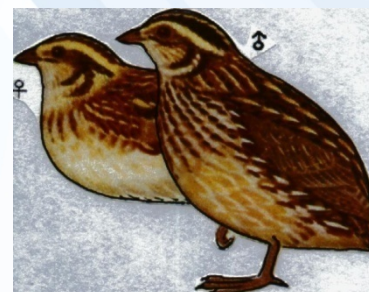




Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

# Ekotoxikologické biotesty s ptáky a savci

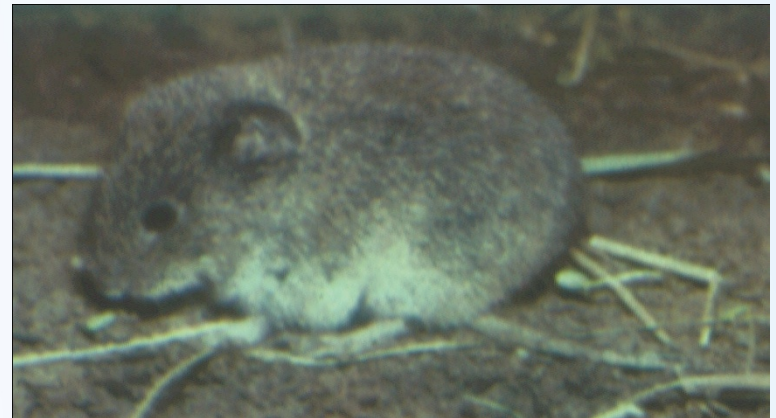


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

# Ptáci a savci

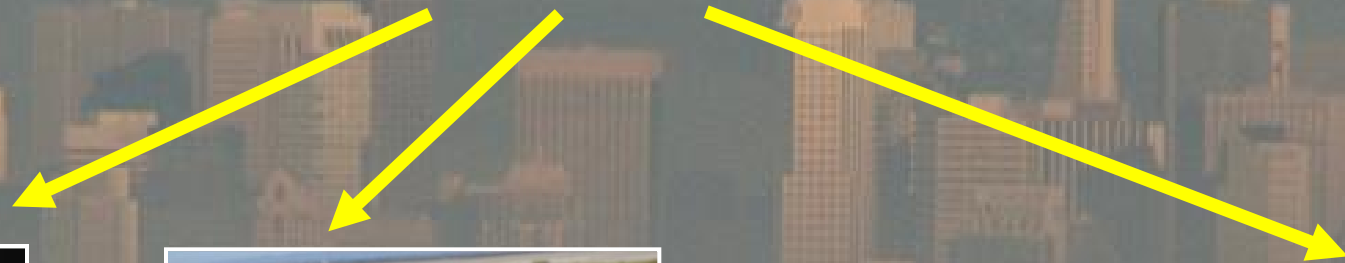
- Sekundární a terciární konzumenti
- Druhy z řádu dravců a sov, šelmy – konečný článek potravní pyramidy
- Delší doba života – potenciál bioakumulace
- ? zakoncentrování/  
metabolizace látek v potravních řetězcích



# Ptáci

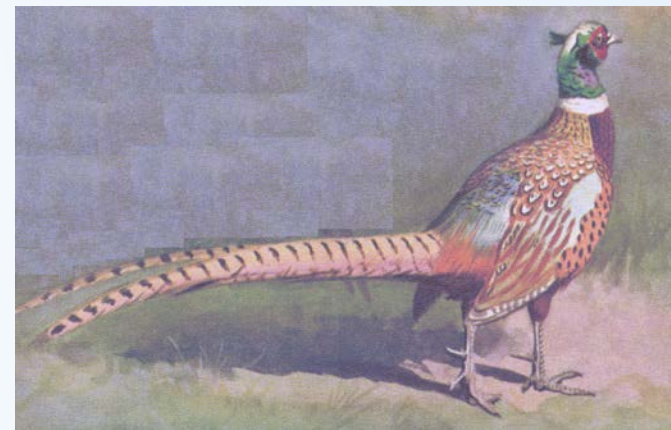
- terestrické i vodní prostředí

kontaminant



# Ptáci - skupina necílových organismů pro pesticidy

- Primární intoxikace
- Sekundární intoxikace
  
- Údaje o toxicitě látek pro ptáky jsou nenahraditelné
  - akutní toxicita
  - chronická toxicita



# Riziko pro poškození ptačích populací



# Divocí ptáci v prostředí

Druhy citlivé na pesticidy, těžké kovy, POPs, sinicové toxiny

Především rybožravé druhy – vrchol potravního řetězce

- Vliv na centrální nervový systém
  - Změny chování
  - Poruchy smyslů
- Endokrinní účinky
- Poruchy reprodukce
- Mortalita embryí
- Malformace embryí



**Snížení reprodukční kondice populací**

# Testy toxicity na volně žijících ptácích

**Cíl:** hodnocení vlivu antropogenních kontaminantů (pesticidy, odpady atd.)

**podpora registrace takových nových látek a přípravků, které:**

- mohou představovat chronickou expozici ptáků
- jsou persistentní
- se mohou kumulovat v rostlinách a zvířatech
- vykazaly vliv na reprodukci laboratorních savců.

