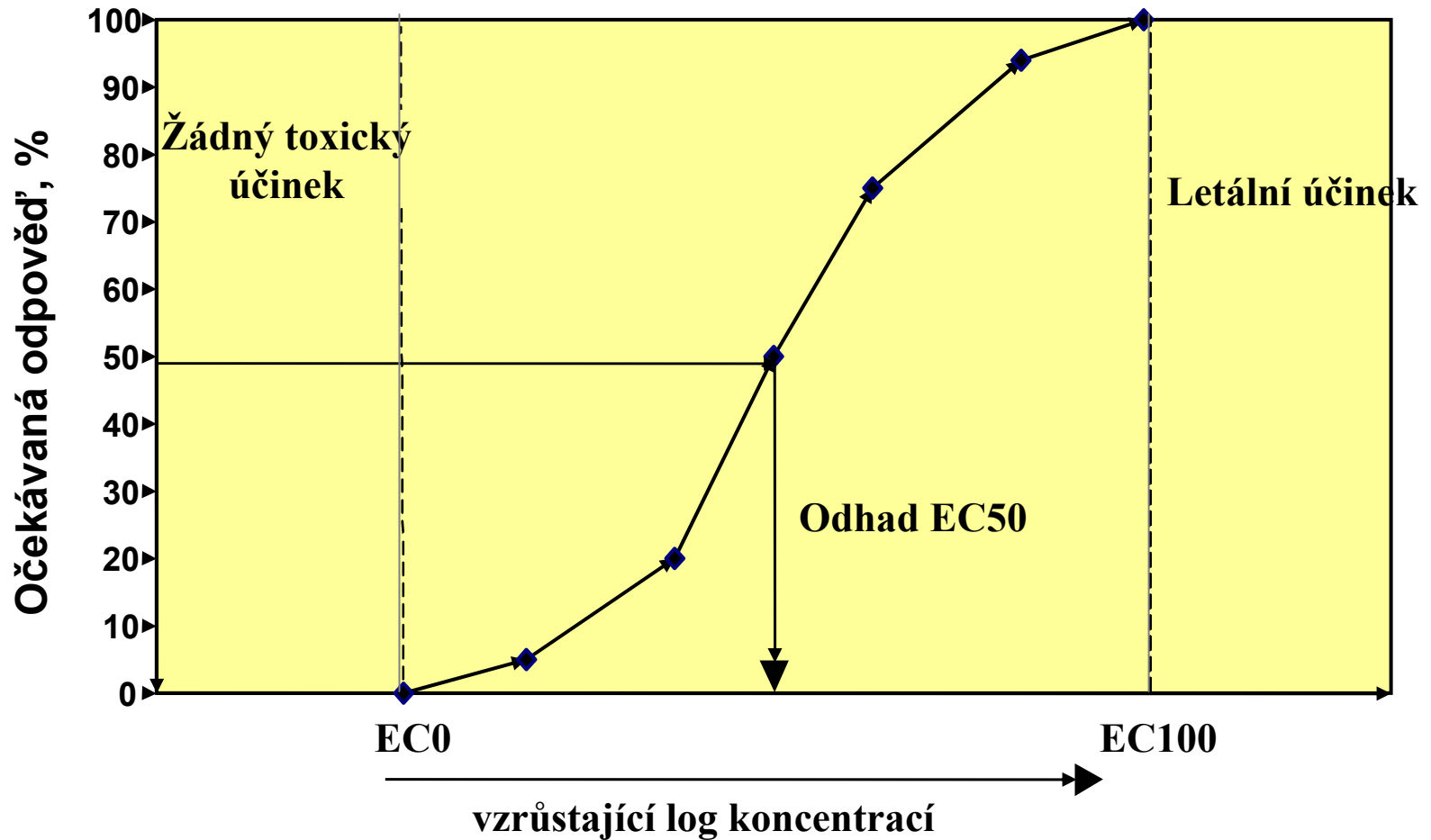
- NOEC: No Observed Effect Concentration. Nejvyšší testovaná koncentrace látky, která nezpůsobila statisticky významný účinek v porovnání s kontrolou
- LOEC: Lowest Observed Effect Concentration. Nejnižší testovaná koncentrace látky, která způsobila statisticky významný účinek v porovnání s kontrolou. 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 nazývaná “chronická hodnota”

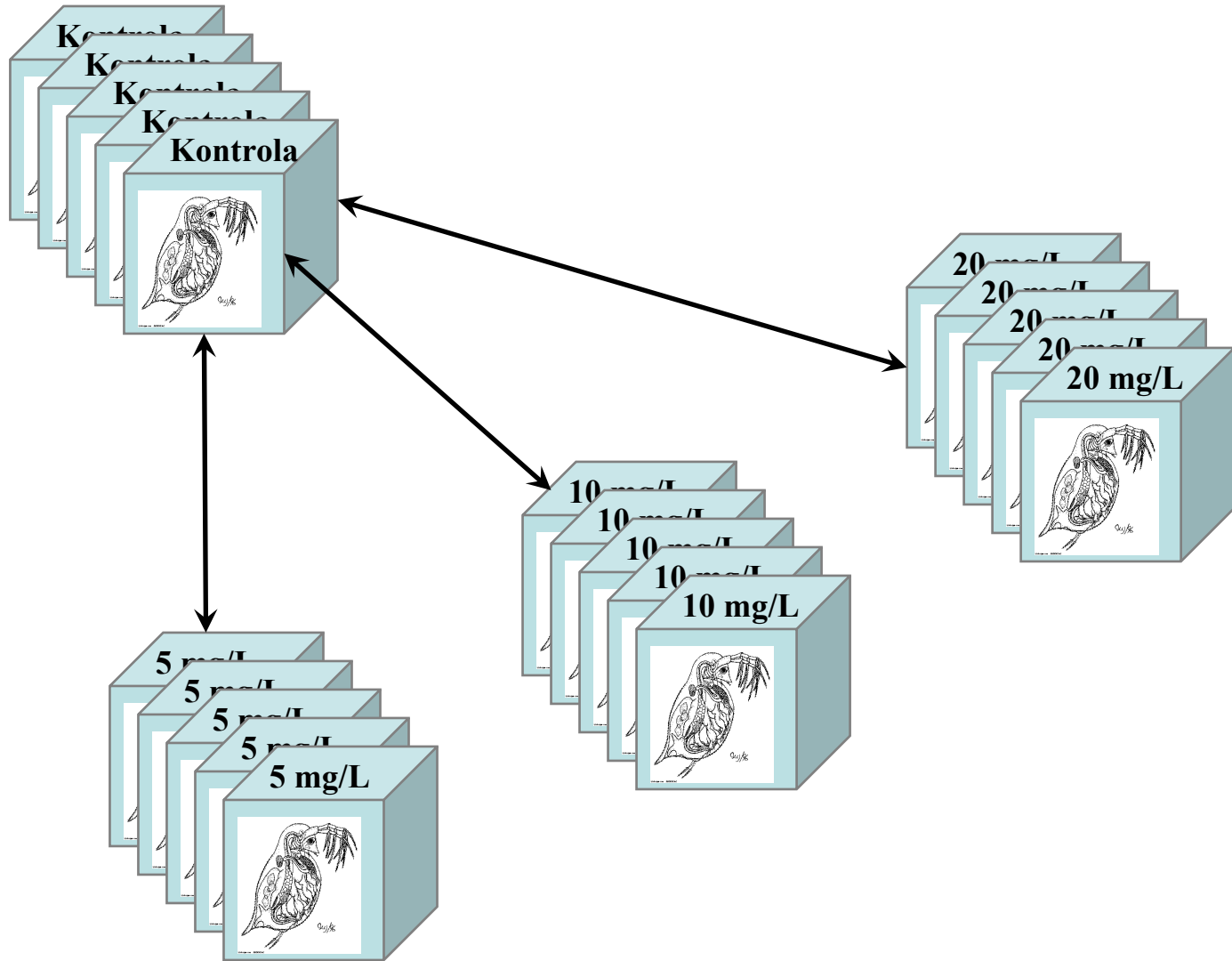
# Výběr koncentrací



# 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

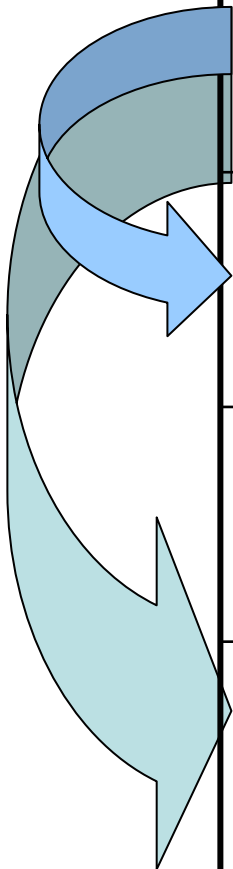
# Stanovení NOEC



# Příklad určení NOEC

Porovnááme 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 m/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
Average value	20	19,8
Variance	0	0,2
No of observations	5	5
Difference	4	
t stat	1	
P(T<=t) (1)	0,18695	
t krit (1)	2,131846	
P(T<=t) (2)	0,373901	
t krit (2)	2,776451	

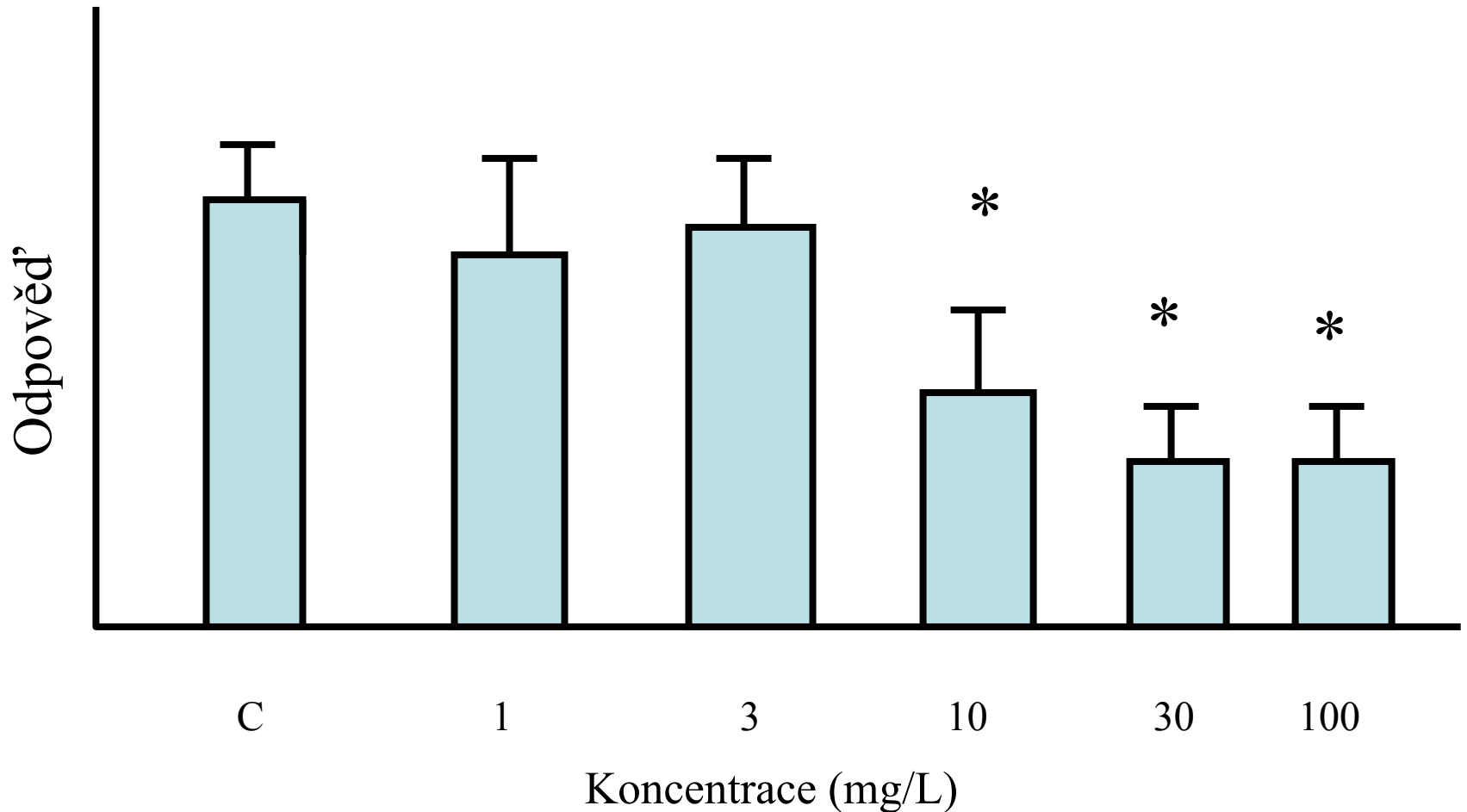
	Control	10 mg/L
Average value	20	19,4
Variance	0	0,3
No of observations	5	5
Difference	4	
t stat	2,44949	
P(T<=t) (1)	0,035242	
t krit (1)	2,131846	
P(T<=t) (2)	0,070484	
t krit (2)	2,776451	

NOEC

	Control	20 mg/L
Stř. hodnota	20	18,8
Rozptyl	0	0,2
Pozorování	5	5
Rozdíl	4	
t stat	6	
P(T<=t) (1)	0,001941	
t krit (1)	2,131846	
P(T<=t) (2)	0,003883	
t krit (2)	2,776451	