## 2 základní typy studií:

**"screening field studies"** - +/- toxicita? Mortalita, pohybová aktivita

**„definitive field studies"** - ? rozsah poškození? Biodiverzita, abundance, biochemie krve, orgánů, hnízdní a pohybová aktivita, aktivita páření, počet vajec, síla skořápky, líhnivost



# Testy toxicity na ptácích

## OECD guidelines

### Section 2: Effects on Biotic Systems



- **OECD GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICALS**

**205, 1984: Avian dietary toxicity test**

**206, 1984: Avian reproduction test**

**223, 2010: Avian Acute Oral Toxicity Test**





# EPA Series 850

## Ecological Effects Test Guidelines

850.2100 Avian acute oral toxicity test

850.2200 Avian dietary toxicity test

850.2300 Avian reproduction test

850.2400 Wild mammal acute toxicity



# OECD 205 Avian dietary toxicity test



## Test akutní perorální toxicity u ptáků

**Testovací organismy:** křepelka japonská (*Coturnix coturnix japonica*),  
bažant obecný (*Phasianus colchicus*),  
(případně: koroptev, vrána, kavka, špaček, racek, vlaštovka, kos,  
drozd, pěnice, holub, káně, poštolka, volavka, kormorán).

## Design:

ptáci ze stejné populace, 10-17 dní staří, známý původ

Před testem min. 7 dní aklimatizace, na začátku zvažení jedinců,

(U volně žijících ptáků: večerní odlov, jedinec dostane při svítání jednorázově dávku v kapsuli).

Osvětlení 12 až 16 hodin denně

Expozice v potravě 5 dní (120 hodin), pak 3 dny krmná směs bez testované látky

Min. 5 koncentrací látky v krmivu (limitní test 5000 ppm) – příprava rovnoměrným rozmísením testované látky se základní krmnou směsí

Pokud dochází k úmrtí 7 a 8 den, prodloužení testu, až když 2 dny po sobě bez mortality, max. 21 dnů

10 jedinců na 1 klec



# Vážení křepelek

Hmotnost těla je zjišťována:

1. 0.den
2. 5.den
3. 8.den
4. na konci testu, je-li prodloužen



K-400-EC



# Akutní test toxicity u ptáků

## Během testování se sleduje:

Příznaky intoxikace a abnormality v chování

Mortalita

Hmotnost těla

v OECD 205: 0.- 5., 8. den a na konci testu, je-li prodloužen

Spotřeba krmiva

v OECD 205: 0.-5., 5.-8. den, 8.-poslední den testu, je-li prodloužen

## Vyhodnocení:

doba od aplikace k prvním příznakům toxicity

mortalita – LC50 (V OECD 205: 24hLC50, 48hLC50, 78hLC50, 96hLC50, 120hLC50)

doba potřebná pro detoxikaci a obnovení fyziologických funkcí

## Validita testu:

Mortalita kontrolních jedinců nepřekročila 10%

Koncentrace látky v krmivu neklesla pod 80%



# OECD 223 (2010): Avian Acute Oral Toxicity Test

Sekvenční testování – dle účelu:

- (1) test limitní dávky – pokud očekávaná nízká toxicita, dávka obvykle 2000 mg/kg, 5 či 10 ptáků – porovnání s kontrolou
- (2) LD50-slope test – pokud je třeba znát LD50 i sklon křivky a/nebo konfidenční interval, 3-4 stupně, 24-34 ptáků + kontrola
- (3) LD50 test – pouze LD50, 2 stupně, 14 ptáků + kontrola

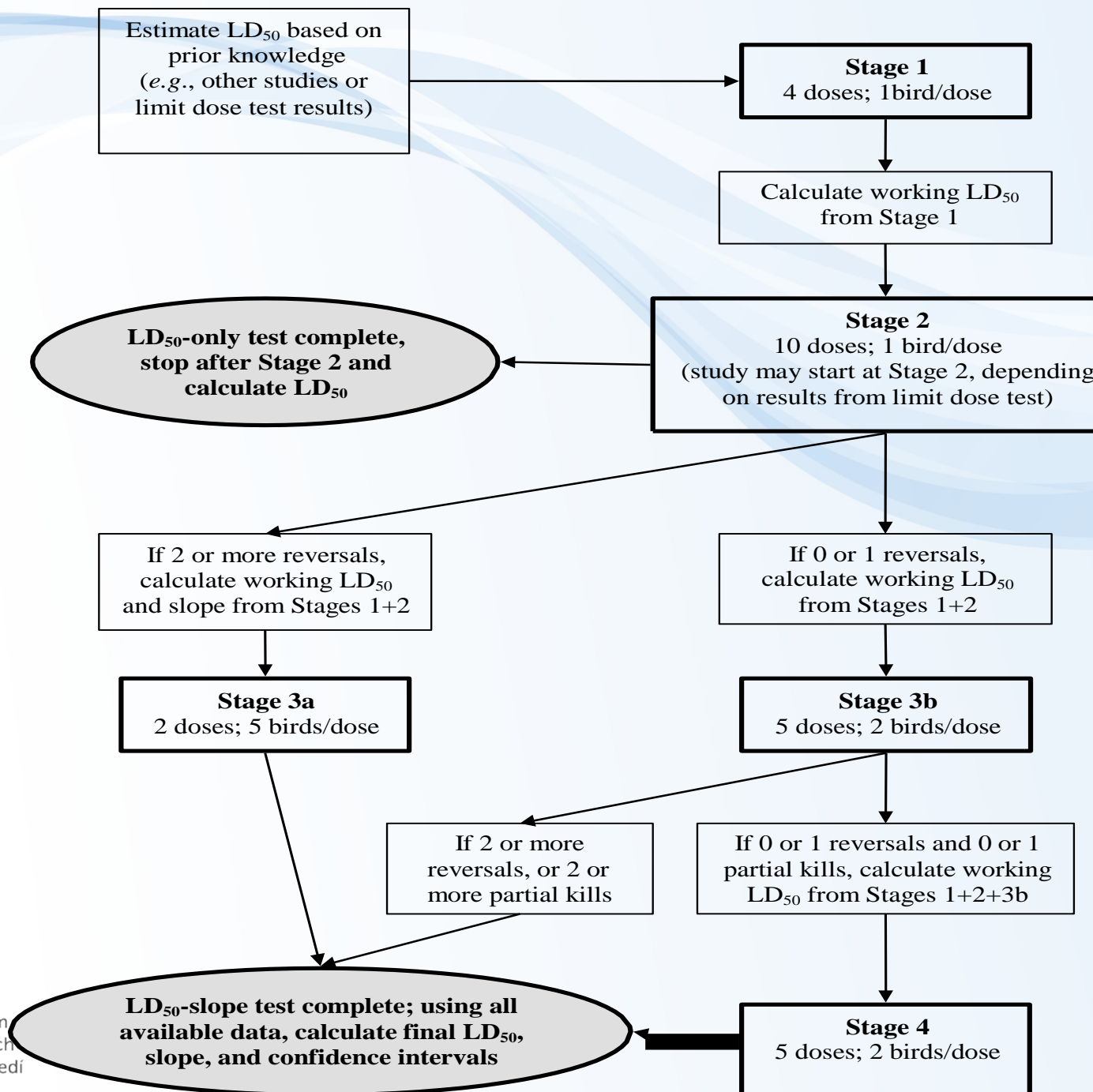
expozice gaváží - do volete nebo do žláznatého žaludku  
(proventriculus)

po dávkování ptáci pozorováni 14 dní



# Sekvenční testování

- (2)
- (3)



# EPA 850.2100: Avian Acute Oral Toxicity Test

min.14 dní aklimatizace, expozice kapsulí nebo gaváží

Mladí dospělci, min.16 týdnů

Min. 14 dní expozice

Není-li známo rozmezí koncentrací

– předběžný test – doporučeno 2, 20, 200, 2000 mg/kg b.w.  
(pokud očekávána nízká toxicita stačí limitní test 2000 mg/kg  
b.w. )

Definitivní test:

5 koncentrací, 10 jedinců na koncentraci – dávkování na  
tělesnou hmotnost



# Single-Dose Avian Embryotoxicity and Teratogenicity Test

**Cíl:** stanovení toxicity látky při přímé aplikaci na skořápku

**Organismus** - kachna divoká

**Princip** - přímá aplikace na skořápku (ropa, pesticidy, DDT, PCB)

**Vyhodnocení:**

- líhnivost
- nekrozy jater
- biochemické markery
- morfologické abnormality
- poruchy pohybu a metabolismu

Chick Embryotoxicity Screening Test (CHEST)– podobné, aplikace do vajíčka





# OECD 206 Avian reproduction test (US EPA Avian chronic toxicity test.)

**Cíl:** stanovení reprodukční toxicity látky podávané rodičovským jedincům. Testy zahrnují účinky na reprodukci, fertilitu a teratogenitu

podpora registrace takových nových látek a přípravků, které:

- mohou představovat chronickou expozici ptáků
- jsou persistentní
- se mohou kumulovat v rostlinách a zvířatech
- vykazaly vliv na reprodukci laboratorních savců.

**Testovací organismus :**

kachna divoká, koroptev polní, křepelka

14 dní adaptace



# Test reprodukční toxicity (OECD 206)

## Design:

- minimálně 3 koncentrace látky v potravě, dle předběžných laboratorních testů (ryba, krysa), nebo takové, které jdou 5x vyšší, než aktuální koncentrace dle analýz
- Nejlépe dle výsledků akutního perorálního testu toxicity (OECD 205) – nejvyšší koncentrace cca  $\frac{1}{2}$  LC10

Expozice připravena rovnoměrným rozmísením testované látky se základní krmnou směsí

Ptáci v klecích v párech

Na každou koncentraci aspoň 12 párů

- - expozice začíná 10 týdnů před hnízděním a pokračuje 1-3 měsíce ve snáškové sezóně, indukce snášky prodloužením fotoperiody
- - vejce jsou denně odebírány a uskladněny, kontrola prosvícením proti prasklinám
- každý týden či 14 dní dány na inkubaci v líhni
- V 6.-14. dni kontrola prosvícením
- Přemístění z inkubátoru do líhně (např. u křepelky 16.den)
- Vylíhlá mláďata se chovají 14 dní na adekvátní dietě



# Test reprodukční toxicity (OECD 206)

V průběhu testu se sleduje:

- ✓ mortalita dospělců
- ✓ příznaky intoxikace
- ✓ hmotnost těla dospělců
  - ✓ produkce vajec
  - ✓ výskyt křapek
  - ✓ tloušťka skořápky
  - ✓ oplozenost vajec
  - ✓ líhnivost kuřat
- ✓ hmotnost těla mláďat
- ✓ spotřeba potravy dospělci, mláďaty
- ✓ Makroskopické patologické vyšetření - dospělci

## Vyhodnocení:

- Mortalita, počet vajec, síla skořápky, % oplodněných
- líhnivost, % živých mláďat po 3 a 14 dnech
- malformace, deformace očí, mozku, nohou a křídel,
- biochemické markery (bilirubin, AP, AST, GST, DNA adukty..)





VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

# ŠKOLNÍ ZEMĚDĚLSKÝ PODNIK NOVÝ JIČÍN JINAČOVICE



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

# Aviární testy

## Testy jsou prováděny na základě:

- ✓ akreditačního osvědčení a schváleného Projektu pokusu podle § 12 vyhlášky č. 311/97 Sb., o chovu a využití pokusných zvířat
- ✓ pověření podle § 40 zákona 147/96 Sb. k ověřování vlastností přípravků na ochranu rostlin





# Pokusná Místnost

## Regulace teploty

- optimum dle druhu  
a stáří organismu

## Vlhkosti (50-75%)

## Světelného režimu (12-16 hod světla)

## Dobrá ventilace

### •Plastové skruže

průměr spodní 90 cm

průměr horní 100 cm

výška 40 cm

### •Výhřevné zařízení

klobouková kvočna

závěsná BIOS







Test atraktivnosti různých rodenticidů pro ptáky (BBA – metodika)  
(Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft (BBA) in  
Braunschweig, Germany)

- zjistit, zda je testovaná látka přijímána v množství, které způsobuje příznaky otravy nebo mortalitu
  - prognoza rizika akutních otrav ptáků v reálných podmínkách
  - venkovní voliery
  - bažanti, křepelky, holub domácí
  - adaptace 1 týden
  - 16 hod. hladovění, 8 hodin expozice – 3x po sobě
- Pak 14 dní pozorovací doba









# Pozorování



- 1. hod expoziční fáze se ptáci pozorují trvale
- Následujících 7 hod. 1x za hod.
- Cyklus se opakuje 3 dny po sobě
- Na poslední expoziční fázi navazuje 14 denní pozorování



# Vyhodnocení testů

- **Test akutní perorální toxicity (OECD 205)**  
probitová analýza (graficky n. PC)  
LC50
- **Test na atraktivitu (BBA-metodika)**  
pokusná zvířata (druh, původ, věk)  
popis voliér a podmínky testu vč. údajů o počasí  
poznatky z pozorování - jak byla přijímána testovaná  
substance  
změny v chování, příznaky otravy  
tělesná hmotnost testovacích jedinců  
mortalita a makroskopický patologický nále



# Testování toxicity na savcích

Celá řada normovaných testů na laboratorních savcích

Využití: medicína, farmacie, chemický výzkum, humánní toxikologie....

- ČSN ISO
- EC directive
- EPA
- OECD

In vivo, in vitro testy, specifické účinky – neurotoxicita, teratogenita, genotoxicita, karcinogenita

Akutní, subakutní, chronická toxicita



# Typy expozice

Orální - podání ústy (orálně, per os, p.o.)

Dermální - aplikace na kůži

Inhalační - podání vdechováním

Injekční podání – do svalu (intramuscular i.m.)

- do břišní dutiny (intraperitoneální i.p.)

- do pohrudniční dutiny (intrapleurální i.p.l.).

- nitrožilní aplikace - injekce do žíly  
(intravenozní i.v.)

- podkožní injekce (subkutánní s.c.)

- dle toho se stanovuje orální, dermální, inhalační... toxicita
- u výsledků testů toxicity nutné vždy uvádět expoziční cestu

Expoziční dávka se zpravidla uvádí v přepočtu na kg hmotnosti organismu, případně na kg potravy





# Vyhodnocované parametry

Široké spektrum – nejčastější :

- mortalita, biochemické parametry krve, tělesná hmotnost
- reprodukce, počet a přežití mladých
- hmotnost orgánů
- histopatologické hodnocení
- spermatogram, reprodukční schopnost a aktivita
- sterilita
- mutace, mikrojádra, nádory,



# VYHLÁŠKA 443 / 2004,

## kteřou se stanoví základní metody pro zkoušení toxicity chemických látek a chemických přípravků

- B.1 bis Akutní toxicita orální (per os) - metoda fixní dávky
- B.1 tris Akutní toxicita orální (per os) - metoda stanovení třídy akutní toxicity
- B.2 Akutní toxicita inhalační
- B.3 Akutní toxicita dermální
- B.4 Kožní dráždivost
- B.5 Oční dráždivost
- B.6 Senzibilizace kůže
- B.7 Subakutní toxicita orální (per os) (28 denní opakovaná aplikace)
- B.8 Subakutní toxicita inhalační (28 denní opakovaná aplikace)
- B.9 Subakutní toxicita dermální (28 denní opakovaná aplikace)
- B.10 Mutagenita - test chromozómových aberací u savčích buněk in vitro
- B.11 Mutagenita - test chromozómových aberací v kostní dřeni savců in vivo
- B.12 Mutagenita - in vivo mikronukleus test v savčích erythrocytech
- B.17 Mutagenita - test genových mutací v savčích buňkách in vitro
- B.18 Poškození DNA reparace - neplánovaná syntéza DNA - savčí buňka in vitro
- B.19 SCE - výměna sesterských chromatid in vitro
- B.21 Test transformace savčích buněk in vitro
- B.22 Dominantní letální test u hlodavců
- B.23 Analýza chromozómových aberací u savčích spermatogonií
- B.24 Spot test u myší
- B.25 Přenosné translokace u myší
- B.26 Test subchronické orální toxicity (90 denní studie orální toxicity s opakovanou aplikací hlodavcům)
- B.27 Test subchronické orální toxicity (90 denní studie orální toxicity s opakovanou aplikací hlodavcům)
- B.28 Subchronická toxicita dermální (90 denní opakovaná aplikace, studie na hlodavcích)
- B.29 Subchronická toxicita inhalační (90 denní opakovaná aplikace, studie na hlodavcích)
- B.30 Testování chronické toxicity
- B.31 Studie teratogenity
- B.32 Test karcinogenity