LOEC

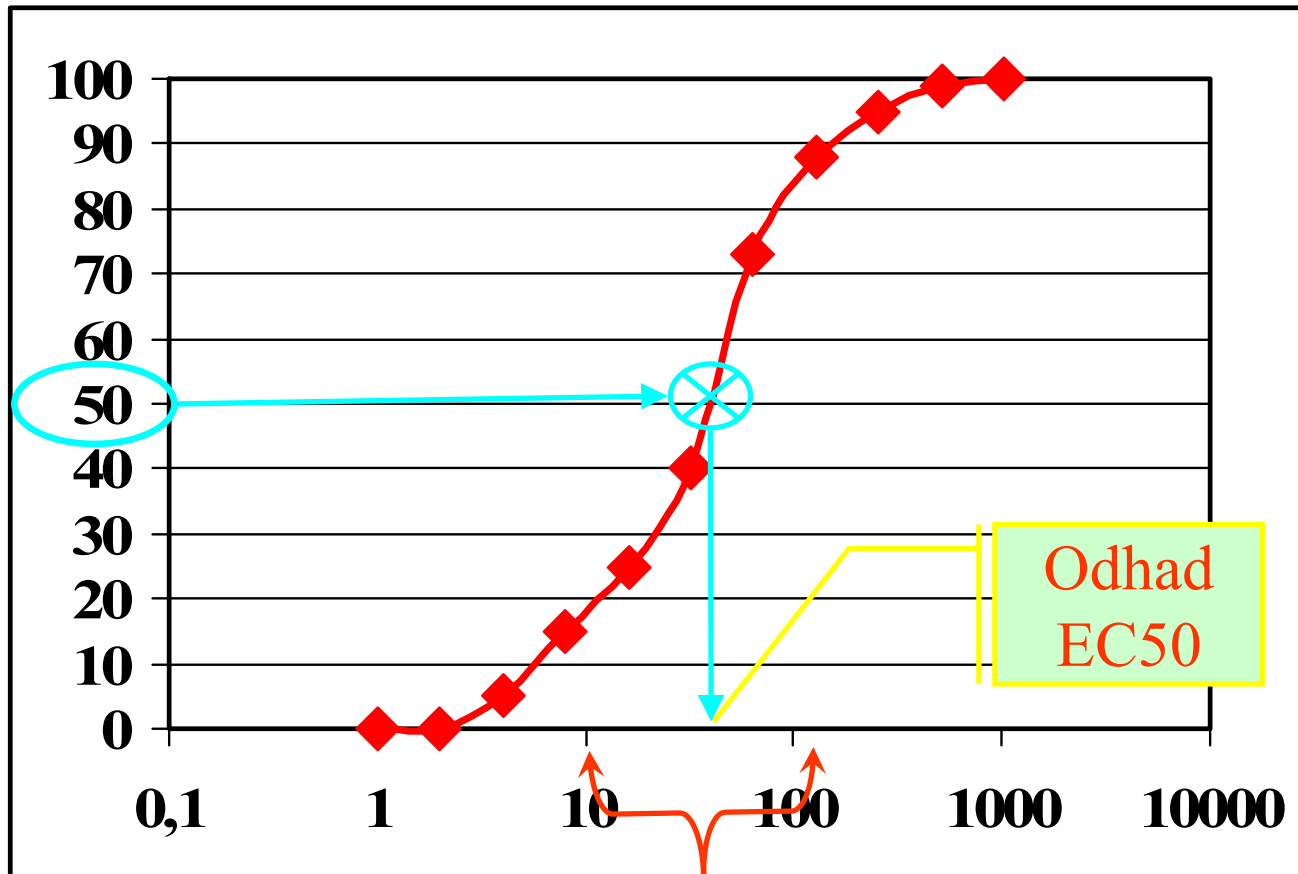
# Výsledek analýzy rozptylu



# Nevýhody stanovených parametrů

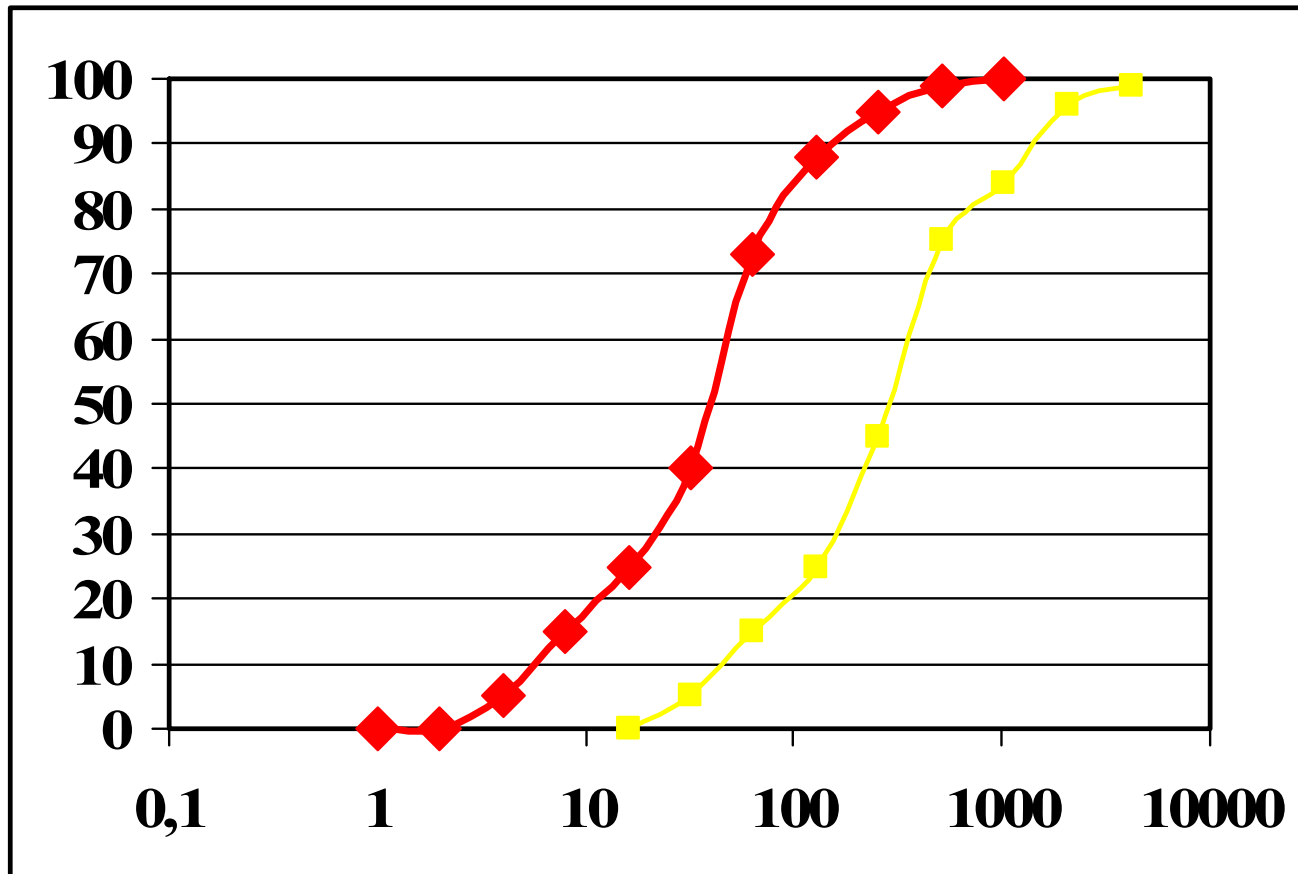
- Jejich hodnota je silně závislá na designu experimentu a na:
  - Počtu opakování
  - Počtu testovaných koncentrací
  - Proceduře výběru koncentrací
  - Přirozené variabilitě systému
  - Použitých statistických metodách

# Křivka dávka – odpověď



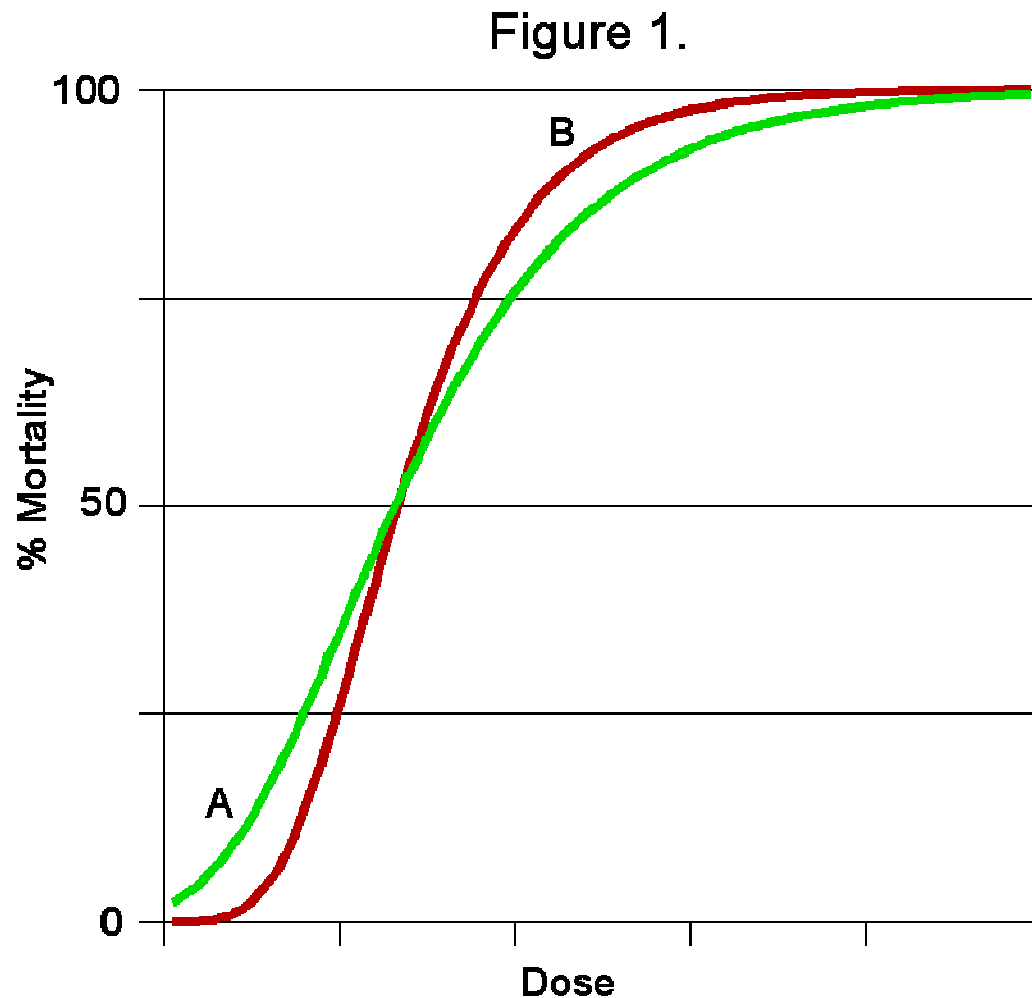
Interval spolehlivosti EC50

# Srovnání dvou toxikantů



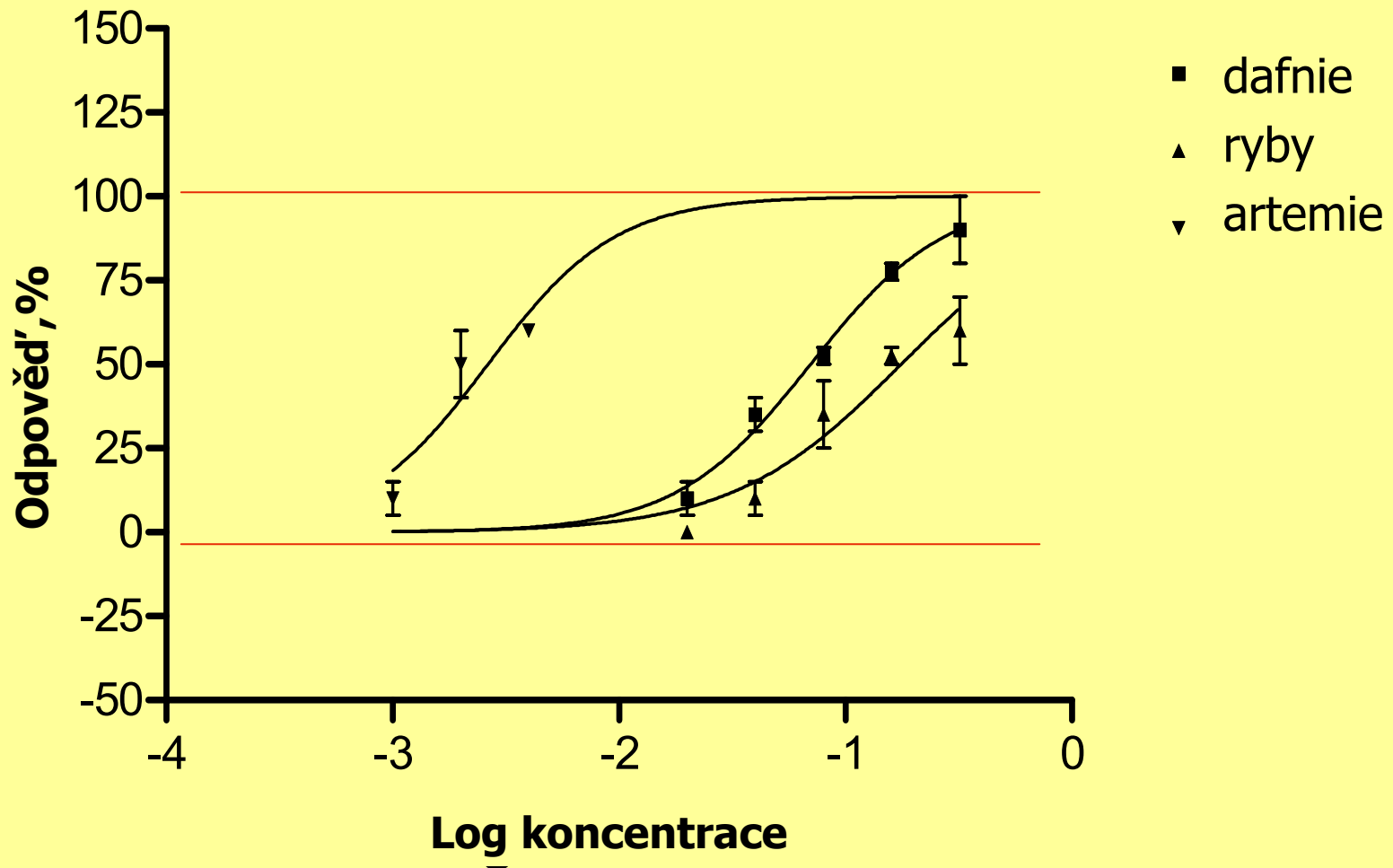
**Látka s odpovědí, kterou zobrazuje červená křivka je toxičtější než ta se žlutou křivkou**

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

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

# Dvou dávková metoda

$$\log(EC50) = x_{50} = x_1 + \frac{0,5 - p_1}{p_2 - p_1} (x_2 - x_1)$$

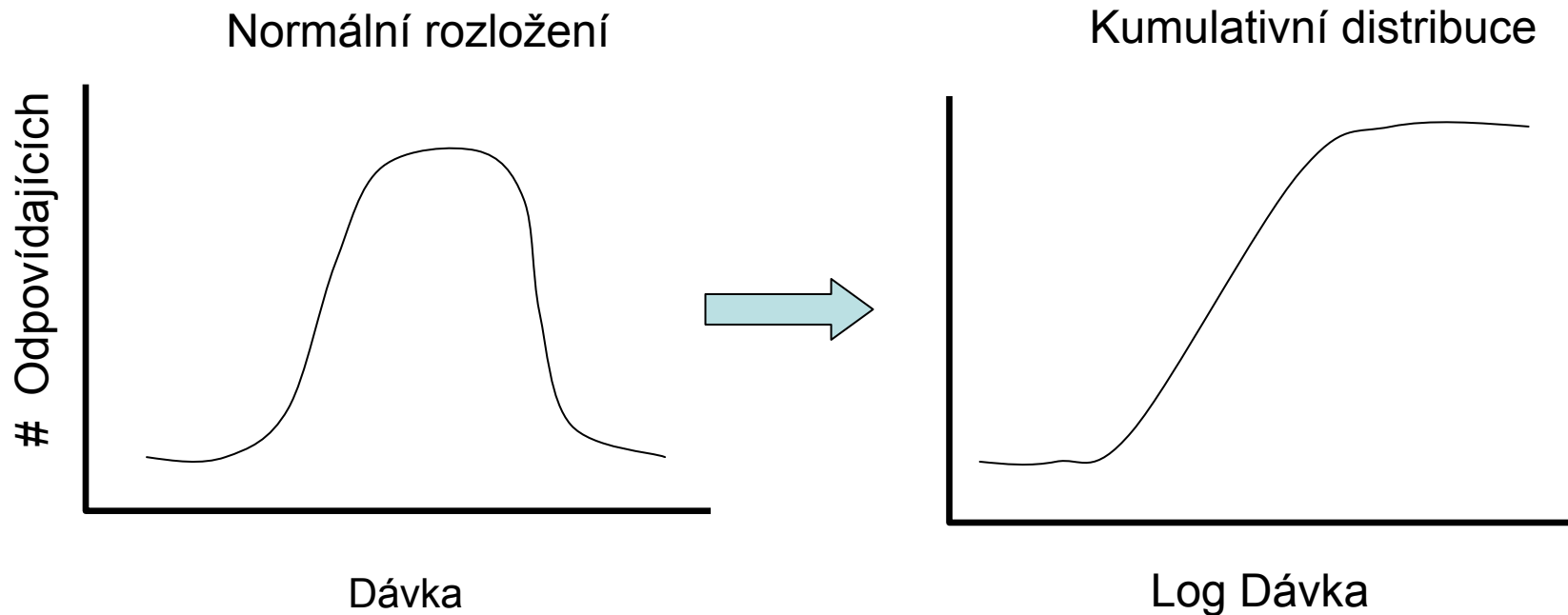
- Nejjednodušší metoda odhadu
- Pokud je EC50 zhruba známá
- Jedna koncentrace v intervalu (20; 50)
- Druhá koncentrace v intervalu (50; 80)
- Interval (20; 80) je zhruba lineární pro účinek vs. Log. koncentrací