# EC directives (směrnice) - Methods for the Determination of Toxicity

- 92/69/EEC B.1 Acute Toxicity (Oral)
- 92/69/EEC B.1bis Acute Toxicity (Oral) Fixed Dose Method
- 96/54/EC B.1tris Acute Toxicity (Oral) – Acute Toxic Class Method
- 92/69/EEC, 93/21/EEC B.2 Acute Toxicity (Inhalation)
- 92/69/EEC B.3 Acute Toxicity (Dermal)
- 92/69/EEC B.4 Acute Toxicity (Skin Irritation)
- 92/69/EEC B.5 Acute Toxicity (Eye Irritation)
- 96/54/EC B.6 Skin Sensitisation
- 96/54/EC B.7 Repeated Dose (28 Days) Toxicity (Oral)
- 92/69/EEC B.8 Repeated Dose (28 Days) Toxicity (Inhalation)
- 92/69/EEC B.9 Repeated Dose (28 Days) Toxicity (Dermal)
- 2000/32/EC B.10 Mutagenicity - *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test
- 2000/32/EC B.11 Mutagenicity - *In vivo* Mammalian Bone-Marrow Chromosome Aberration Test
- 2000/32/EC B.12 Mutagenicity Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test
- 2000/32/EC B.13/14 Mutagenicity – Reverse Mutation Test using Bacteria
- 88/302/EEC B.15 Gene Mutation – *Saccharomyces cerevisiae*
- 88/302/EEC B.16 Mitotic Recombination - *Saccharomyces cerevisiae*
- 2000/32/EC B.17 Mutagenicity - *In vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test
- 88/302/EEC B.18 DNA Damage and Repair – Unscheduled DNA Synthesis – Mammalian Cells *in vitro*
- 88/302/EEC B.19 Sister Chromatid Exchange Assay *in vitro*
- 88/302/EEC B.20 Sex-Linked Recessive Lethal Test in *Drosophila melanogaster*
- 88/302/EEC B.21 *In vitro* Mammalian Cell Transformation Test
- 88/302/EEC B.22 Rodent Dominant Lethal Test
- 2000/32/EC B.23 Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test
- 88/302/EEC B.24 Mouse Spot Test
- 88/302/EEC B.25 Mouse Heritable Translocation
- 88/302/EEC B.26 Sub-Chronic Oral Toxicity Test: Repeated Dose 90-Day Toxicity Study in Rodents
- 88/302/EEC B.27 Sub-Chronic Oral Toxicity Test: Repeated Dose 90-Day Toxicity Study in Non-Rodents
- 88/302/EEC B.28 Sub-Chronic Dermal Toxicity Test: 90-Day Repeated Dermal Dose Study using Rodent Species
- 88/302/EEC B.29 Sub-Chronic Inhalation Toxicity Test: 90-Day Repeated Inhalation Dose Study using Rodent Species
- 88/302/EEC B.30 Chronic Toxicity Test
- 88/302/EEC B.31 Teratogenicity Test – Rodent And Non-Rodent
- 88/302/EEC B.32 Carcinogenicity Test
- 88/302/EEC B.33 Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Test
- 88/302/EEC B.34 One-Generation Reproduction Toxicity Test
- 88/302/EEC B.35 Two-Generation Reproduction Toxicity Test
- 88/302/EEC B.36 Toxicokinetics
- 2000/32/EC B.39 Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In vivo*
- 2000/33/EC B.40 Skin Corrosion EC Directive 2000/33/EC
- B.41 Phototoxicity - *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test

# EPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OPPTS) - guidelines organizovány do 10 serií:

## 850 - Ecological Effects Test Guidelines

## 870 - Health Effects Test Guidelines

870.1000 Acute toxicity testing--background

870.1100 Acute oral toxicity

870.1200 Acute dermal toxicity

870.1300 Acute inhalation toxicity

870.2400 Acute eye irritation

870.2500 Acute dermal irritation

870.2600 Skin sensitization

870.3050 Repeated dose 28-day oral toxicity study  
in rodents

870.3100 90-Day oral toxicity in rodents

870.3150 90-Day oral toxicity in nonrodents

870.3200 21/28-Day dermal toxicity

870.3250 90-Day dermal toxicity

870.3465 90-Day inhalation toxicity

870.3550 Reproduction/developmental toxicity  
screening test

870.3650 Combined repeated dose toxicity study  
with the reproduction/developmental toxicity  
screening test

870.3700 Prenatal developmental toxicity study

870.3800 Reproduction and fertility effects

870.4100 Chronic toxicity

870.4200 Carcinogenicity

870.4300 Combined chronic toxicity/carcinogenicity

870.5195 Mouse biochemical specific locus test

870.5200 Mouse visible specific locus test

870.5300 In vitro mammalian cell gene mutation test

870.5375 In vitro mammalian chromosome aberration test

870.5380 Mammalian spermatogonial chromosomal aberration  
test

870.5385 Mammalian bone marrow chromosomal aberration test

870.5395 Mammalian erythrocyte micronucleus test

870.5450 Rodent dominant lethal assay

870.5460 Rodent heritable translocation assays

870.5550 Unscheduled DNA synthesis in mammalian cells in  
culture

870.5575 Mitotic gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae*

870.5900 In vitro sister chromatid exchange assay

870.5915 In vivo sister chromatid exchange assay

870.6100 Acute and 28-day delayed neurotoxicity of  
organophosphorus substances

870.6200 Neurotoxicity screening battery

870.6300 Developmental neurotoxicity study

870.6500 Schedule-controlled operant behavior

870.6850 Peripheral nerve function

870.6855 Neurophysiology Sensory evoked potentials 870.7200  
Companion animal safety

870.7485 Metabolism and pharmacokinetics

870.7600 Dermal penetration

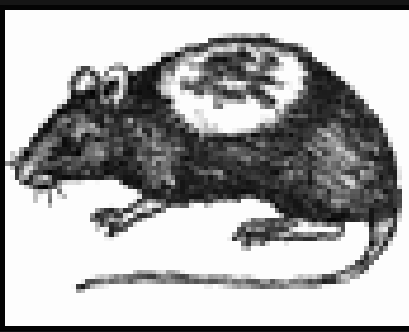
870.7800 Immunotoxicity

870.8355 Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity

# OECD guidelines

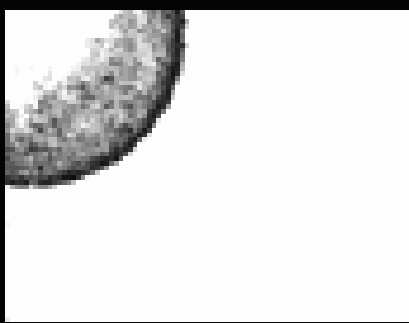
## - Section 4: Health Effects

- 402 Acute Dermal Toxicity
- 403 Acute Inhalation Toxicity
- 404 Acute Dermal Irritation/Corrosion
- 405 Acute Eye Irritation/Corrosion
- 406 Skin Sensitisation
- 407 Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents
- 408 Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents
- 409 Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Non-Rodents
- 410 Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-day Study
- 411 Subchronic Dermal Toxicity: 90-day Study
- 412 Repeated Dose Inhalation Toxicity: 28-day or 14-day Study
- 413 Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study
- 414 Prenatal Developmental Toxicity Study
- 415 One-Generation Reproduction Toxicity Study
- 416 Two-Generation Reproduction Toxicity Study
- 417 Toxicokinetics
- 418 Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances Following Acute Exposure
- 419 Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances: 28-day Repeated Dose Study
- 420 Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Method
- 421 Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test
- 422 Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity
- 423 Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method
- 424 Neurotoxicity Study in Rodents
- 425 Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure
- 426 Developmental Neurotoxicity Study
- 427 Skin Absorption: In Vivo Method
- 428 Skin Absorption: In Vitro Method
- 429 Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay
- 430 In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)
- 431 In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test
- 432 In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test
- 435 In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion
- 440 Uterotrophic Bioassay in Rodents: a short-term screening test for oestrogenic properties
- 451 Carcinogenicity Studies (Original Guideline,
- 452 Chronic Toxicity Studies (Original Guideline, 453 Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies
- 471 Bacterial Reverse Mutation Test (Updated Guideline, adopted
- 473 In vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test (Updated Guideline,
- 474 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test
- 475 Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test
- 476 In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test
- 478 Genetic Toxicology: Rodent Dominant Lethal Test
- 479 Genetic Toxicology: In vitro Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells
- 480 Genetic Toxicology: *Saccharomyces cerevisiae*, Gene Mutation Assay
- 482 Genetic Toxicology: DNA Damage and Repair, Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells in vitro
- 483 Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test
- 484 Genetic Toxicology: Mouse Spot Test
- 485 Genetic Toxicology: Mouse Heritable Translocation Assay
- 486 Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells in vivo



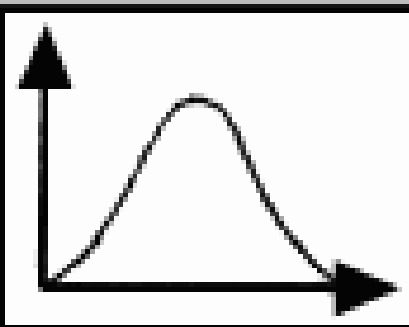
### Test hypersenzibilace

pro zjištění schopnosti dané látky vyvolávat vyrážky a další alergické reakce



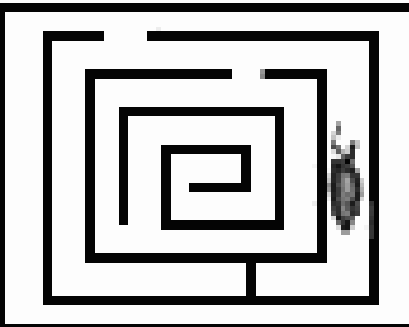
### Test fototoxicity

pro zjištění zda vystavení dané látky slunečnímu záření vede ke zvýšení její toxicity



### Toxikokinetické studie

sledování absorpce, distribuce, biotransformace, depozice a exkrece dané látky



### Behaviorální testy

sledování vlivu chemikálií na kognitivní funkce (učení) organismu během vývoje a v dospělosti

# Testy toxicity na volně žijících savcích (EPA 850.2400 Wild mammal acute toxicity)

**Cíl:** ověřit v přírodních podmínkách výsledky laboratorních testů na hlodavcích

V případě látek, které jsou přímo vnášeny do přirozeného prostředí druhu

**Testovací organismy:** volně žijící hlodavci - myš, hraboš, zajíc, králík, dále fretka, liška, lovná zvěř, (US - norek, skunk, bobr) – vybrat dle relevantnosti pro danou látku a prostředí aplikace

**Design:** 28 dnů expozice v klecích, přírodní podmínky, dávkování do vody a potravy

**Vyhodnocení:** mortalita, ovogeneze, spermatogram, reprodukční aktivita, vývoj embryí, biochemie krve a orgánů (slezina, játra).

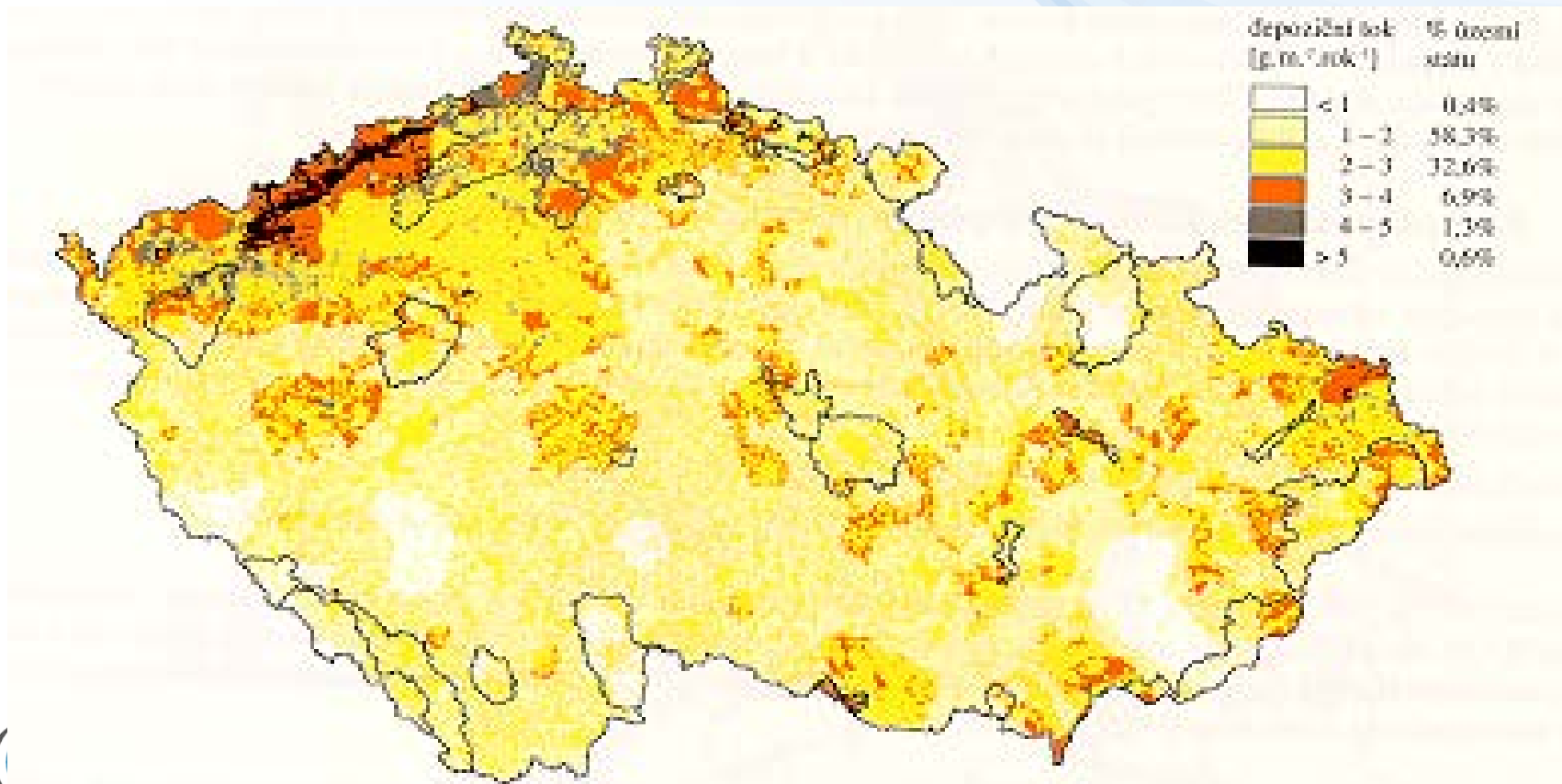


# Volně žijící savci jako model v biomonitoringu

Studovaná oblast - severozápadní Čechy

30°42' N 13°36'

Krušné hory, Mostecká pánev





# Metody

## testy mutagenních vlivů vnějšího prostředí

aberrace chromosomů v somatických a pohlavních buňkách

výskyt mikrojader v somatických buňkách  
(mikronucleus test)  
abnormality spermií

## rezidua těžkých kovů

## základní údaje z populační ekologie



# Modely

rejsek malý (*Sorex minutus*)

rejsek obecný (*Sorex araneus*)

hraboš polní (*Microtus arvalis*)

norník rudý (*Clethrionomys glareolus*)

myšice lesní (*Apodemus flavicollis*)