# Analýza výsledků testů toxicity

- Založeno na hypotéze že resistance k toxikantům je normálně rozložena
- Použít *probitovou* transformaci pro usnadnění analýzy
- Založeno na SD takže každý probit je spojen s procenty odpovědi
- Průměrná odpověď je definována jako probit = 5, všechny probity jsou pozitivní → snazší vizualizace
- Je možno využít probitovou analýzu k výpočtu  $LC_{50}$  protože probitová transformace zlinearizuje (narovná) kumulativní distribuční křivku

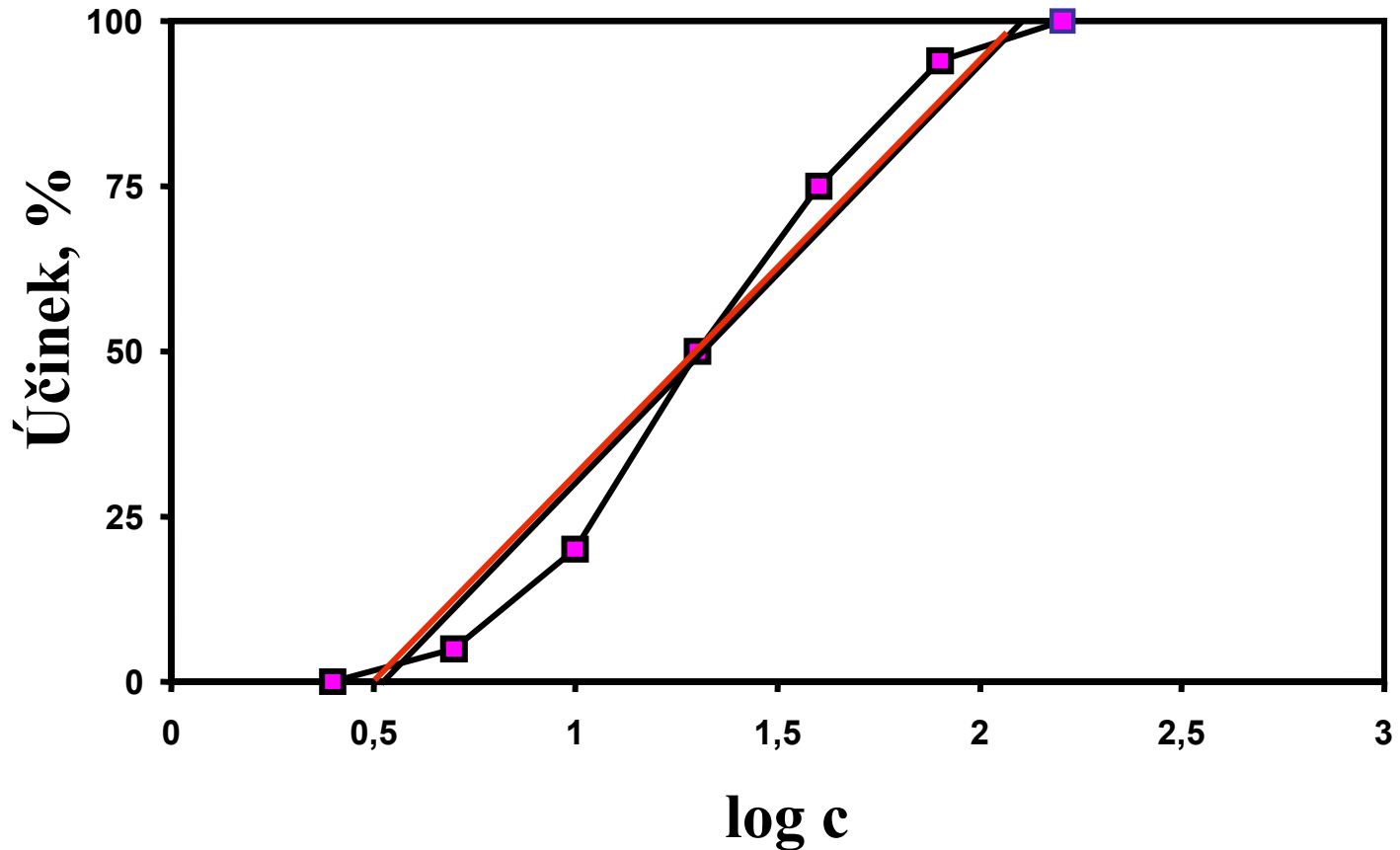
# Probitová analýza

- Odpověď organismů na toxické látky = normální distribuce
- Není možné měřit přímo normální rozložení neboť účinek je kumulativní - zobrazení grafu kumulativní distribuce



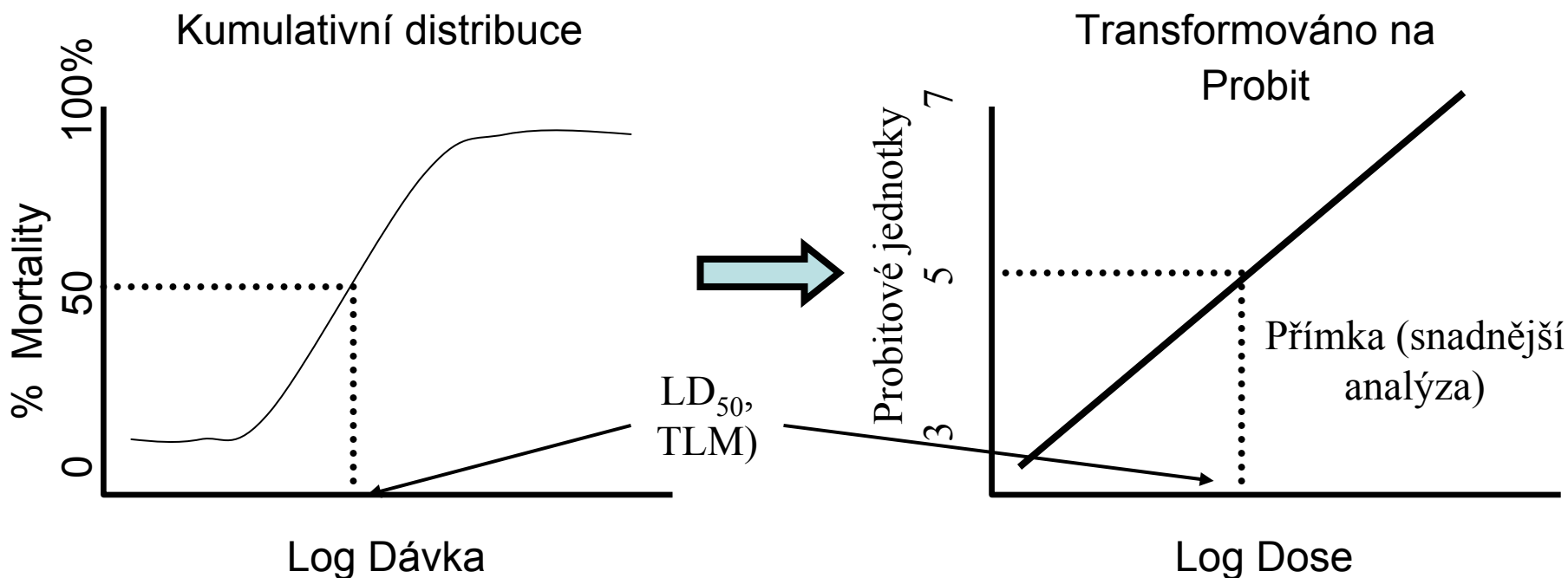
# Probitová analýza

Lineární regrese: závislost účinku na log koncentraci



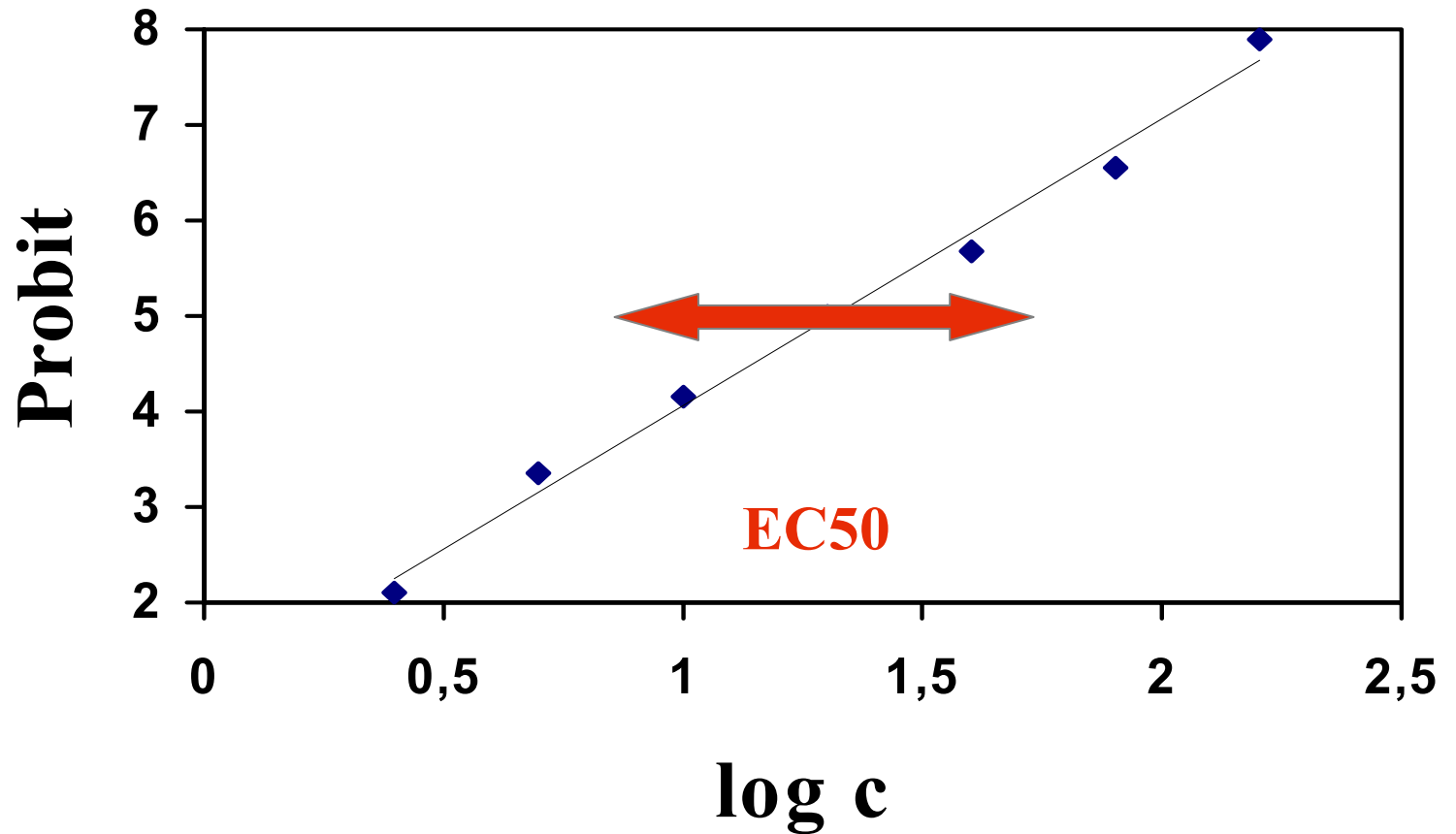
# Převedení křivky dávka-odpověď na přímku (lineární odpověď)

- Problematické hodnotit křivku
- Převedení křivky dávka-odpověď na přímku by hodnocení usnadnilo



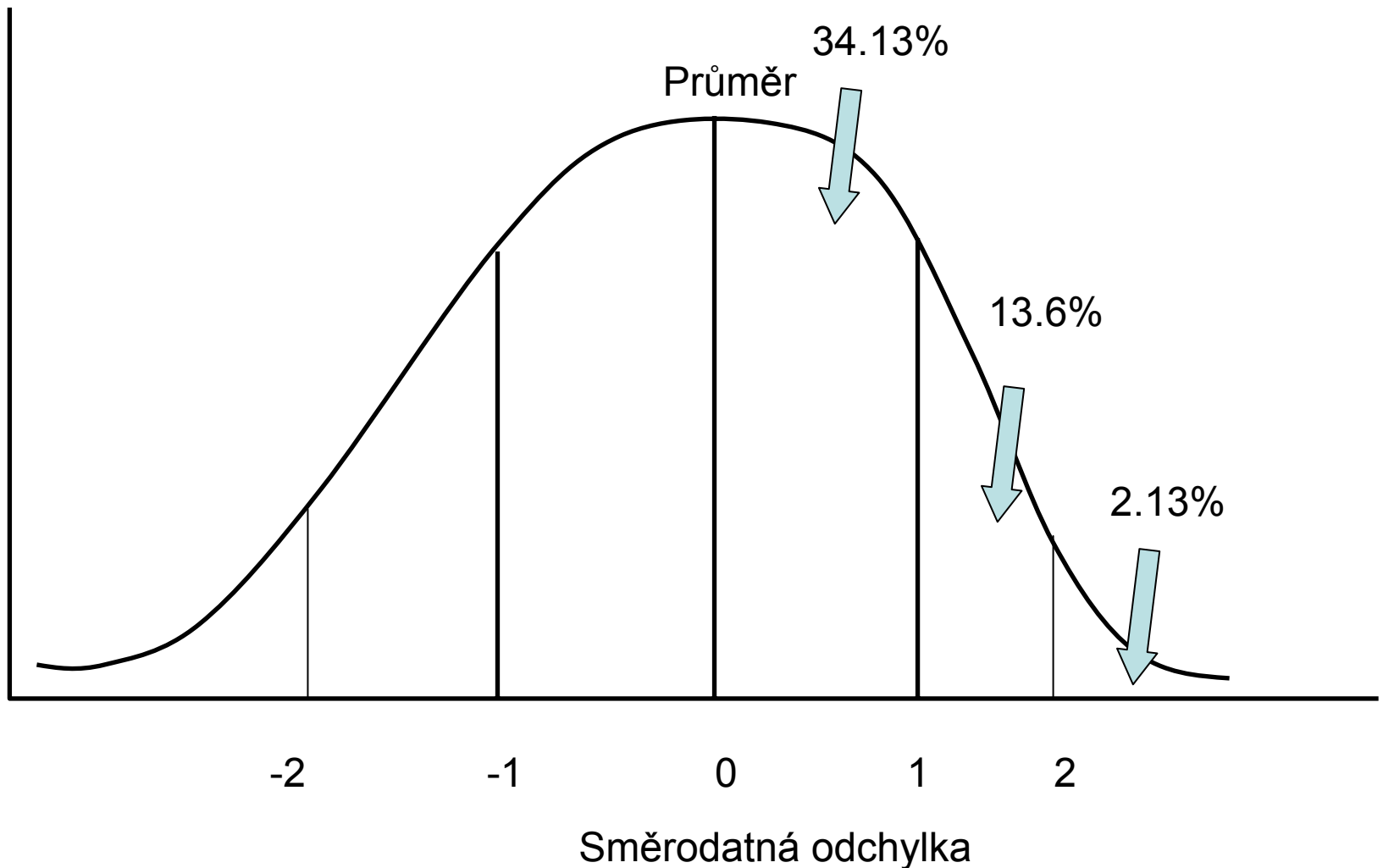
%	probit	%	probit	%	probit	%	probit	%	probit	%	probit
0,2	2,122	10,0	3,718	30,0	4,476	50,0	5,000	70,0	5,524	90,0	6,282
0,4	2,348	11,0	3,773	31,0	4,504	51,0	5,025	71,0	5,553	91,0	6,341
0,6	2,488	12,0	3,825	32,0	4,532	52,0	5,050	72,0	5,583	92,0	6,405
0,8	2,591	13,0	3,874	33,0	4,560	53,0	5,075	73,0	5,613	93,0	6,476
1,0	2,574	14,0	3,920	34,0	4,588	54,0	5,100	74,0	5,643	94,0	6,585
1,2	2,743	15,0	3,964	35,0	4,615	55,0	5,126	75,0	5,674	95,0	6,645
1,4	2,803	16,0	4,006	36,0	4,642	56,0	5,151	76,0	5,706	95,5	6,695
1,6	2,856	17,0	4,046	37,0	4,668	57,0	5,176	77,0	5,739	96,0	6,751
1,8	2,903	18,0	4,085	38,0	4,695	58,0	5,202	78,0	5,772	96,5	6,812
2,0	2,946	19,0	4,122	39,0	4,722	59,0	5,228	79,0	5,806	97,0	6,881
2,5	3,040	20,0	4,158	40,0	4,747	60,0	5,253	80,0	5,842	97,5	6,966
3,0	3,123	21,0	4,194	41,0	4,772	61,0	5,278	81,0	5,878	98,0	7,054
3,5	3,188	22,0	4,228	42,0	4,798	62,0	5,305	82,0	5,915	98,2	7,096
4,0	3,249	23,0	4,261	43,0	4,824	63,0	5,332	83,0	5,954	98,4	7,144
4,5	3,305	24,0	4,294	44,0	4,849	64,0	5,358	84,0	5,994	98,6	7,197
5,0	3,355	25,0	4,326	45,0	4,874	65,0	5,385	85,0	6,036	98,8	7,257
6,0	3,445	26,0	4,357	46,0	4,900	66,0	5,412	86,0	6,080	99,0	7,326
7,0	3,524	27,0	4,387	47,0	4,925	67,0	5,440	87,0	6,126	99,2	7,409
8,0	3,595	28,0	4,417	48,0	4,950	68,0	5,468	88,0	6,175	99,4	7,512
9,0	3,659	29,0	4,447	49,0	4,975	69,0	5,496	89,0	6,227	99,6	7,652
										99,8	7,878

# Lineární regrese – probit vs. Log koncentrace

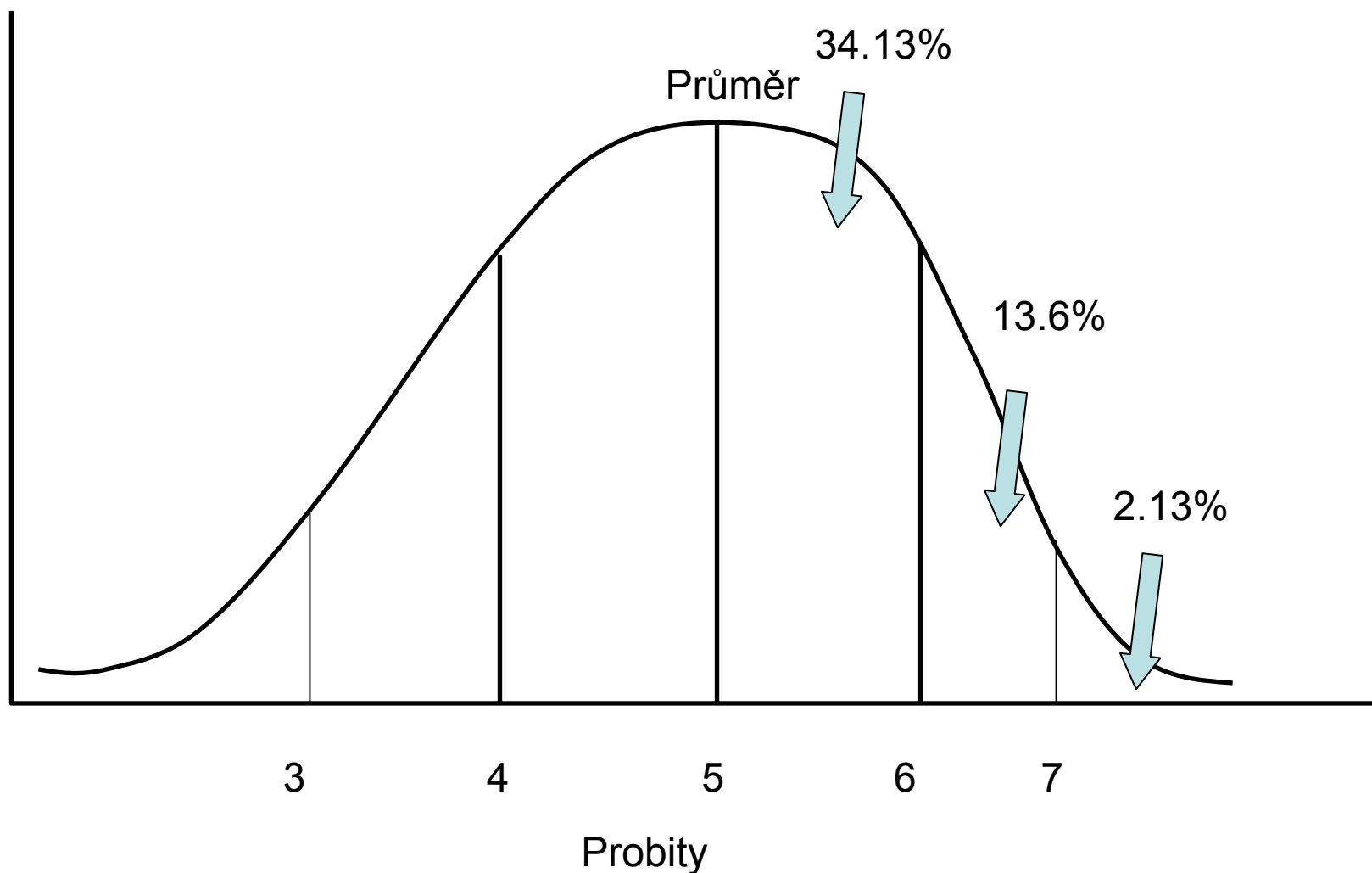




# Vztah mezi normálním rozložením a směrodatnými odchylkami



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



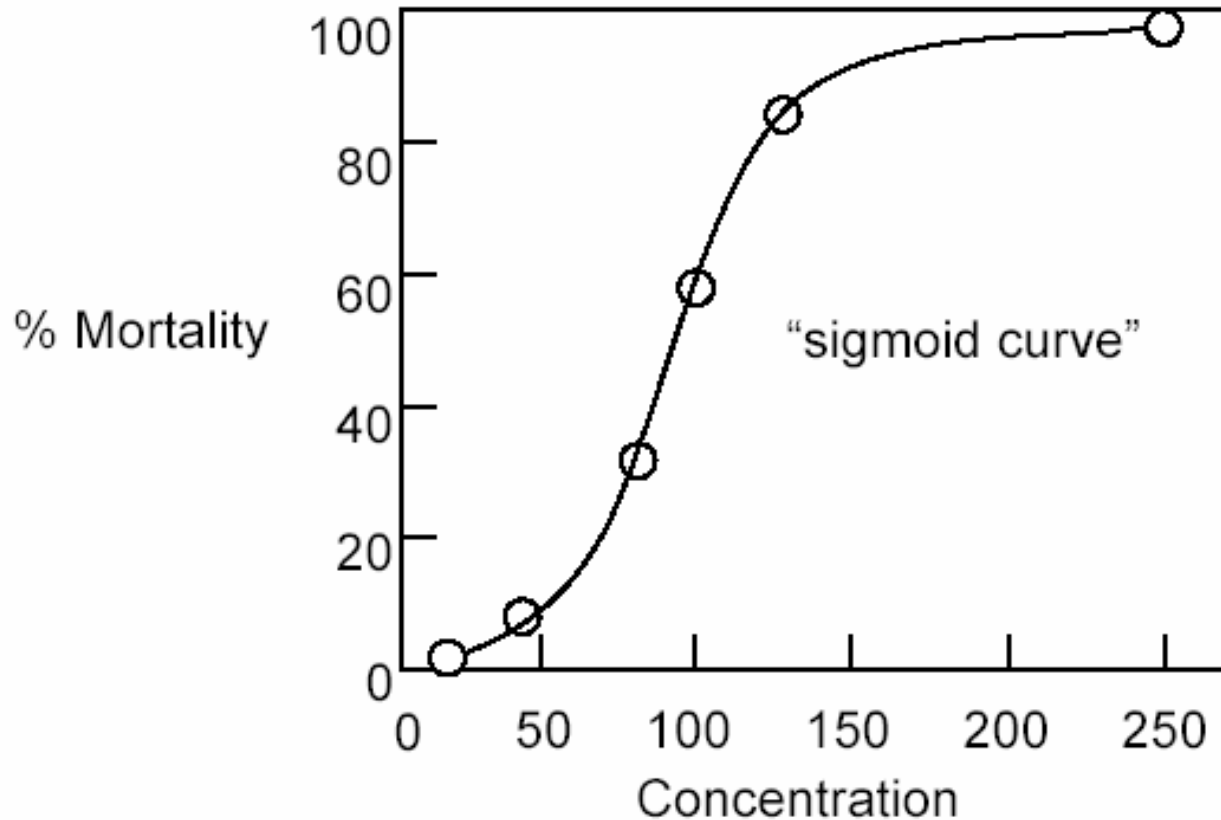
# Příklad probitové analýzy

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

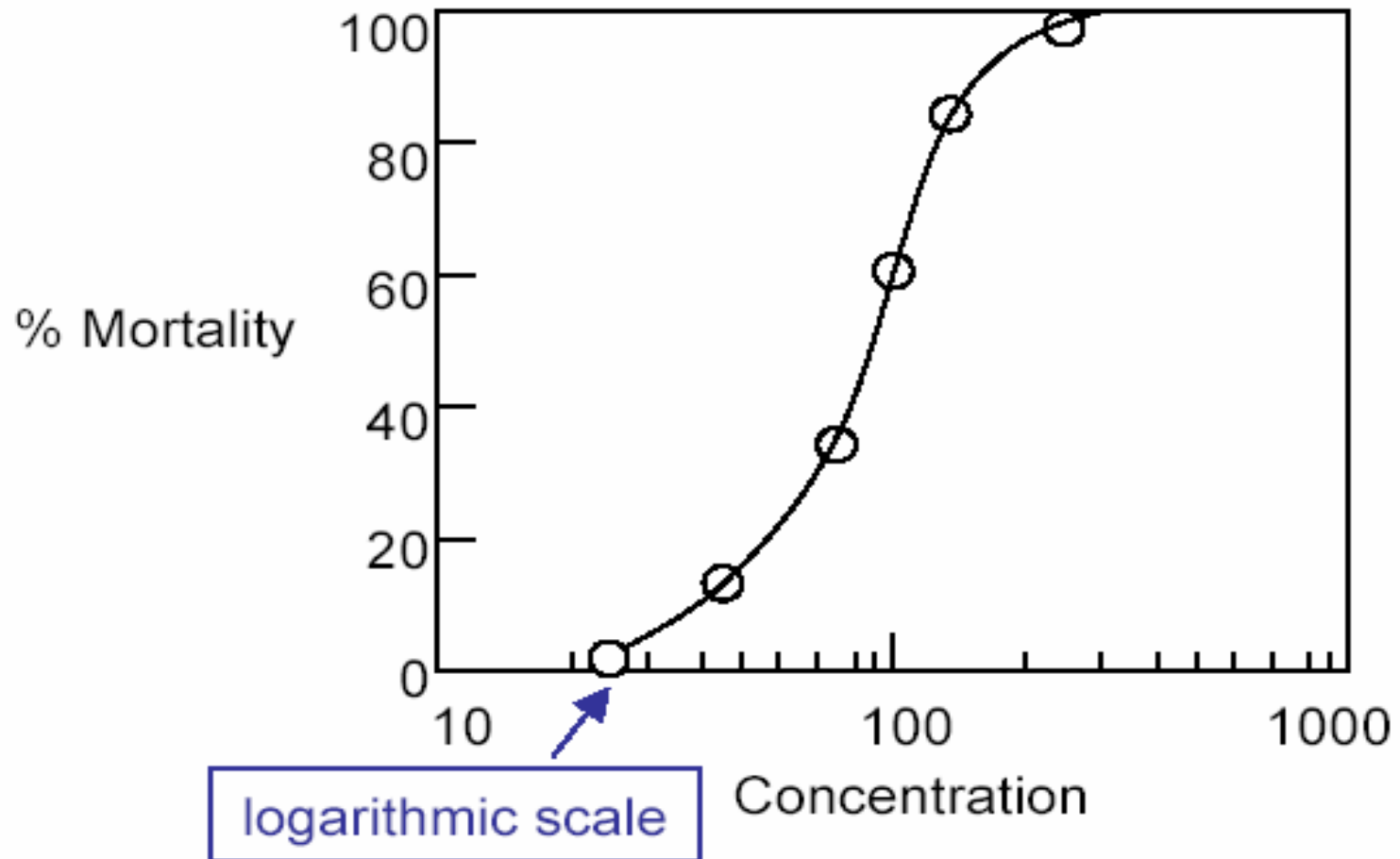
Prohlédnout data → zřejmé, že LC50 by měla být mezi 10 a 30 mg/L

Graf → fit line by eye (cca stejný počet nad a pod křivkou)

# IED model – výsledkem log normální distribuce (sigmoidní křivka)

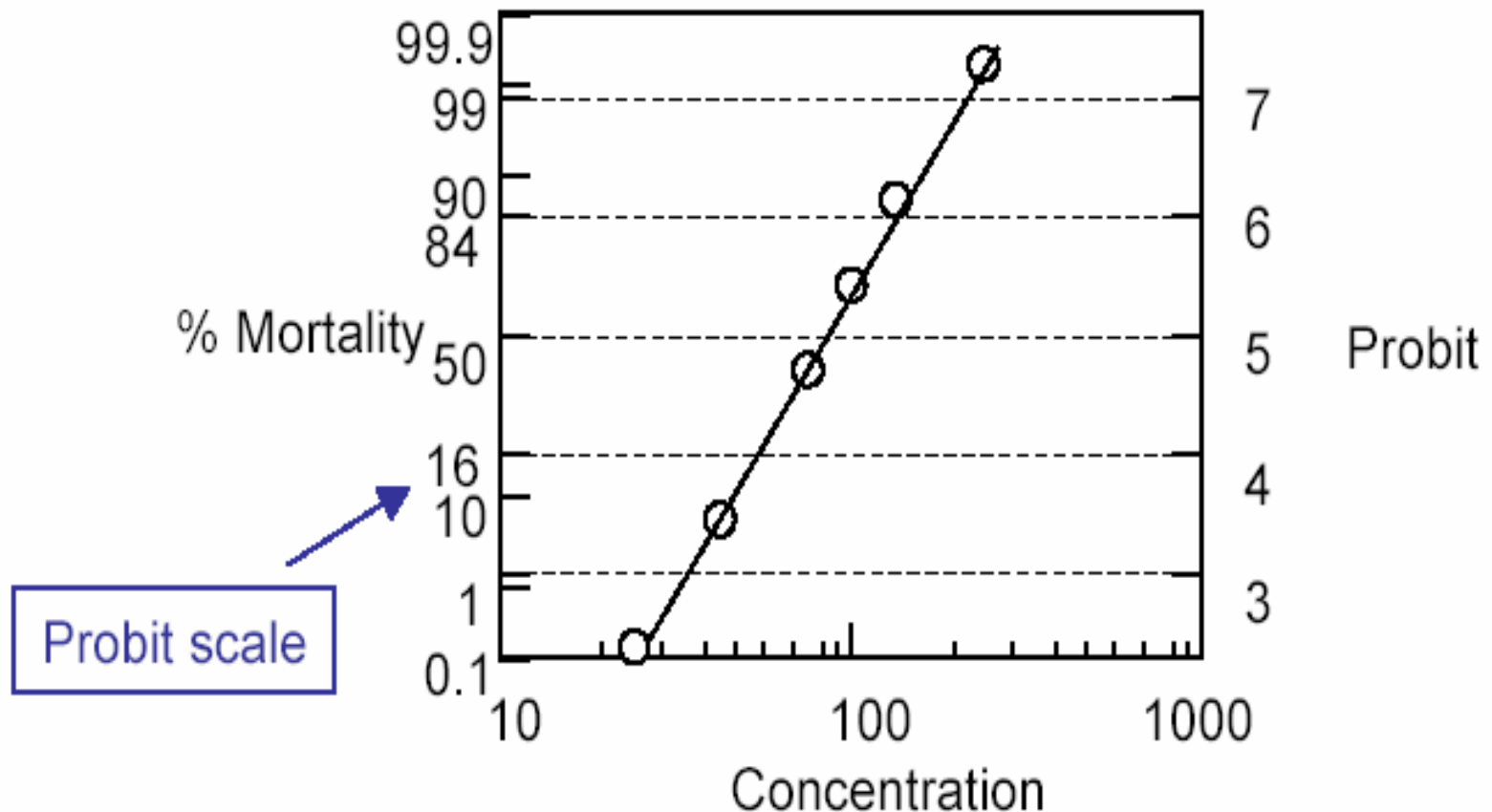


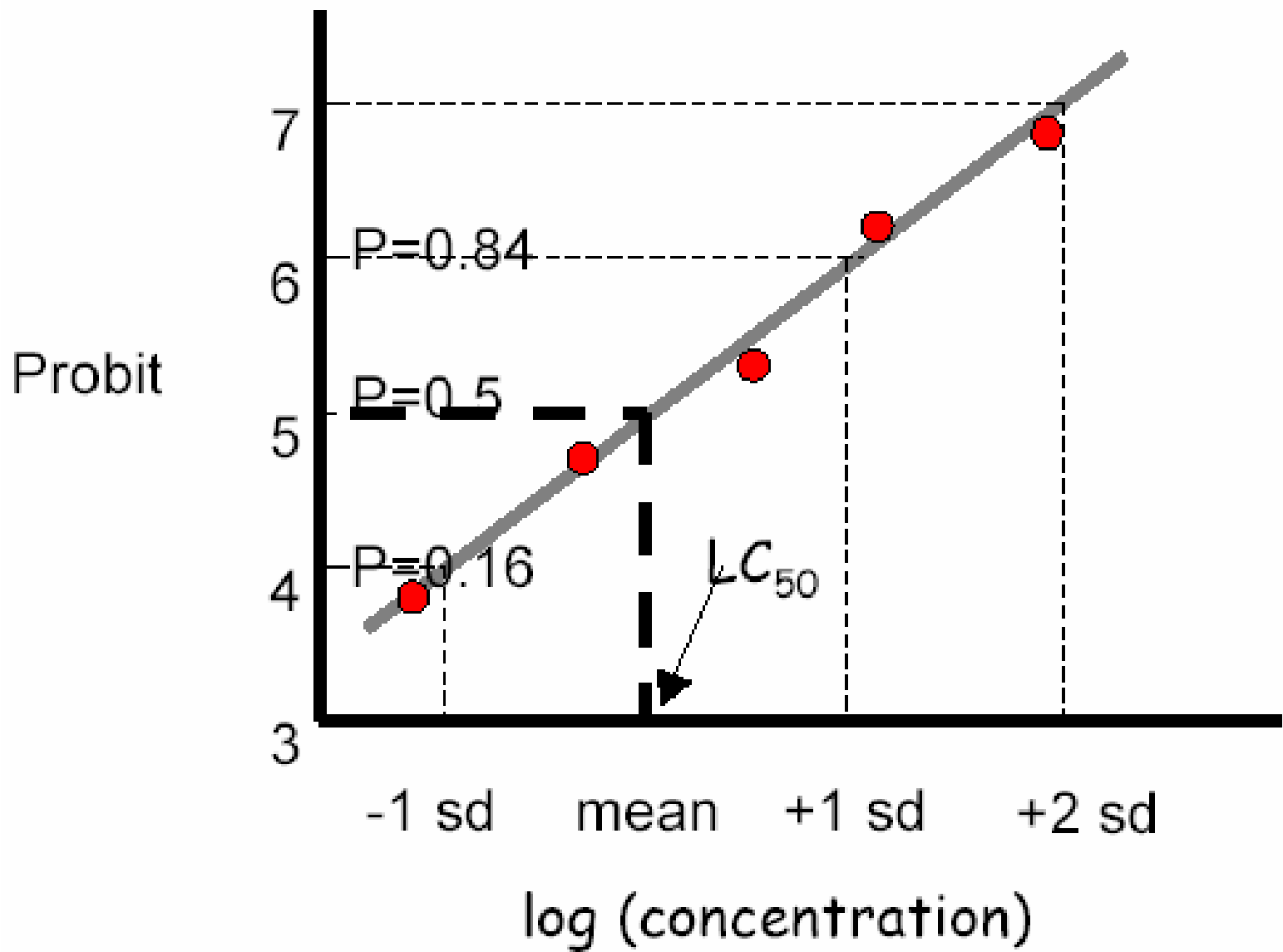
# Transformace dat : Krok 1 změnit osu “koncentrací” na logaritmické měřítko



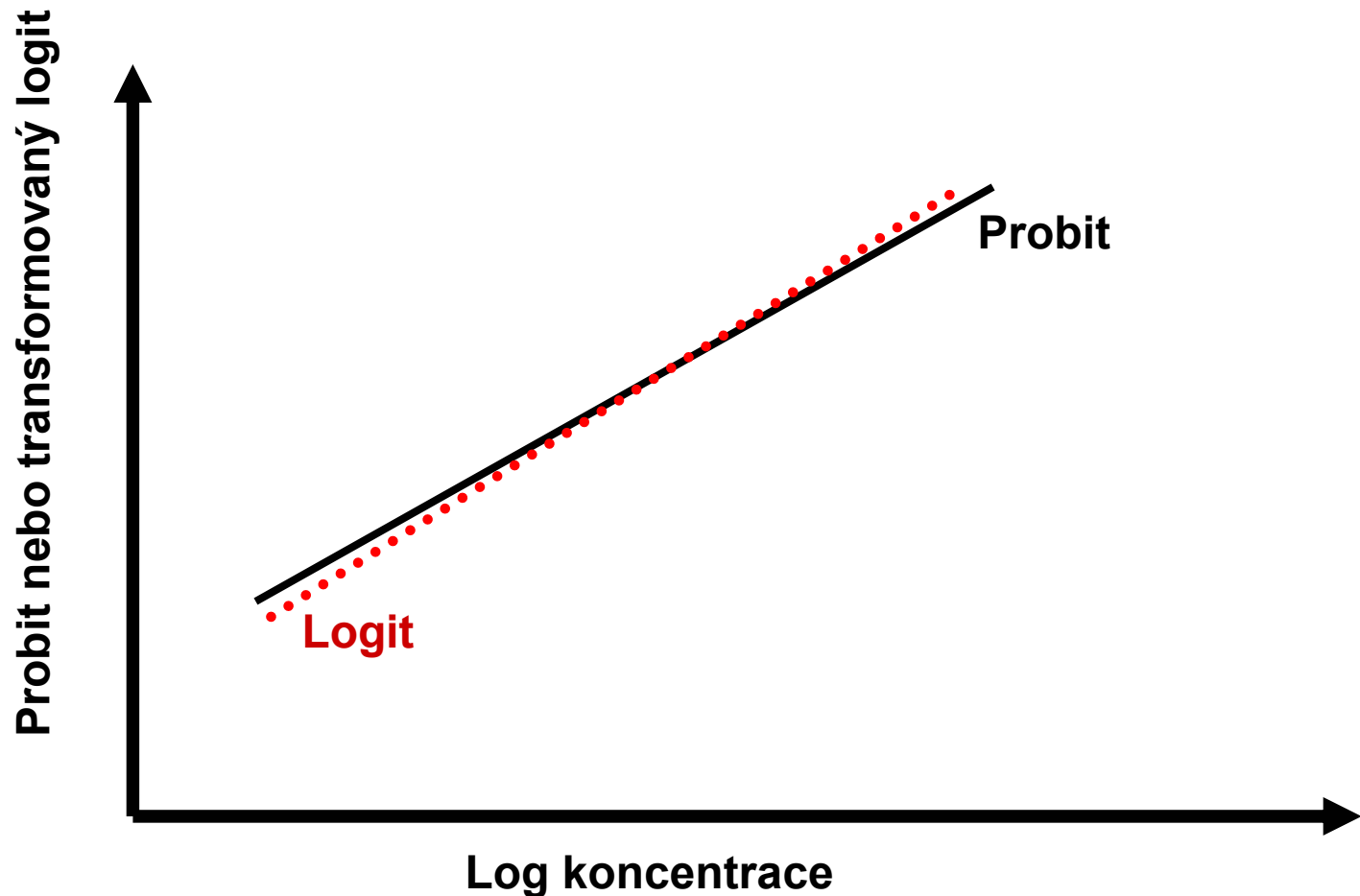
# Transformace dat: Krok 2

Převést % odpovědi na lineární formu –  
např. probit nebo logit



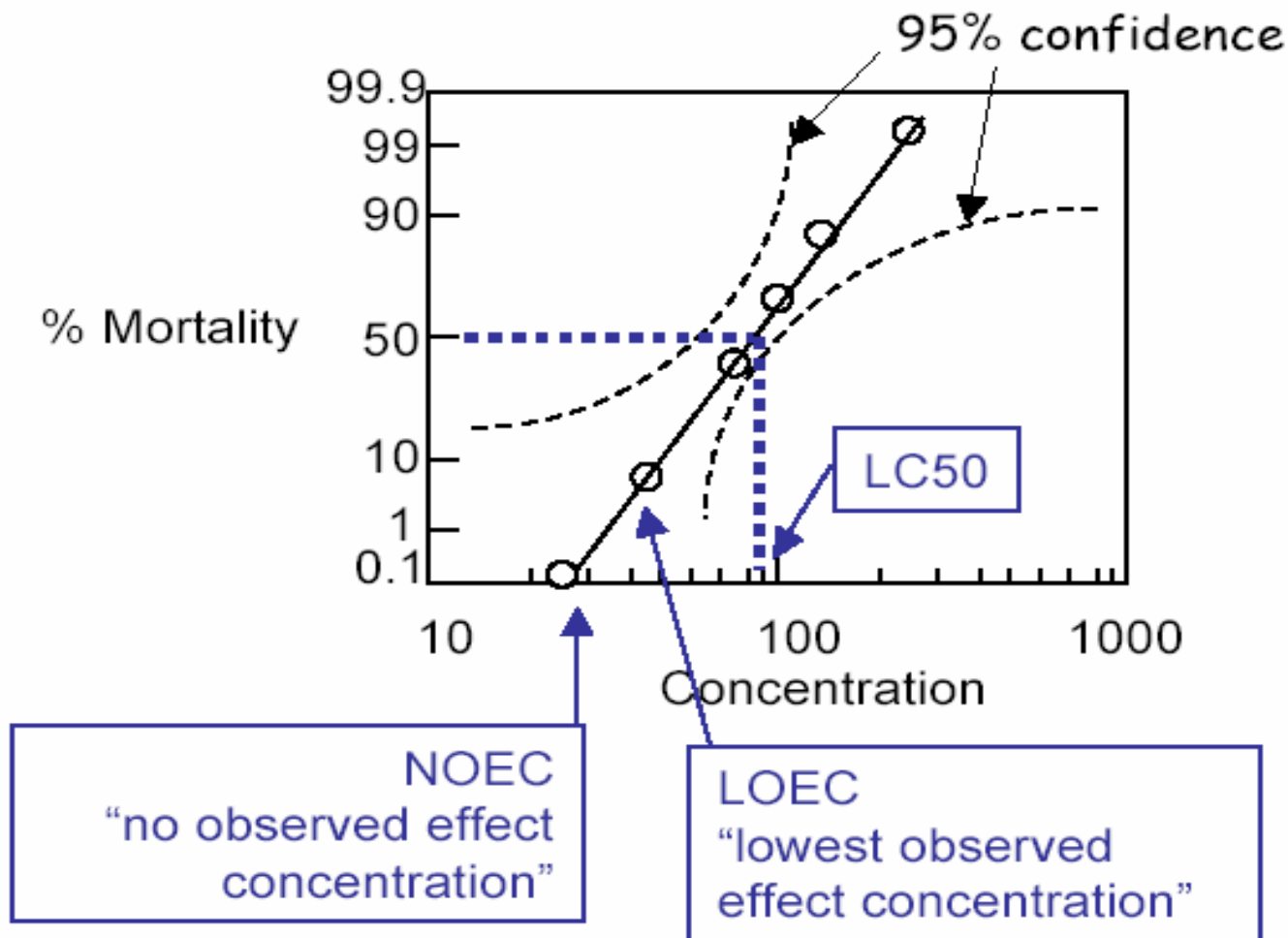


# Výsledné přímky nejsou příliš rozdílné

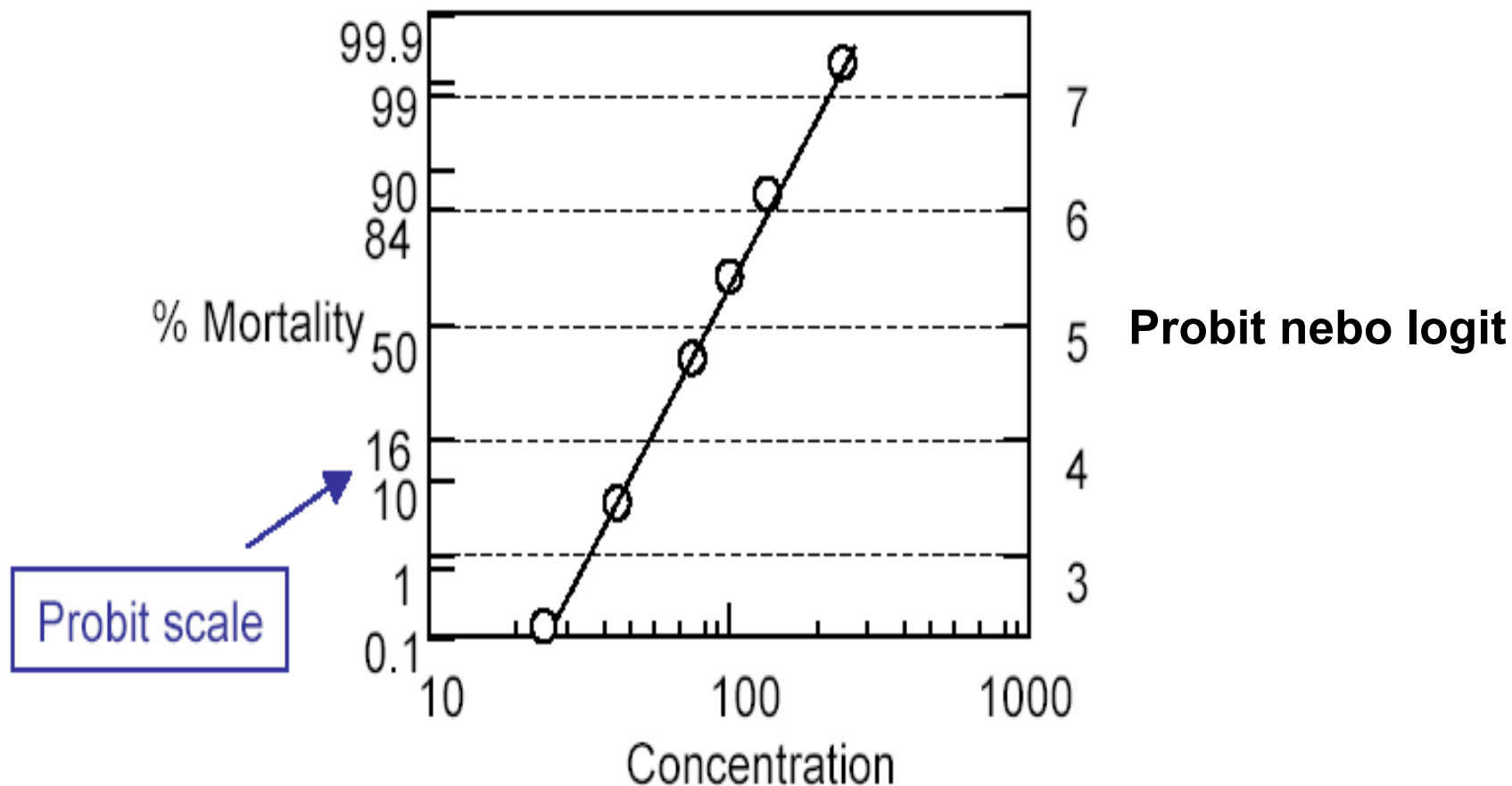




# Parametry toxicity odvozeny z křivek dávka-odpověď



# Využití probit- nebo logit-linearizované křivky dávka - odpověď



# 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  $\log(LC50)$

vypočítat  $LC50 = 10^{\log(LC50)}$

# Využití LC<sub>50</sub>

## 1. Aplikační faktor

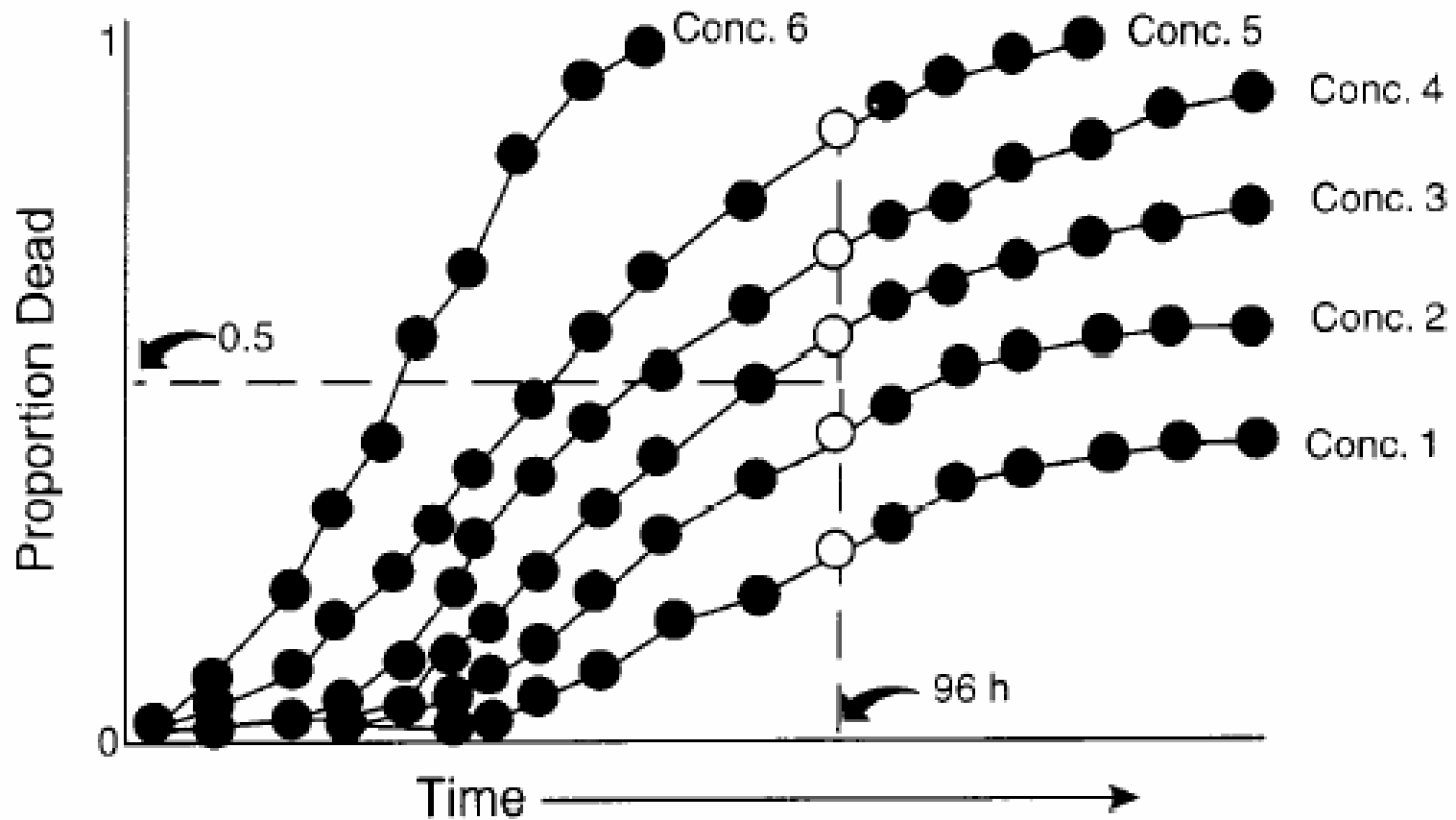
- $LC_{50} \times n = \underline{\hspace{2cm}}$  = povolená dávka
- Dobrá pokud nemáme lepší informaci (chronické testy)

## 2. Zhodnocení rizika → nižší LC<sub>50</sub> = toxičtější

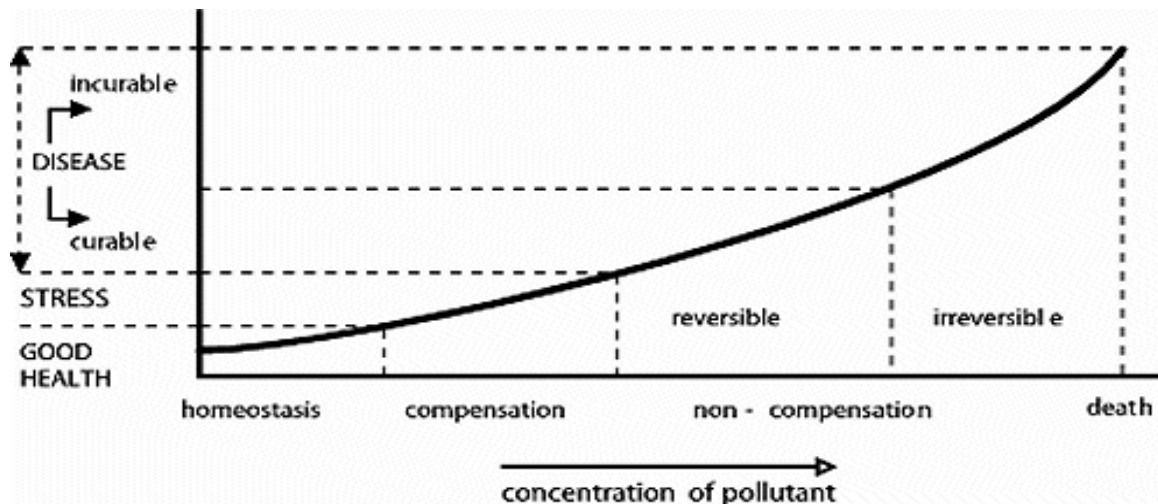
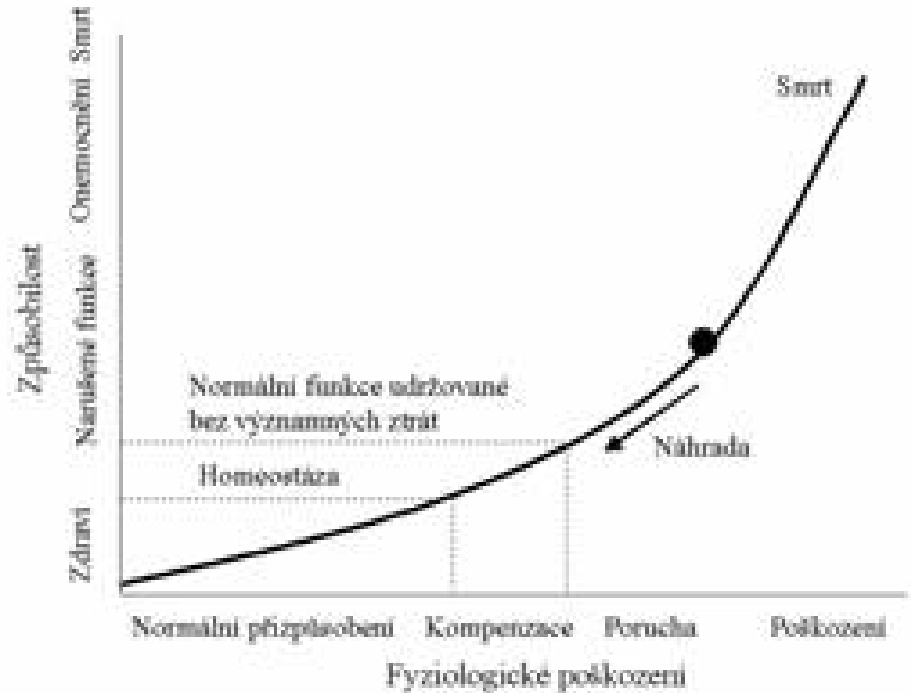
## 3. Vede k chronickému testování

- LC<sub>50</sub> 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



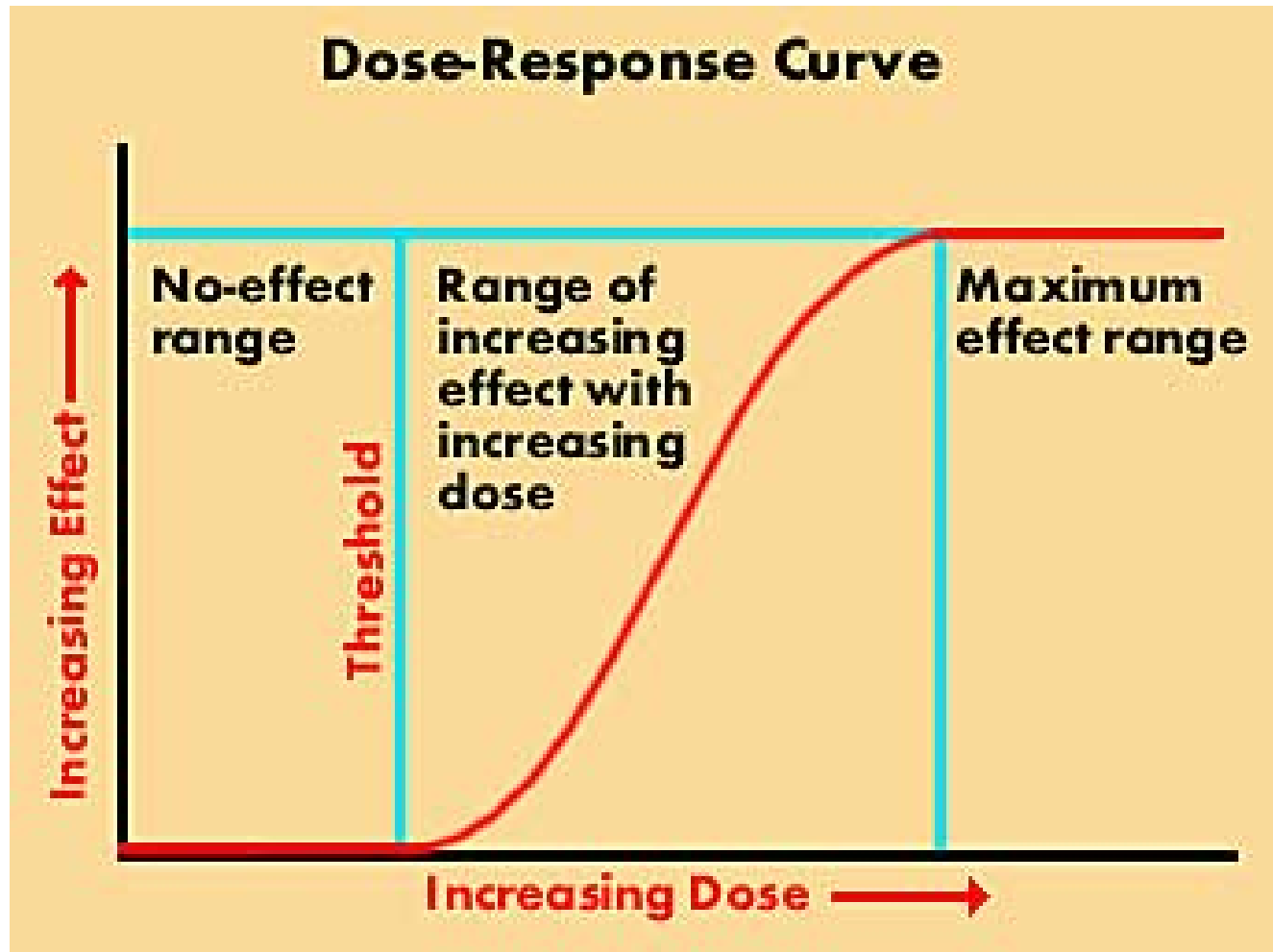
# Teorie zdravotní kondice ve vztahu k expozici toxickou látkou



# Odpověď na stres: prahová, bezprahová a hormeze

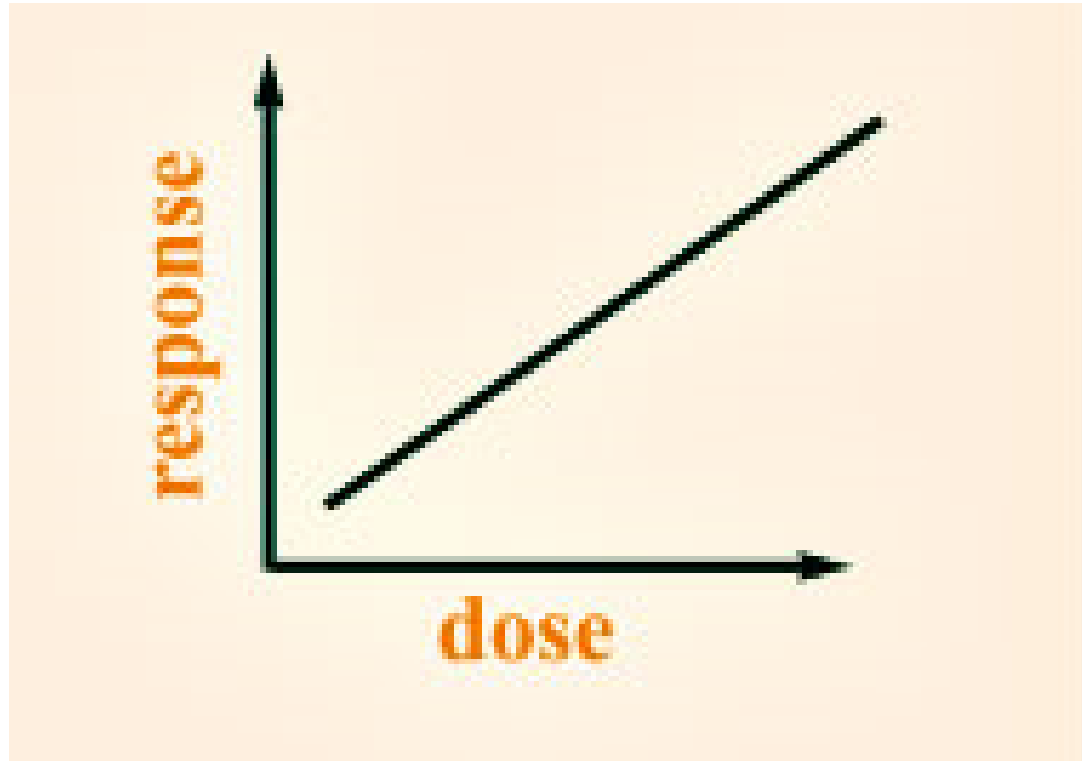
- Prahová – žádná biologická odpověď při nízké dávce, pak se odpověď projeví se vzrůstající dávkou
- Bezprahová – bez biologické odpovědi pouze na nulové koncentraci
- Hormeze – počáteční biologická odpověď na toxikant je pozitivní, při vzrůstu koncentrace se stává negativní (příp. naopak?)

# Prahová odpověď

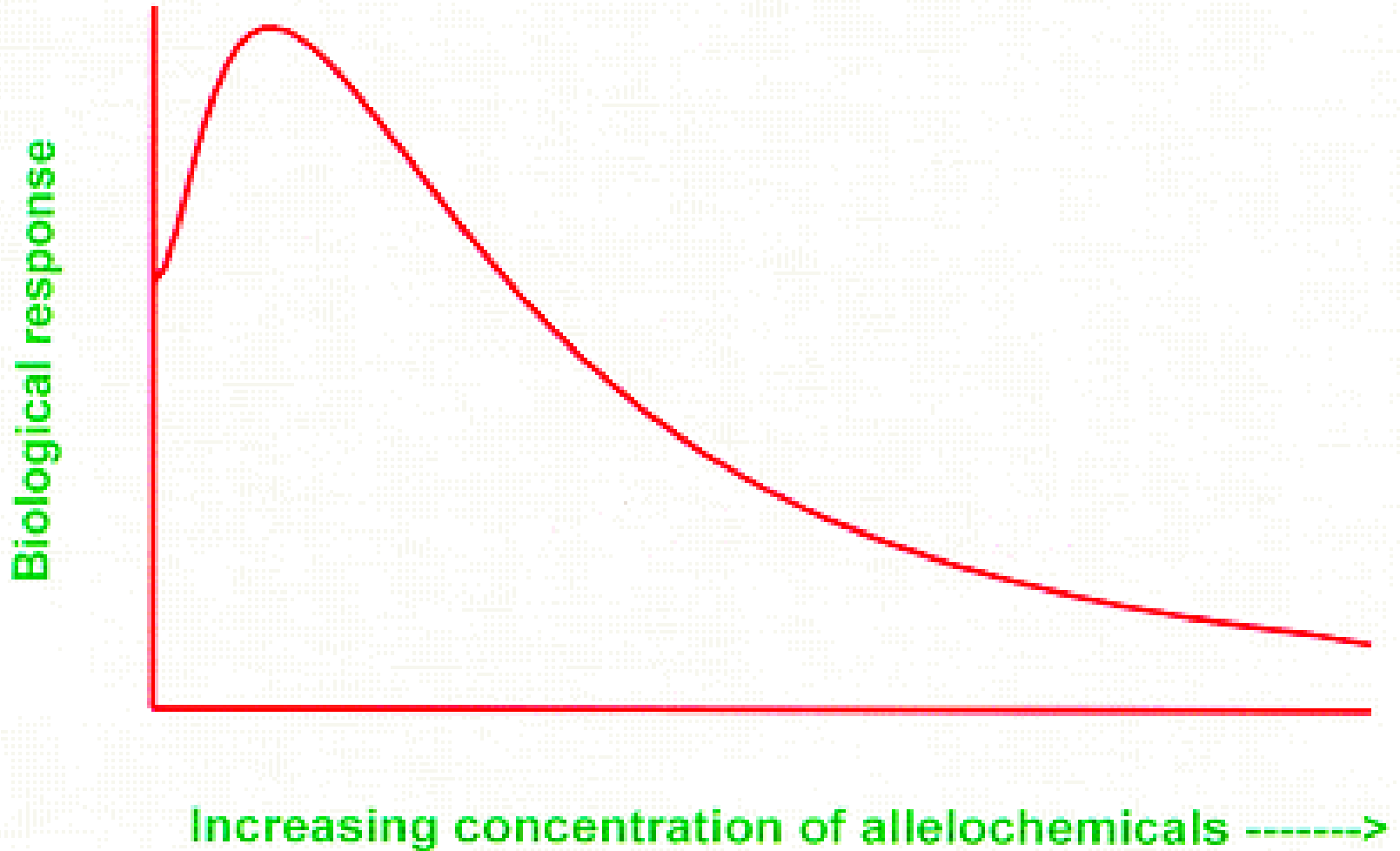




# Bezprahová odpověď



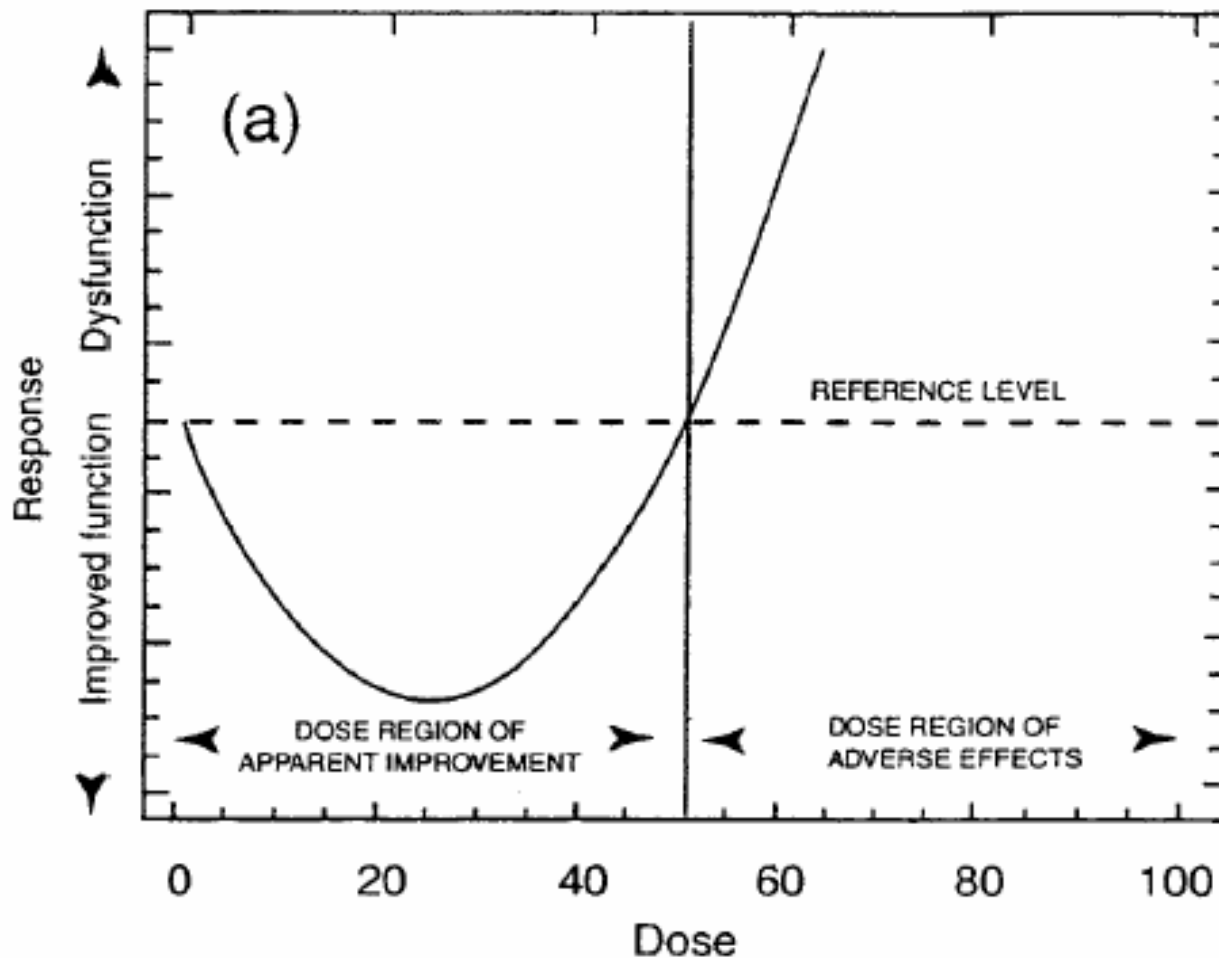
# Hormeze



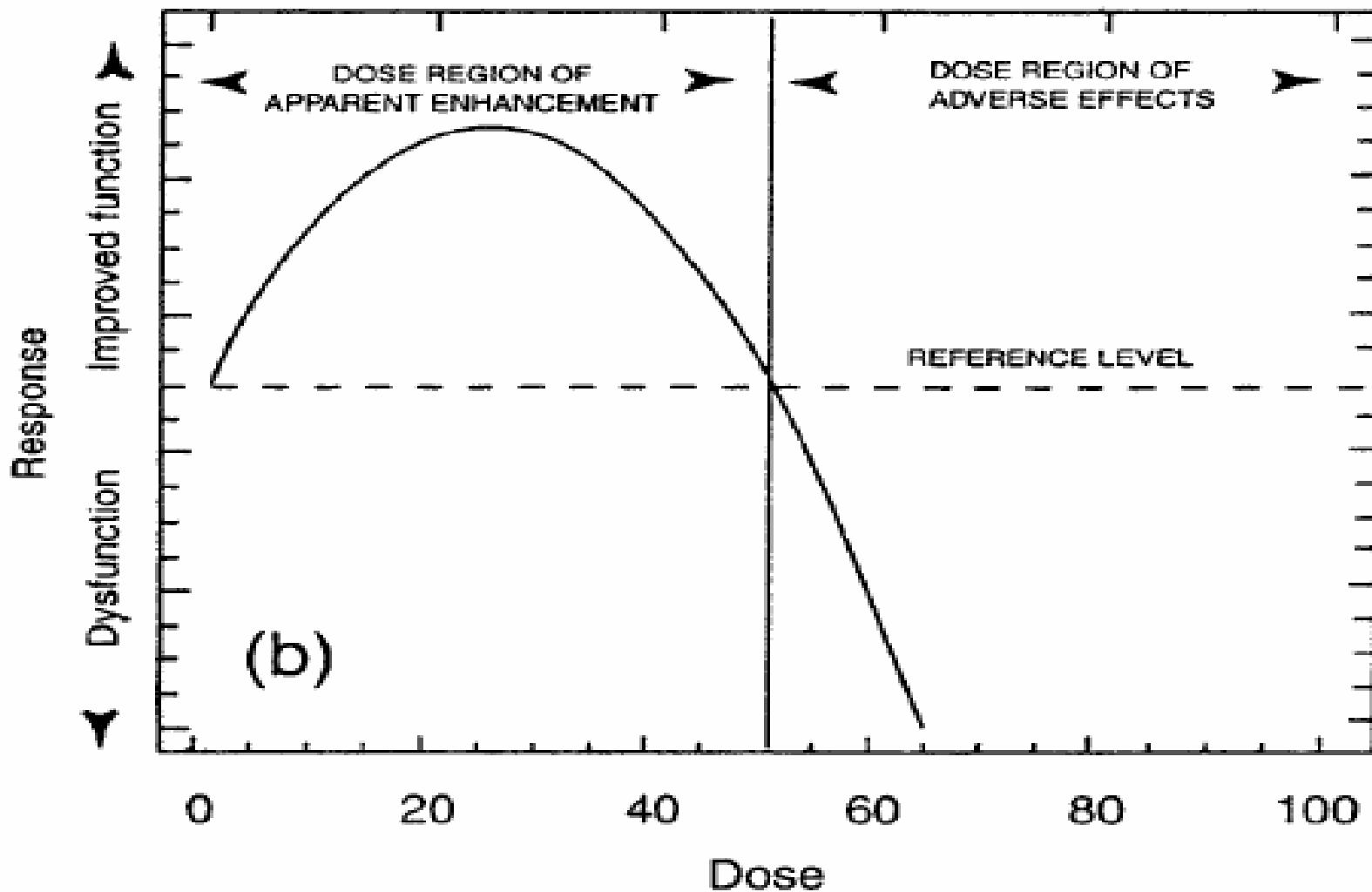
# Hormeze

- 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 neznamena, že účinky nízkých dávek jsou prospěšné, jenom to že jsou odlišné!!)
- Zapracování konceptu hormoneze do ekotoxikologie a hodnocení ekologických rizik je v současnosti limitováno nedostatečnou znalostí mechanismu hormoneze

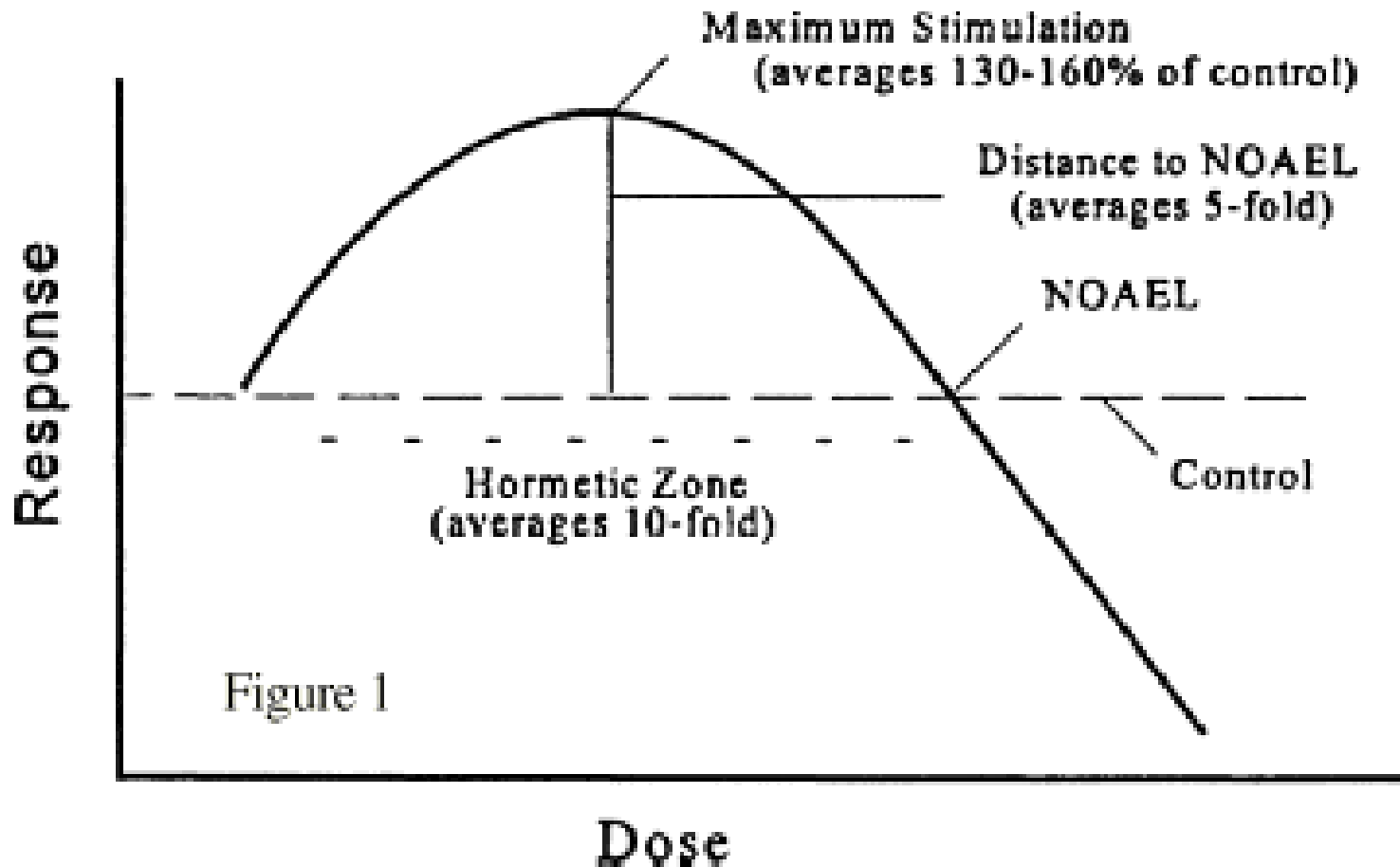
# Teoretická křivka hormeze I

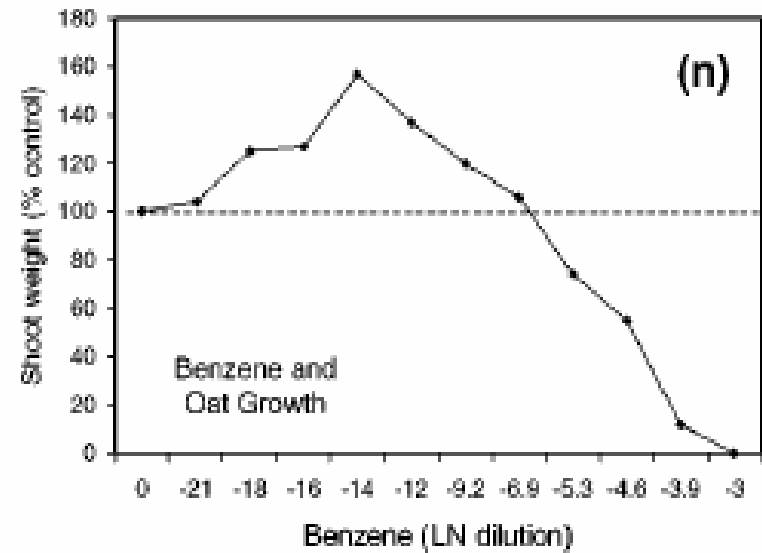
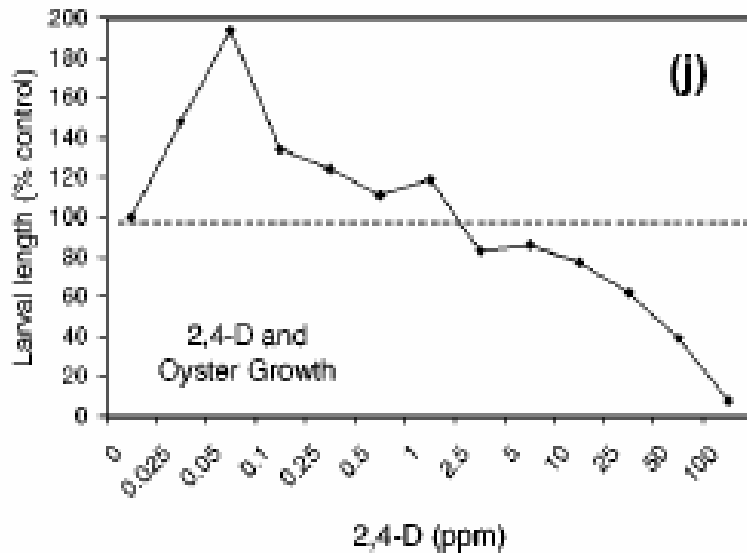
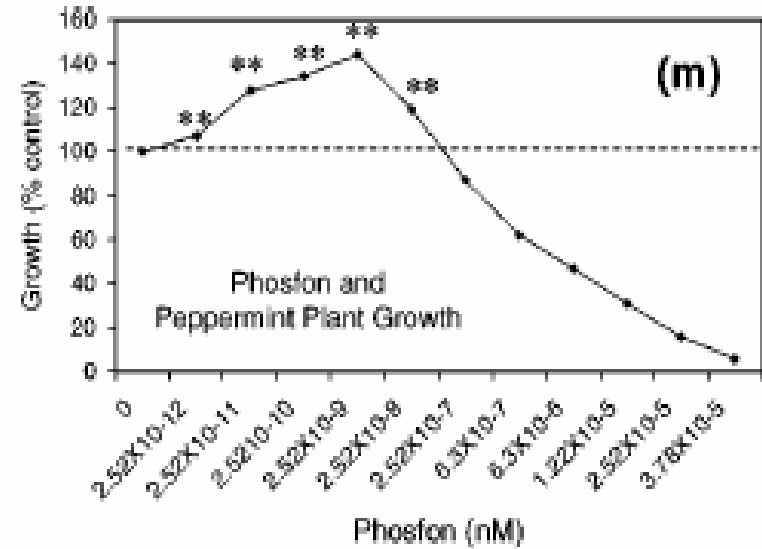
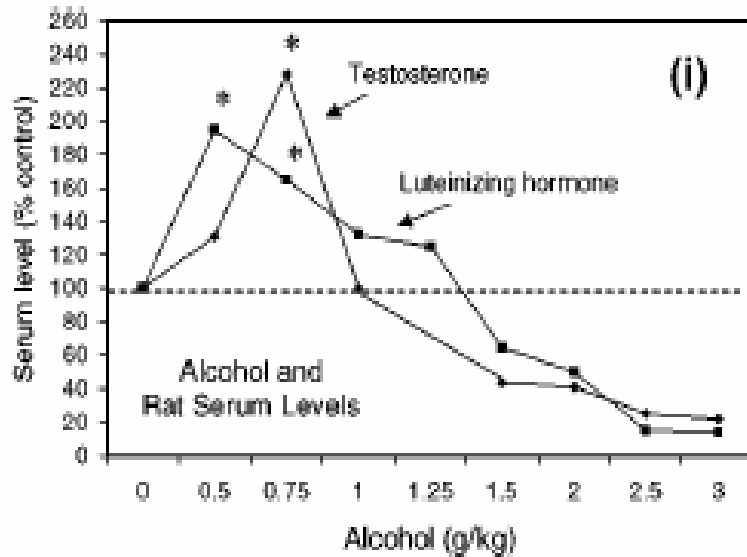


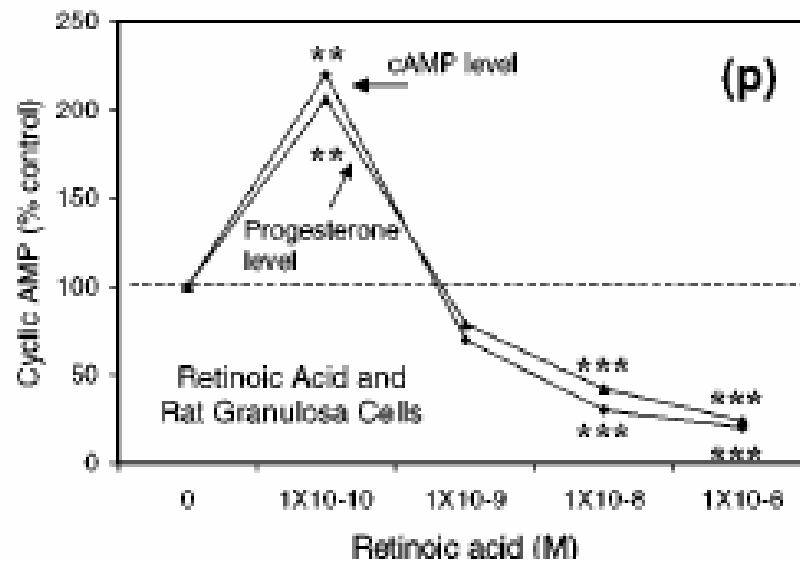
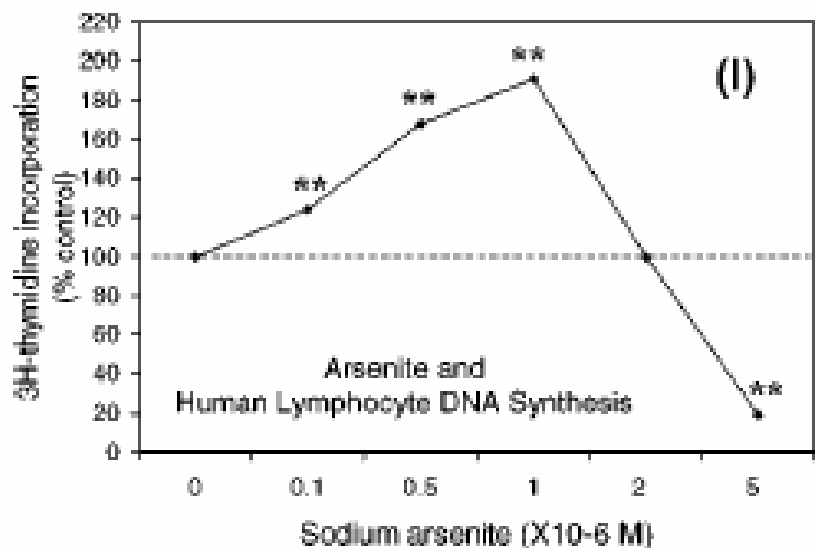
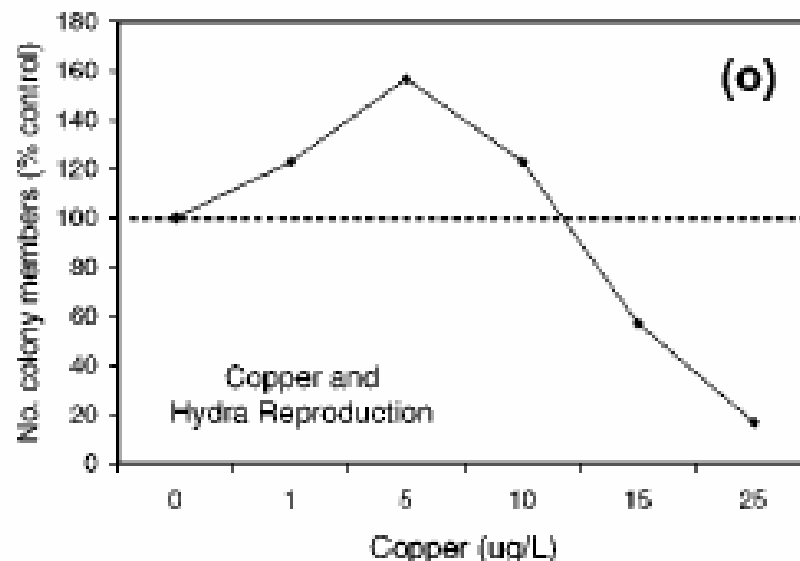
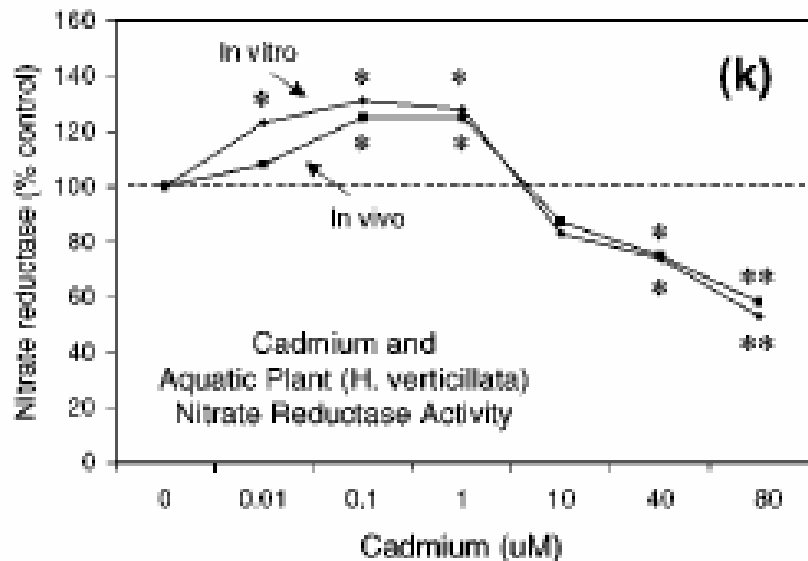
# Teoretická křivka hormeze II



# Teoretická křivka hormeze III









# Regulační souvislosti

- Obecně používán [prahový model](#) pro ne-[karcinogeny](#), a [lineární bezprahový model](#) pro karcinogeny (včetně radiace; EPA, FDA, a NRC).
- Přejít 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 se ukazuje, že mnoho toxikantů vykazuje prahové nebo hormezní působení v nízkých dávkách