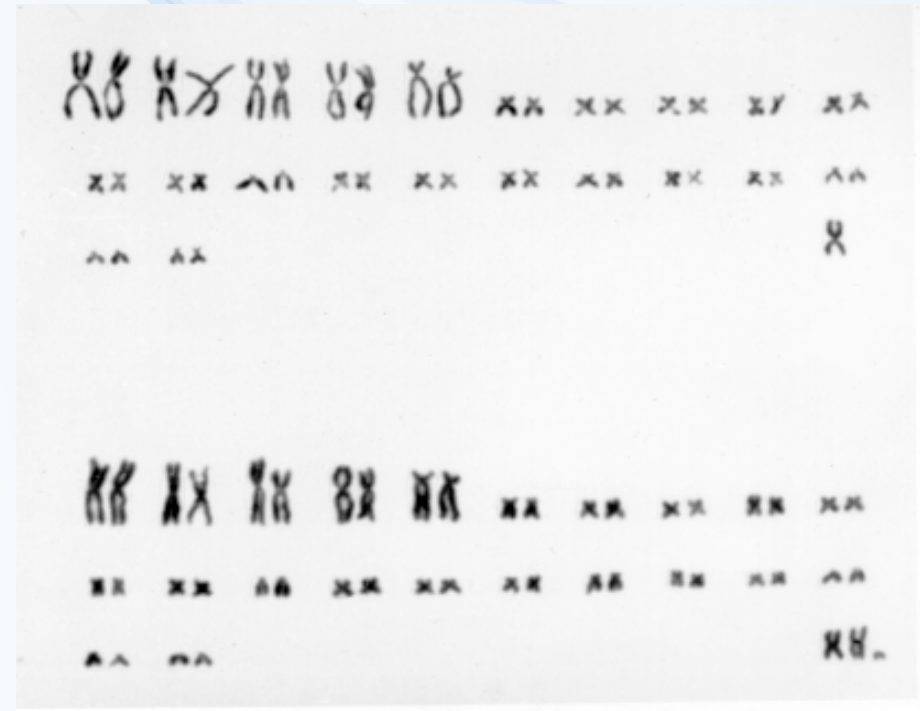


# Numerické anomálie pohlavních chromosomů hraboš polní Česká republika

2N=46, XY



2N=45, XO



2N=47, XXY

**Zima J et al., *Hereditas* 117: 203-207 (1999)**



Výskyt abnormálních spermií  
**myšice lesní a norník rudý**  
 Krušné hory vs. Labské pískovce  
 průměrné frekvence abnormálních spermií na 1500 buněk

DRUH		N (jedinci)	průměr	SD
<i>Apodemus flavicollis</i>	vzorek	28	<b>14,00 *</b>	4,56
	kontrola	27	8,45 *	8,37
<i>Clethrionomy s glareolus</i>	vzorek	30	5,75	5,28
	kontrola	32	5,18	3,86

**Ieradi LA et al., *Folia Zool.* 52: 57-66 (2003)**



# Rezidua těžkých kovů

rejsek malý - *Sorex minutus* – játra [ppm, dry weight]

	<i>průměr</i>	<i>SD</i>	<i>min</i>	<i>max</i>
vzorek				
<b><i>Cd</i></b>	<b>3,3</b>	<b>3,7</b>	<b>0</b>	<b>9.7</b>
<b><i>Pb</i></b>	<b>836,2</b>	<b>415,9</b>	<b>282,0</b>	<b>1614.4</b>
kontrola				
<b><i>Cd</i></b>	<b>4,7</b>	<b>4,7</b>	<b>0</b>	<b>34,9</b>
<b><i>Pb</i></b>	<b>29,5</b>	<b>13,2</b>	<b>11,9</b>	<b>63,4</b>

**Tomášková L et al., *Carnegie Museum Special Publications***



# Rezidua těžkých kovů

rejsek obecný - *Sorex araneus* - ledviny [ppm, dry weight]

	<i>průměr</i>	<i>SD</i>	<i>min</i>	<i>max</i>
vzorek				
<b><i>Cd</i></b>	<b>23,3</b>	43,1	0	149,9
<b><i>Pb</i></b>	<b>321,4</b>	295,7	0	1187,7
kontrola				
<b><i>Cd</i></b>	5,4	9,0	0	38,5
<b><i>Pb</i></b>	193,2	299,0	0	779,8

**Tomášková L et al., *Carnegie Museum Special Publications***



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

# Populační ekologie

- **žádný detekovatelný vliv na**
  - poměr pohlaví
  - populační strukturu
  - reprodukci
  - denzitu a produktivitu
- **sestupný trend abundance**
  - snižování kvality stanoviště  
v důsledku znečištění
  - sukcese rostlinných společenstev



# Závěry

úroveň kontaminace těžkými kovy indikuje  
vážné poškození zdravotního stavu

základní demografické parametry populace  
nevykazují známky narušení

vlivy znečištění a narušování stanovišť se  
projevují na úrovni jedince, ale nejsou  
zřetelné na úrovni populace





## Další zdroje informací z monitoringu/bioindikací

- analýzy kostí a tuku dlouho žijících zvířat (více než 4 roky - jelen, prase divoké, spárkatá zvěř, vrány, kavky hnízdící na urč. teritoriu)
- koloniálně hnízdící ptáci - rackové, kormoráni a populace – analýza vajec
- vnitřnosti lovné zvěře (monitoring)
- odlov hrabošů z přírody - struktura populací, vývoj mláďat – mortalita, teratogenita
- bioakumulace PAU, PCB, DDT, TK....
- biochemie+ genetika krve



# 3 R PRINCIPLE

1959: Russel & Burch: “**3Rs principle**”

**Replacement** - nahrazení *in vivo* experimentů alternativami

**Reduction** - snížení počtu zvířat pro zjištění požadovaných informací

**Refinement** - snížení bolesti a utrpení

## Ochrana zvířat a etika práce s laboratorními zvířaty

- **Zákon č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání**

§ 3 pro účely zákona se rozumí zvířetem každý živý obratlovec, kromě člověka, nikoliv však plod nebo embryo

- **Vyhláška č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat, ve znění pozdějších předpisů**

státní orgány ochrany zvířat v České republice:

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

- Ústřední komise pro ochranu zvířat (ÚKOZ)

orgány veterinární správy





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem  
České republiky



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí