



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Stanovení ekotoxicity

Luděk Bláha, PŘF MU

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Cíl přednášky – co by si měl student odnést

- Chápat princip testování ekotoxicity s využitím „biologických modelů“
- Znat různé typy (křivky) vztahů mezi dávkou a toxickou odpovědí
- Dokázat zakreslit, využít a interpretovat jednoduchou křivku „dávka-odpověď“
 - Znat základní odvozené parametry
 - Znat princip probitové metody
- Umět vysvětlit rozdíly a principy „prahového“ a „bezprahového“ působení
- Znat příčiny a příklady „nemonotonního“ působení toxických látek
- Chápat vztah toxicity a doby expozice a principy kritických reziduí
- Dokázat vysvětlit pojmy aditivita – antagonismus – synergismus v ekotoxikologii a uvést příklady
- Umět odhadnout toxicitu směsi látek za předpokladu aditivního působení



Hodnocení efektů v ekotoxikologii

Cílem ekotoxikologických analýz je poznání efektů, které působí přítomnost stresorů na organismy v prostředí

- suborganismální úroveň

- jednotlivé organismy

- populační efekty

- efekty ve společenstvech

- ekosystémové efekty

laboratoř

laboratoř

laboratoř
mikro/mezokosmy

mikro/mezokosmy
polní studie
terénní pozorování

terénní pozorování

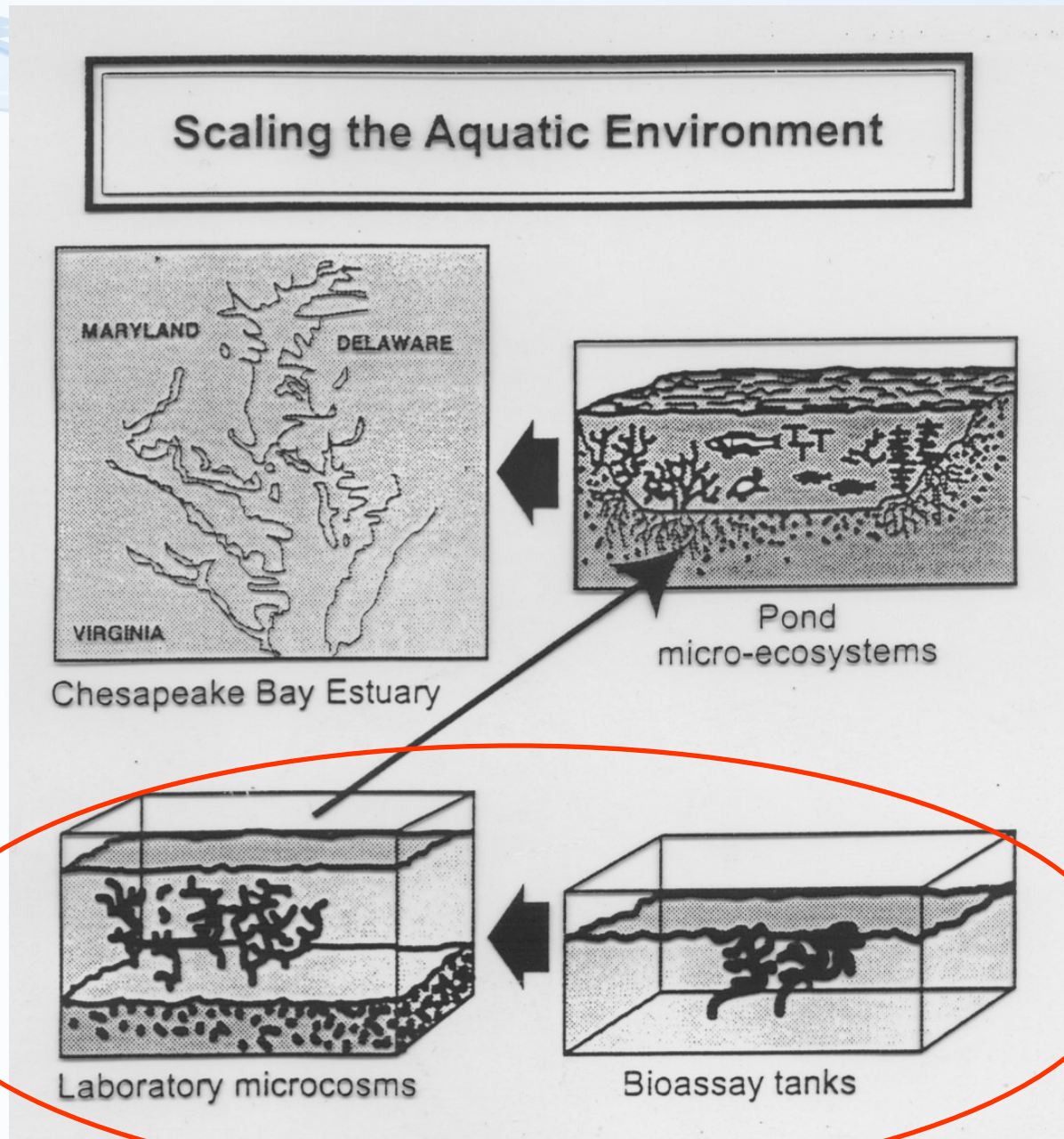


Testování ekotoxicity v realitě

= Účinky na vybraných modelových organismech (systémech)

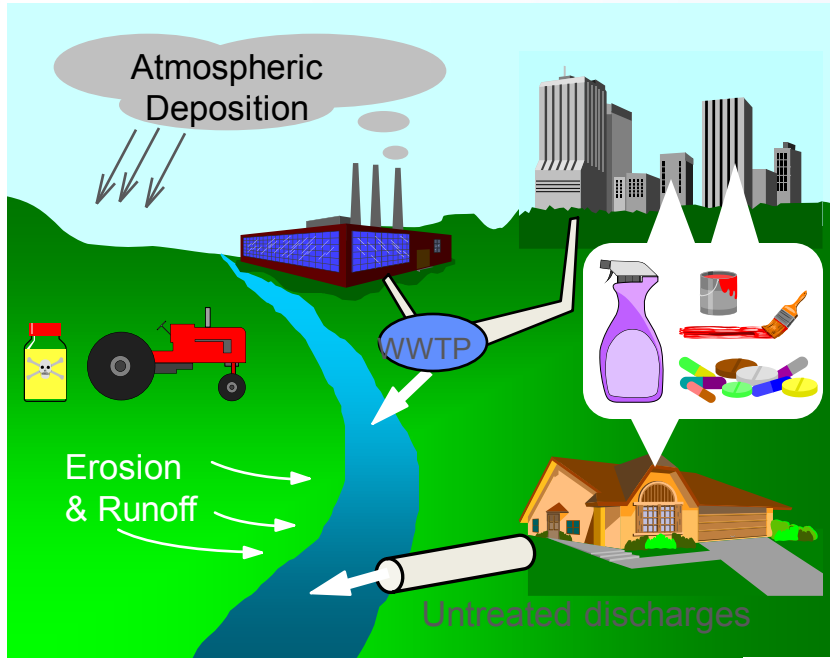
→ predikce / extrapolace pro celý ekosystém

laboratoř



Hlavním požadavkem ekotoxikologické studie je
průkaz KAUZALITY mezi expozicí (látkou) a efektem
(= nejčastěji průkaz „jak se toxicita mění s dávkou“ – dávka/odpověď)

Expozice
(dávka)



Efekt


(Jaká expozice vyvolá efekt ?)



METODY HODNOCENÍ EFEKTŮ

Praktické metody stanovení ekotoxicity

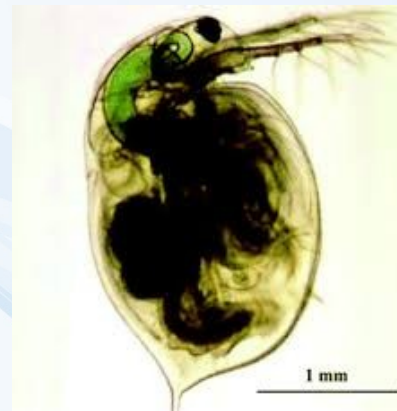
- laboratorní biotesty in vitro
- laboratorní biotesty in vivo - jednodruhové
- laboratorní mikrokosmy
- manipulované a kontrolované mezokosmy
- polní studie
- reálné ekosystémy



Roste obtížnost průkazu
KAUZALITY



Stanovení ekotoxicity REALIZACE BIOTESTU (přípravné cvičení)



Úvod:

Do rybníka, ve kterém kapři onemocněli plísní, se má jako léčivo přidávat malachitová zeleň MZ. **Je třeba zjistit, zda účinná koncentrace MZ (1mg/L) nepoškodí po aplikaci populace zooplanktonu v rybníku.** *To by následně celkovou stabilitu ekosystému a také ekonomický přínos (chybějící zdroj potravy pro ryby, snížené přírůstky ryb atd).*

Zadání

Pro zjištění potenciálních negativních účinků MZ využijete biotest s *Daphnia magna* (48 hod expozice). Diskutujte, jak konkrétně byste realizovali experimenty, které odpoví na tyto otázky:

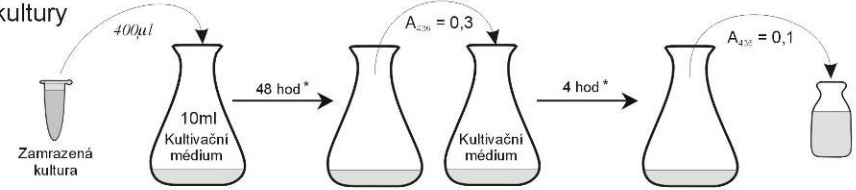
- 1) Je koncentrace 1 mg/L bezpečná?
- 2) Jaká maximální koncentrace nebude u *D. magna* způsobovat letalitu?
- 3) Jaká koncentrace způsobí po 2 dnech uhynutí 50% jedinců *D. magna*?



Schema inhibičního testu na *Pseudomonas putida*

- 1) Příprava organismu

A. Příprava kultury



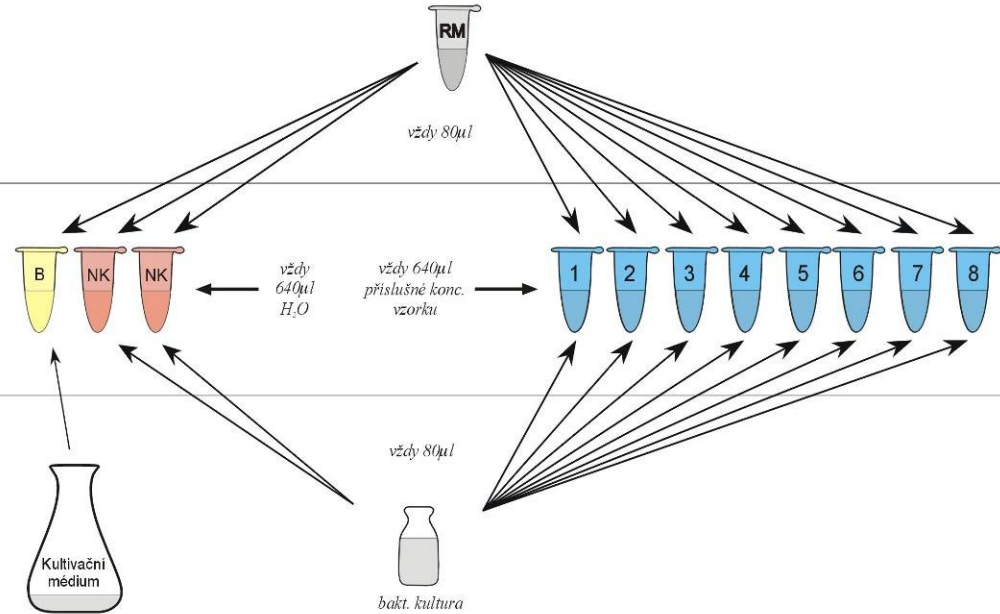
- 2) Příprava vzorku

B. Příprava ředících řad

Krok 2

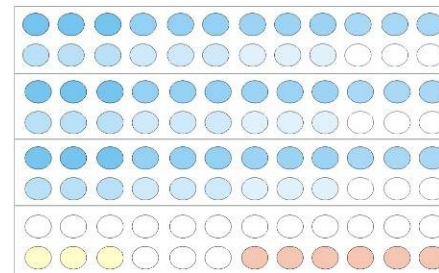
Krok 1

Krok 3



- 3) Expozice

C. Testování



Dávkování 200µl do každé jamky
(3 opakování)

Inkubace 16 hod*

Měření absorbance při 436 nm

- 4) Vyhodnocení

Kroky realizace biotestu (stručně)

- **1) Příprava organismu**
 - kultivační médium, standardní počty, stáří ...
- **2) Příprava vzorku**
 - ředění vzorku (*mimo nádoby s organismy*) – koncentrační řada ředící medium :
 - voda/medium – lze přímo přidávat k organismům
 - organické rozpouštědlo – přísady jen malých koncentrací (0.5%)
 - negativní kontrola – ředící medium
- **3) Expozice**
 - přísady vzorku (kontrolního roztoku) k organismu, expozice (24, 96 h)
- **4) Vyhodnocení**
 - stanovení letality / růstu, srovnání vzorek – kontrola, odvození křivky dávka odpověď, statistické srovnání

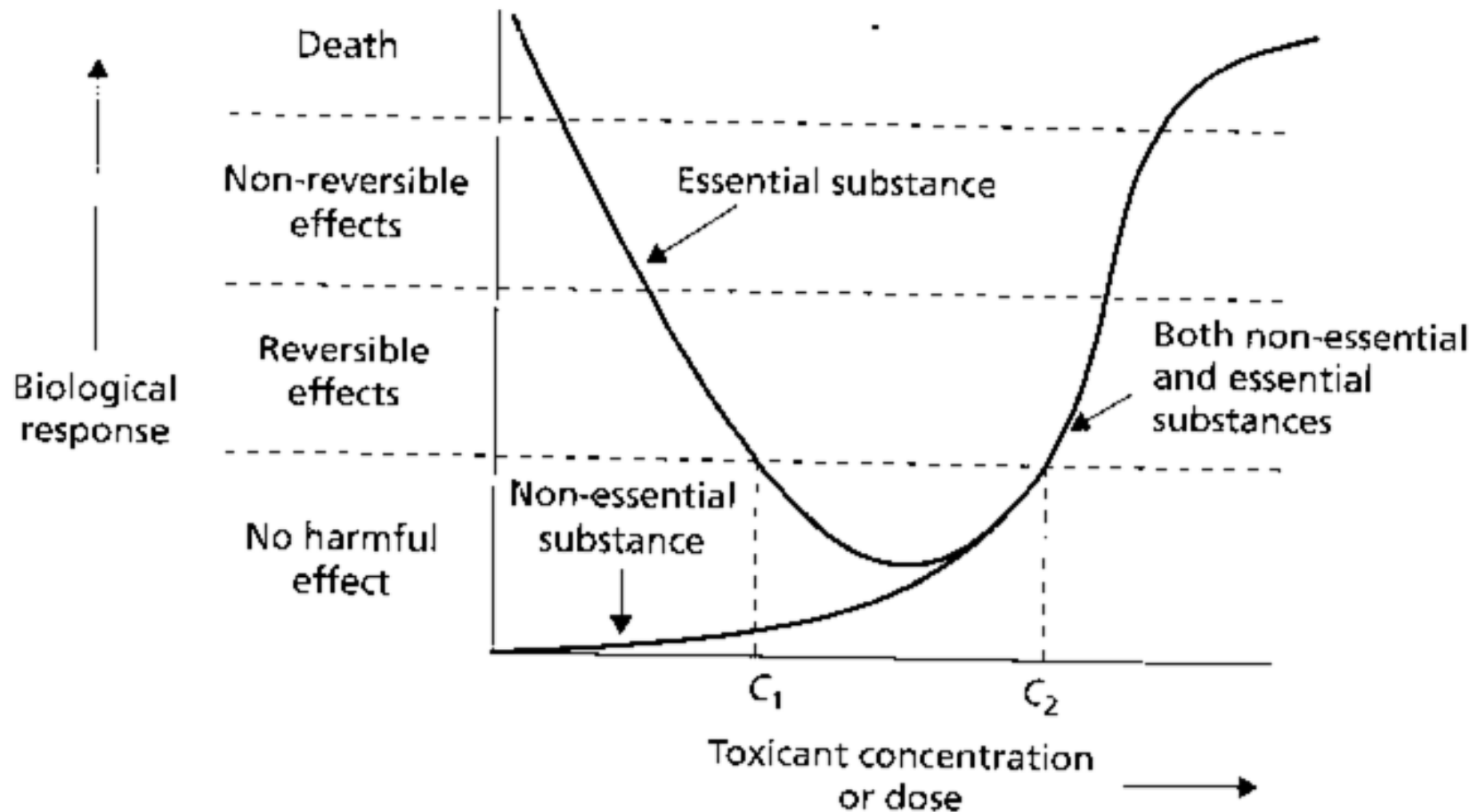


Dávka/Koncentrace - Efekt/Odpověď

Dose/Concentration Response Relationships



Biologické účinky v závislosti na koncentraci látek



Vztahy Dávka - Odpověď

Toxikant působí škodlivý efekt v biologickém systému

- po vstupu do prostředí dosahuje látka určitých koncentrací v prostředí
- toxický efekt je vyvolán **dávkou v těle** (působení koncentrace látky v těle po definovanou dobu – viz toxikodynamika)

Toxikologie – práce s dávkami v těle

mg/kg hmotnosti (mg/kg b.w. - *body weight*), mg/kg b.w./day

Ekotoxikologie –spíše práce s koncentracemi v prostředí
v prostředí měříme koncentrace ne dávky

Vztahy Dávka - Odpověď

Toxikant působí škodlivý efekt v biologickém systému

Příklady efektů?

změna zdravotního stavu
pokles příjmu potravy
snížení reprodukční schopnosti
mortalita

Jak změříme „změnu zdravotního stavu“ ?



Vztahy Dávka - Odpověď

Toxikant působí škodlivý efekt v biologickém systému

Příklady efektů?

změna zdravotního stavu
pokles příjmu potravy
snížení reprodukční schopnosti
mortalita

V experimentu se hodnotí

POZOROVATELNÝ (měřitelný) PARAMETR = ENDPOINT

charakterizuje účinek a má k účinku jasný vztah

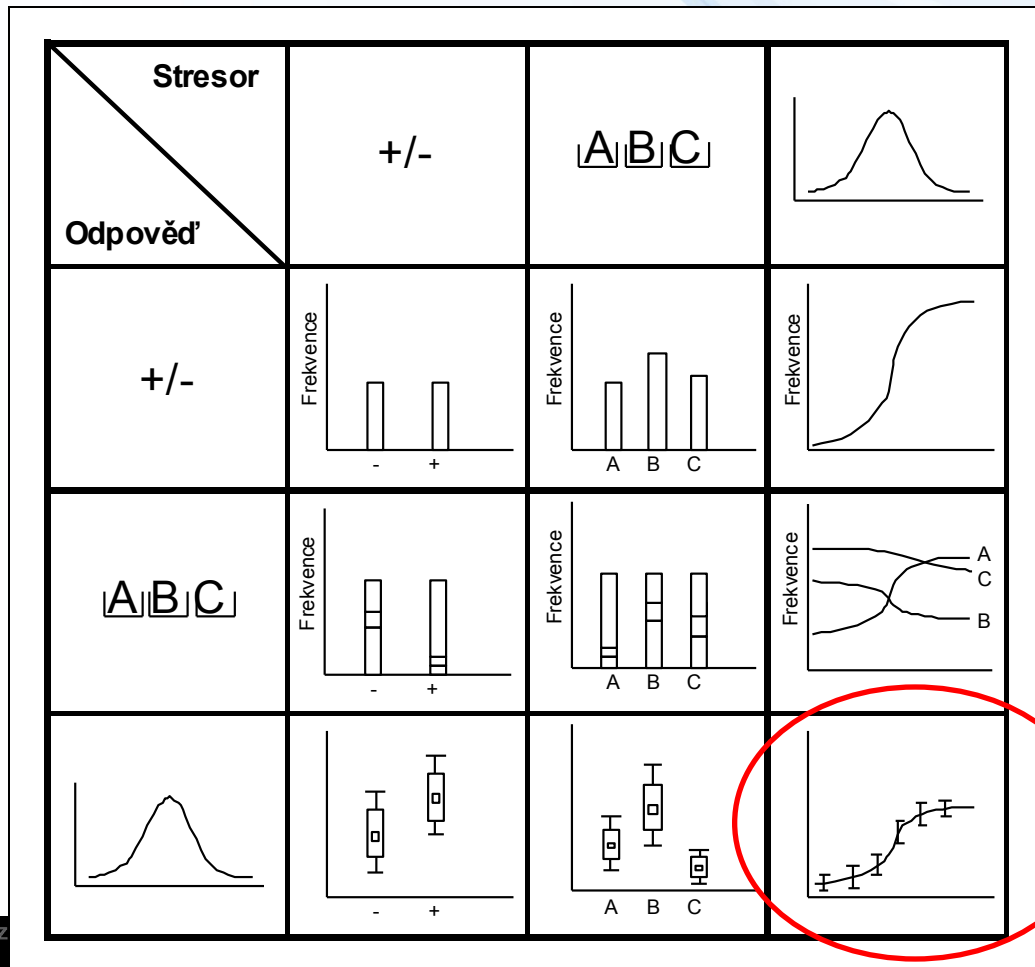
Př. % přežívajících jedinců po působení dávky (efekt – mortalita)
 počty vajíček po působení dávky (efekt - reprodukční toxicita)

Endpoint může být „kvalitativní“ (nemusí být kvantifikovatelný):

- př. iritace na kůži ANO/NE
- kategorizace NEJHORŠÍ / LEPŠÍ / NEJLEPŠÍ

Závislost odpovědi (endpointu) na koncentraci (dávce)

- Spojitá (vyhodnocuje a využívá se nejčastěji)
- Nespojité (např. mortalita +/-, kategorie iritance kůže - p)



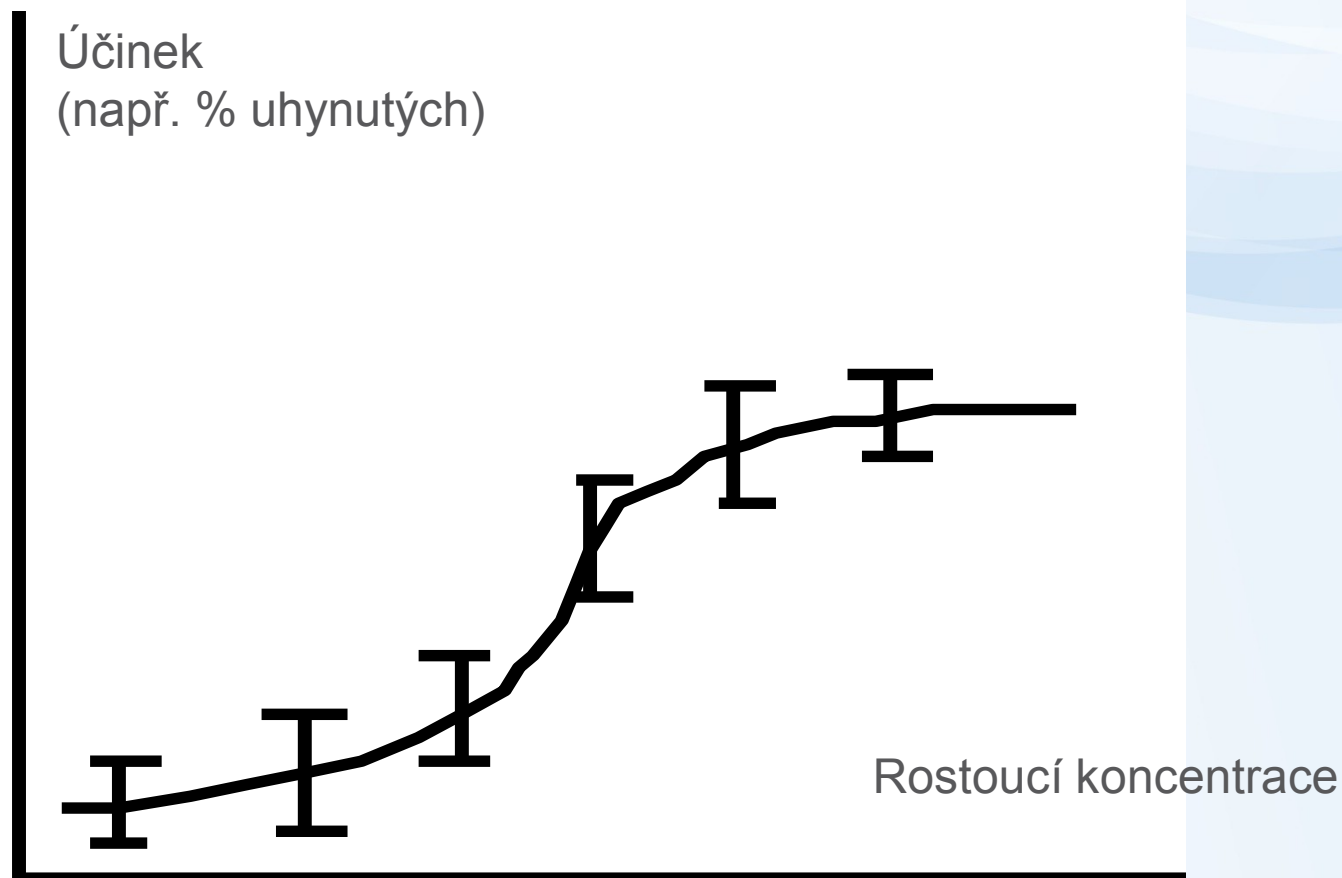
**Nejčastější
(klasická
ekotoxikologie)**

„koncentrace“
vs.
„spojitý efekt“



Proč má křivka sigmoidní charakter ?

Proč není lineární ?



Statistické odvození „sigmoidní křivky“ dávka-odpověď

Většina dějů v přírodě má statisticky

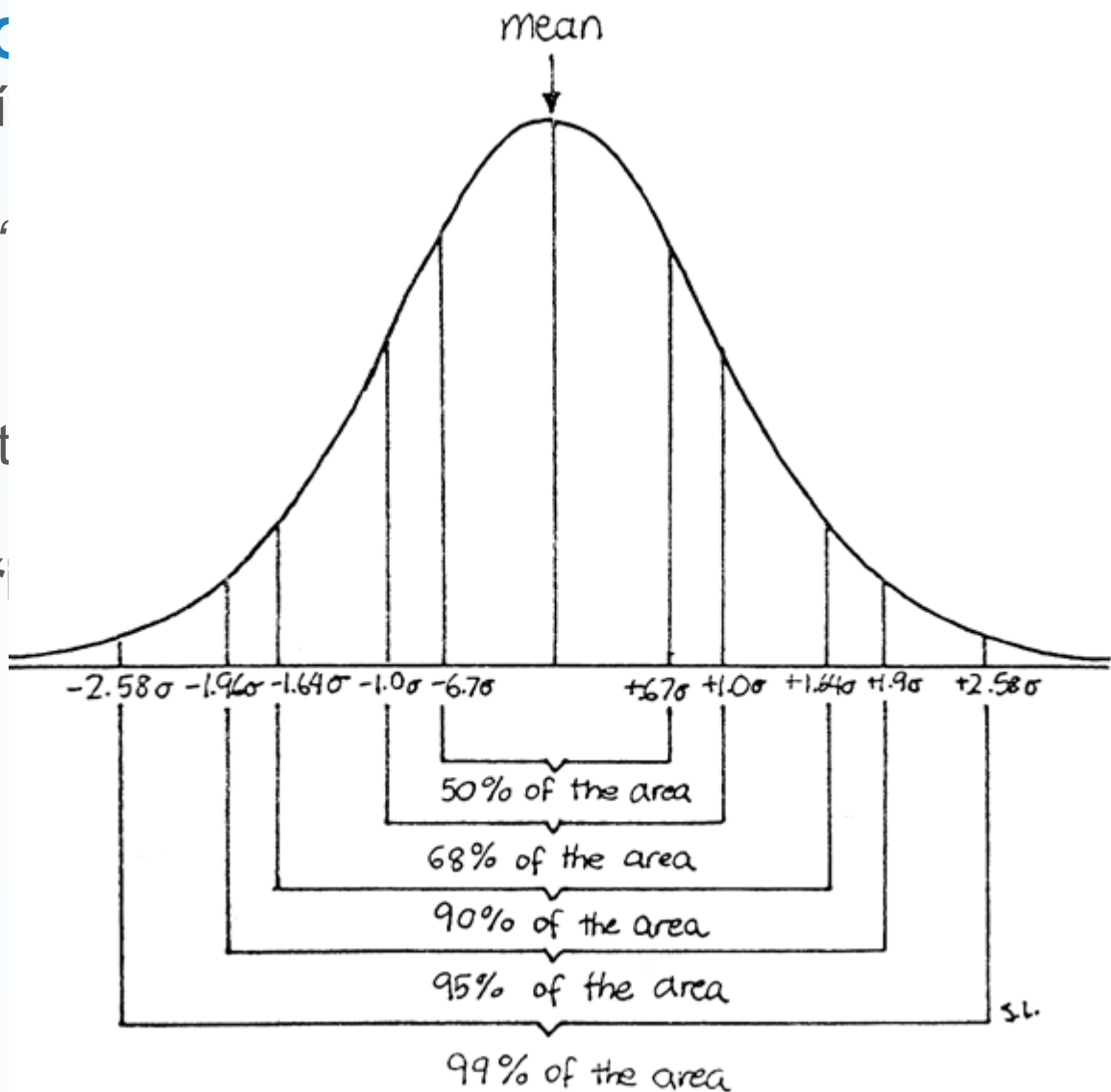
NORMÁLNÍ ROZLOŽENÍ

(resp. Log-normální)

(nejčastější jsou „průměrní“
časté jsou extrémní ...)

→ z něj vychází u velké většiny
hodnocených efektů

- sigmoidní tvar křivky



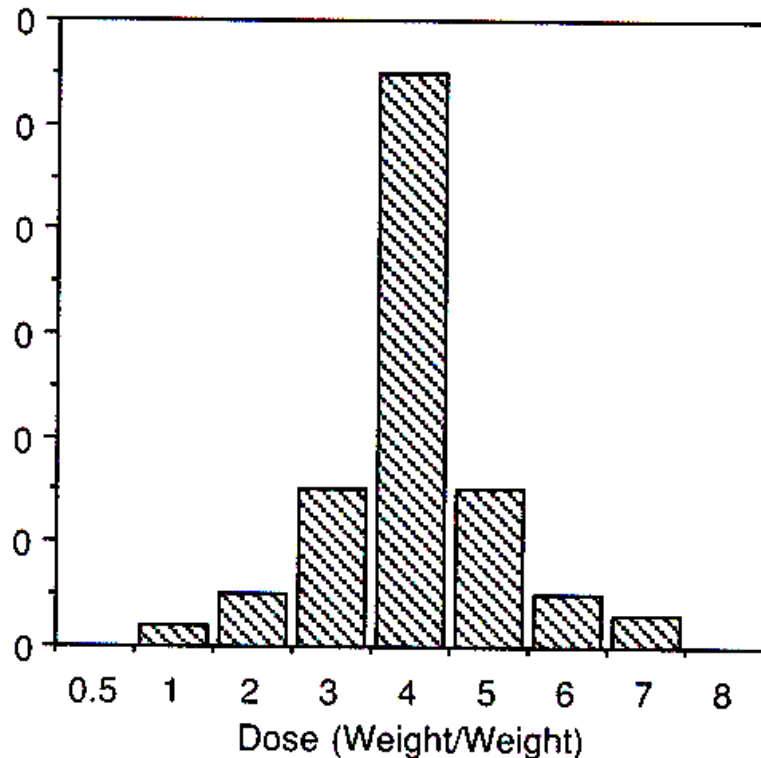
Modelový experiment

- * 10 potkanů
- * **Postupné** injekční podávání toxinu jednotlivým zvířatům
- * Pomalu zvyšování koncentrace (dávky) podávané jednotlivcům
→ Sledování mortality

Výsledek:

- Někteří jedinci zemřou již při nižších dávkách (1, 2, 3)
- Někteří jedinci hodně vydrží a smrt nastane až při vysokých dávkách (5-7)
- **Většina jedinců** však s největší pravděpodobností zemře při dávce 4 (většina je „průměrných“, tj. ani extrémně citlivých ani rezistentních)

Percent Mortality at Each Dose

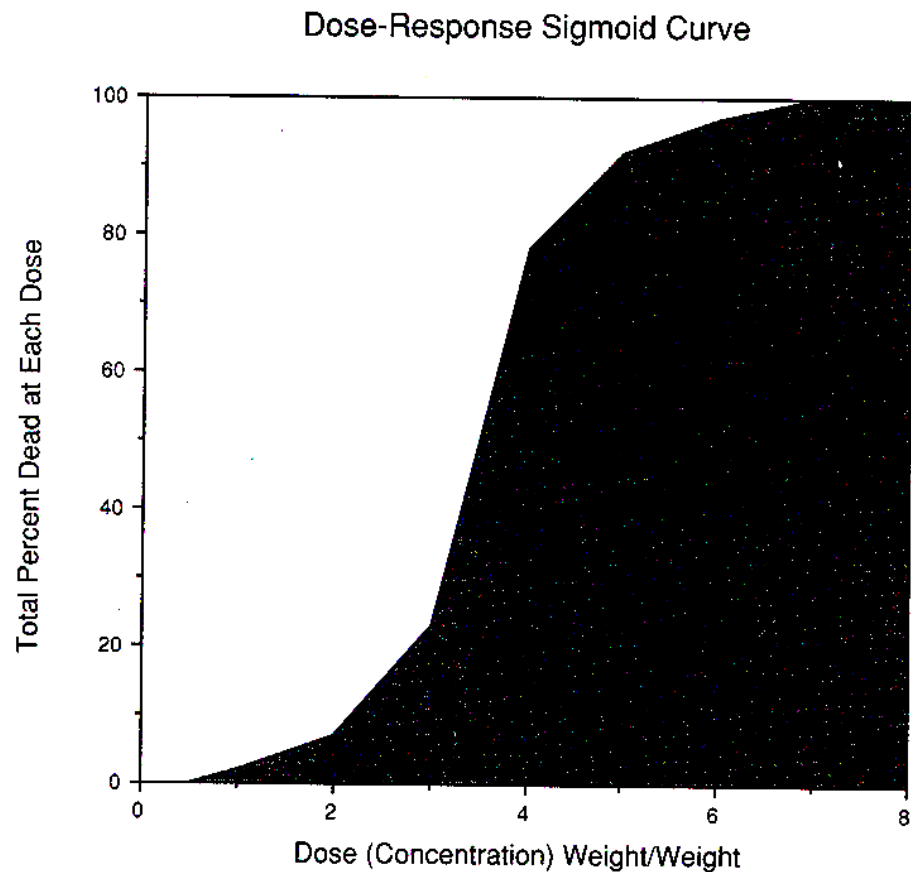
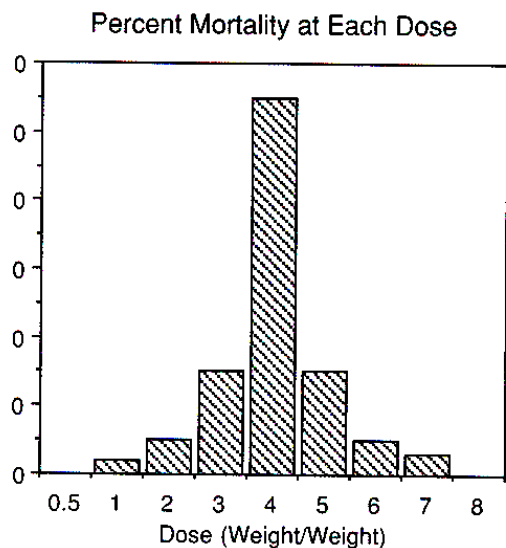


Modelový experiment

Postupné zvyšování koncentrace (dávky) podávané jednotlivcům

: Histogram (četnost)

→ **kumulativní četnost:** sigmoidní charakter křivky



Pro srovnání toxicity různých látek (vzorků) se užívají parametry odvozené z křivky dávka-odpověď

1) Parametry odvozené přímo z experimentálních dat

LOEC/L *Lowest Observable Effect Concentration/L*

- první nejnižší koncentrace použitá v experimentu, která vyvolala významné efekty

NOEC/L *No Observable Effect Concentration/Level*

- podobně: koncentrace použitá v experimentu ...

Nedostatky - subjektivní

- závisí na zvolených koncentracích
- jiný experiment → jiné výsledky (koncentrační rozmezí, ředící faktor – rozdíly mezi koncentracemi 2x, 5x, 10x...)

Pro srovnání toxicity různých látek (vzorků) se užívají parametry odvozené z křivky dávka-odpověď

2) další parametry odvozené z křivky dávka – odpověď

EC_x (x=1,5,10,25,50,75,90,99 apod.)

- ne vždy je v experimentu dosaženo „přesně 5% efektu“
- parametry se počítají (z „*modelované křivky*“)

STANDARD - Hodnoty odvozené pro 50% efekt

- nejčastěji užívány pro srovnání toxicity (!)
- odhady **v oblasti 50% efektů zatíženy nejmenší chybou**
viz předchozí modelový experiment „nejvíce je průměrných“ a proto je odhad průměru nejpřesnější

Parametry

LC₅₀ – koncentrace (C) způsobující 50% letalitu (L)

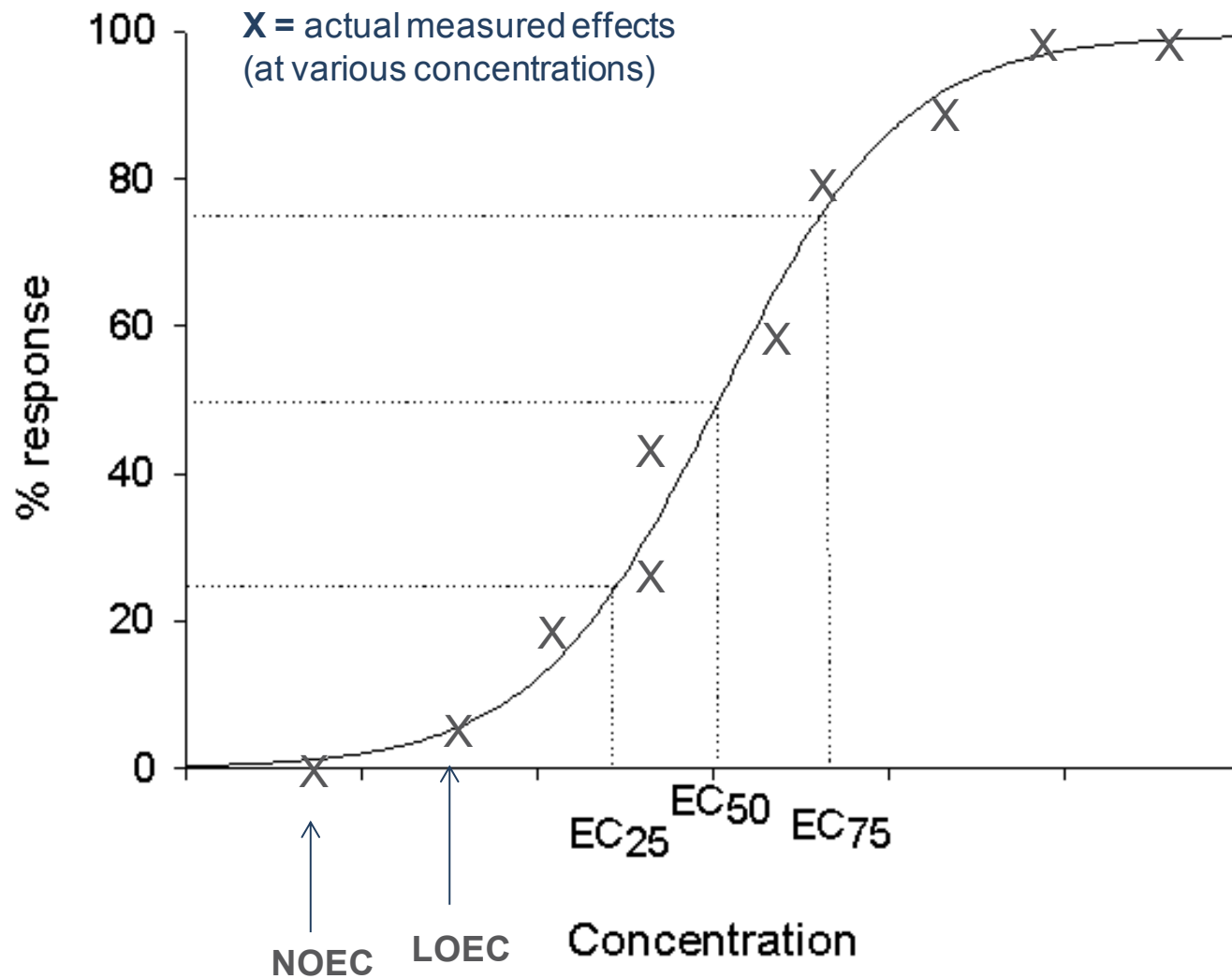
LD₅₀ – dávka (Dose) způsobující 50% letalitu (L)

EC₅₀ – koncentrace způsobující 50% efekt (E)

IC₅₀ – koncentrace způsobující 50% inhibici (I)



Concentration-Response Curve



Příklad – úkol 1

Koncentrace (mg/L)	Počet přežívajících	% Přežívajících
0	20	100
0,05	20	100
0,1	18	90
0,2	19	95
0,4	15	75
0,8	9	45
1,6	3	15
3,2	0	0
6,4	0	0

Jaká je hodnota NOEC?, LOEC?, LC50?, LC90?



Jak prakticky odvodit parametry ECx ?

MODEL SIGMOIDNÍ KŘIVKY

- Složité matematické modely pro aproximaci
- V současnosti - využití počítačové techniky
→ nelineární modely pro aproximace sigmoidy

Jednodušší (historický) přístup *(je ale třeba ho znát!)*

→ Linearizace sigmoidy pomocí probitové metody

Žádaný výsledek →

1) odhad LCx

2) přesnost odhadu LCx (Interval Spolehlivosti)

[Čím vyšší variabilita okolo křivky → tím menší přesnost]



Probitová metoda

Vychází z „normálního
pravděpodobnostního rozložení“

- 1) Každé hodnotě % (pravděpodobnost) přiřazena konkrétní hodnota – tzv. „probit“ (viz tabulka)
- 2) Probit „5“ odpovídá 50% pravděpodobnosti (50% efekt)

→ztah „probit“ vs.
**Logaritmus koncentrace
je lineární**

Linearizace sigmoidy

Snadný odečet LC50: $y = a \cdot x + b$

Probit = $a \cdot \text{Log}(c) + b$

50% efekt: Probit = 5

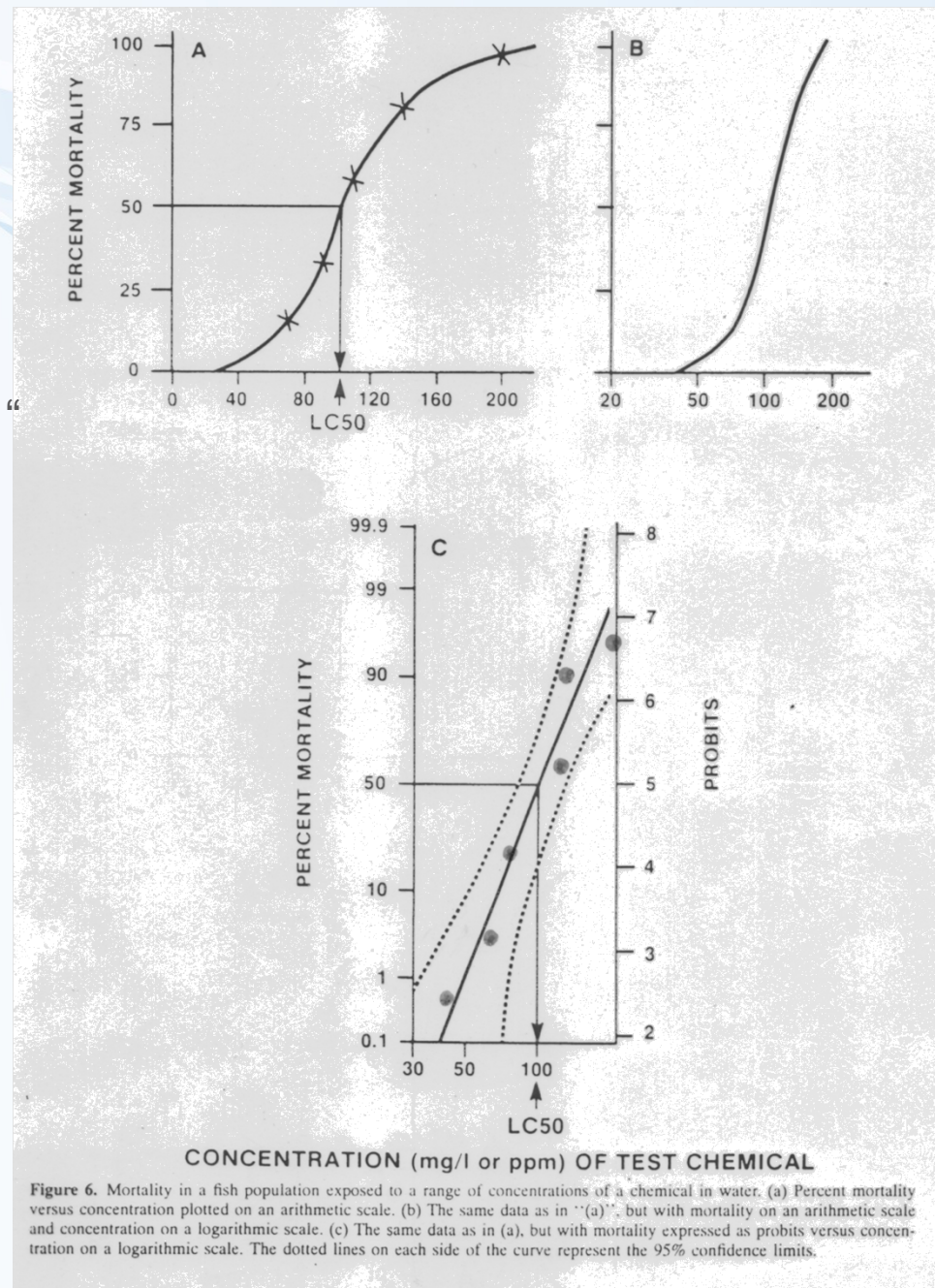


Figure 6. Mortality in a fish population exposed to a range of concentrations of a chemical in water. (a) Percent mortality versus concentration plotted on an arithmetic scale. (b) The same data as in (a), but with mortality on an arithmetic scale and concentration on a logarithmic scale. (c) The same data as in (a), but with mortality expressed as probits versus concentration on a logarithmic scale. The dotted lines on each side of the curve represent the 95% confidence limits.



Table 3.2 Transformation of percentages to probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.00



Interpretace a využití křivek dávka-odpověď

Srovnání toxicity různých látek

porovnání hodnot IC_x

Příklad

Látka 1 je toxičtější

- nižší EC_x

- při nižších koncentracích se projevují efekty

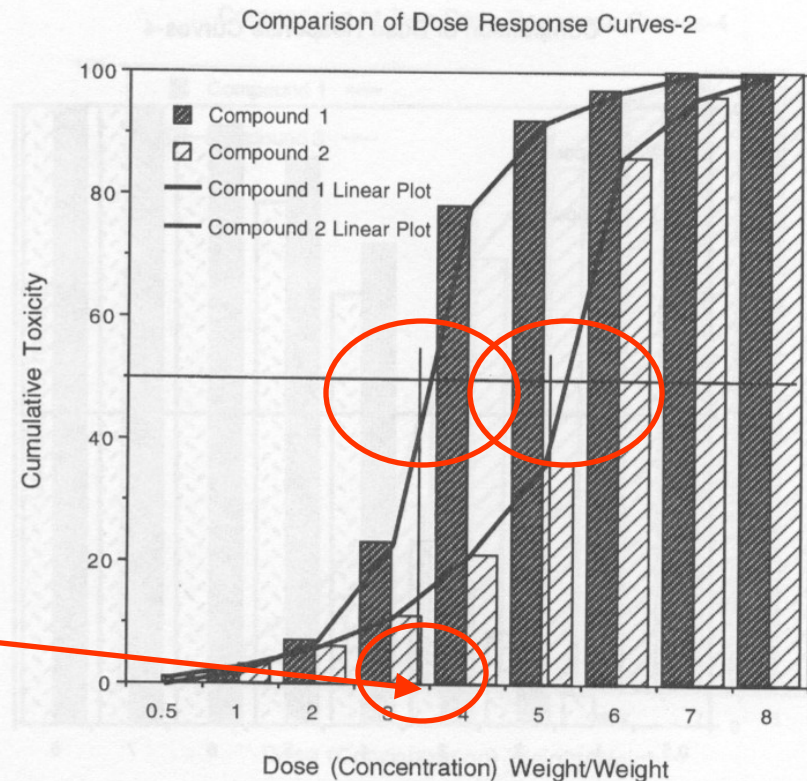


Figure 3.5 Comparison of dose-response curves — 2. Plotting the dose-response demonstrates that the concentrations that cause mortality to 50% of the population are distinctly different. However, the slopes of the two curves appear to be the same. In many cases this may indicate that the compounds interact at a similar molecular level.



Využití křivky dávka - odpověď

Srovnání toxicity různých látek

Problém: různé směrnice (sklon) křivky Dávka-Odpověď

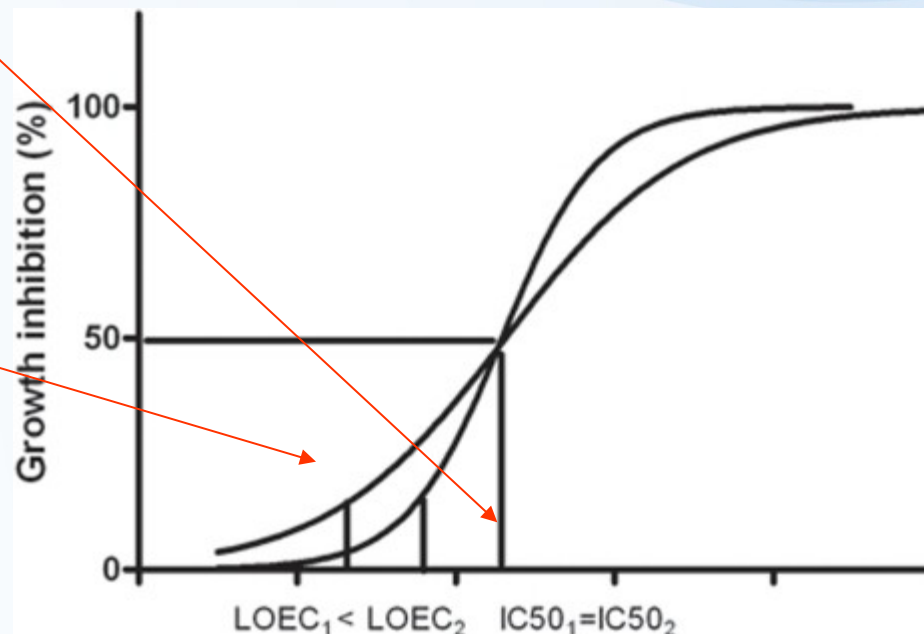
→ Pro **interpretaci je nutno uchovat (ukázat) data celé křivky**

Příklad:

Na základě EC_{50} není rozdíl

ALE

látka 1 vykazuje efekty ve významně nižších koncentracích (bude mít nižší $LOEC/NOEC$)



BEZPRAHOVÉ působení

-při klasickém hodnocení se předpokládá **prahová koncentrace**, při které již nelze pozorovat žádný efekt (NOEC / NOEL)

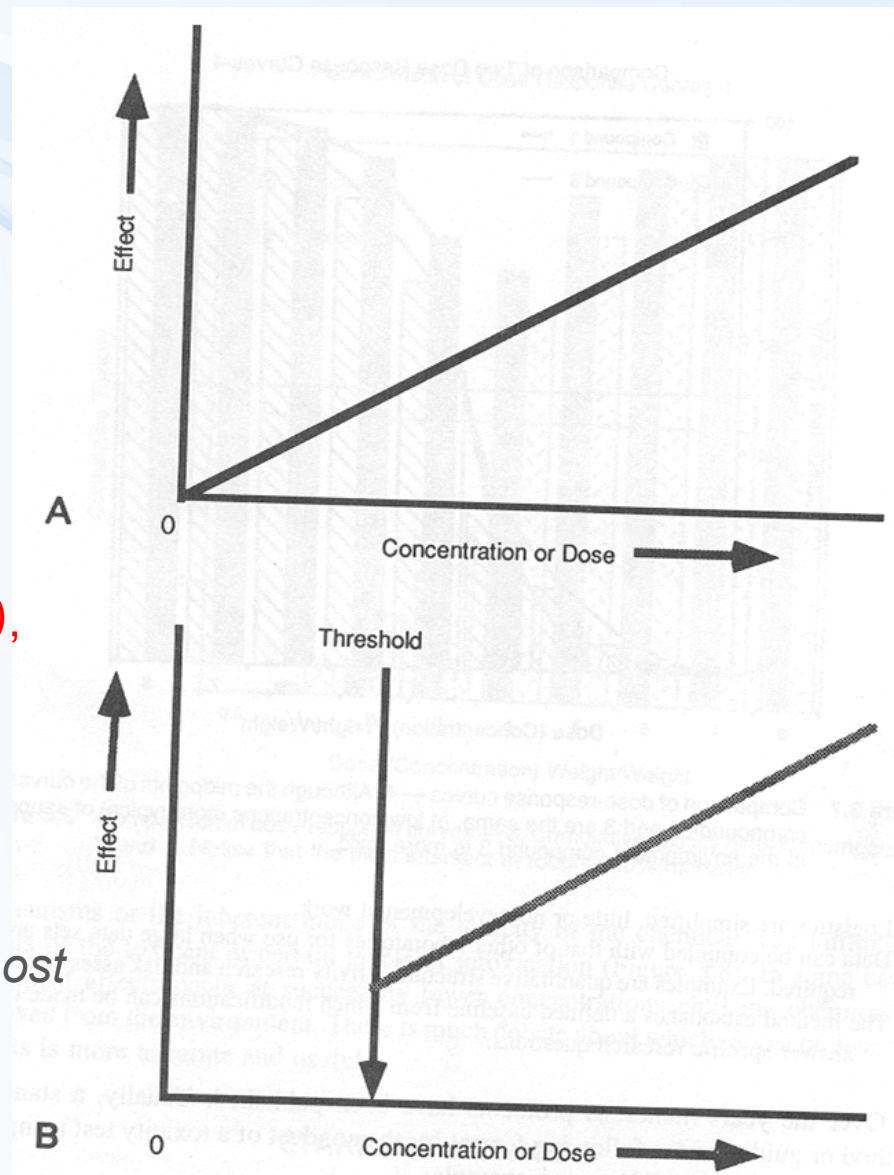
-u některých látek se uvažuje o NEEEXISTENCI prahu;

tj. efekt se projeví při jakékoliv nenulové koncentraci (*bezprahová toxicita*),
→ **stochastický účinek**

Bezprahově působící látky:

Mutageny, genotoxické karcinogeny

Koncentrace pouze zvyšuje pravděpodobnost stochastické (náhodné) události, tedy vzniku mutace



Ne všechny křivky jsou „jednoduše sigmoidní“

→ Nové poznatky: Endokrinní disruptory

→ **Domácí úkol: Samostudium – PDF: Nature (2012) 490:462**

→ Znáte odpovědi na tyto otázky:

Jaké mechanismy způsobují „nemonotonní“ tvar křivky?

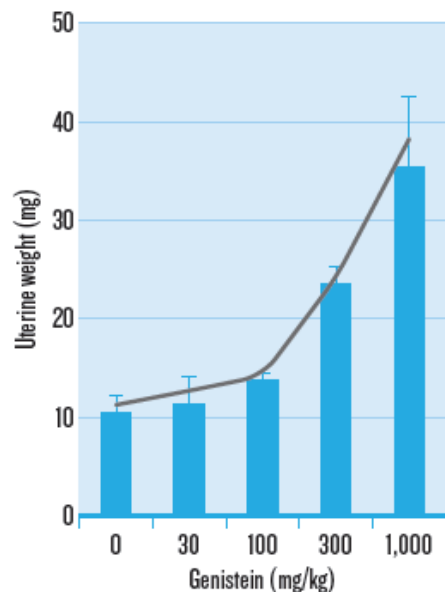
Které látky například (znát strukturu) tyto efekty vyvolávají?

CURIOUS CURVES

Researchers have found that many endocrine-disrupting chemicals do not generate the standard monotonic dose-response curves seen for other types of compound.

MONOTONIC CURVE

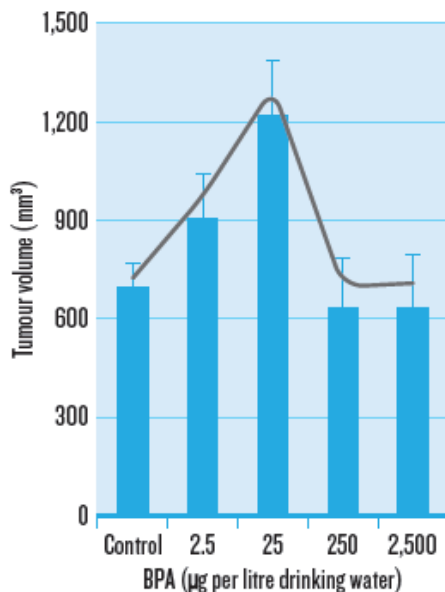
In some cases, dose and response increase together. The plant oestrogen genistein, for instance, causes the mouse uterus to increase in weight.



SOURCE: Ohto, R. *et al. J. Toxicol. Sci.* **37**, 879–889 (2012)

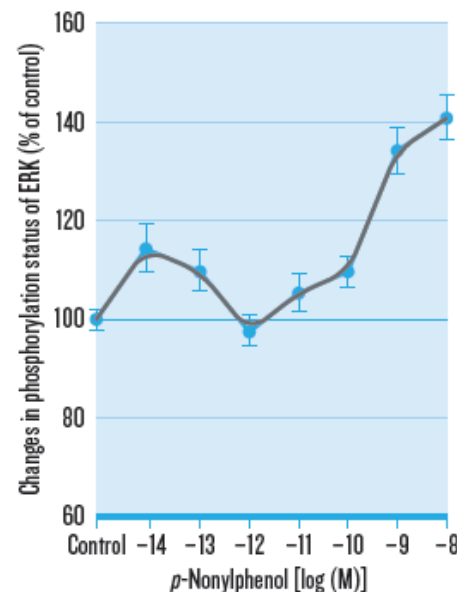
NON-MONOTONIC CURVES

Mice exposed to moderate doses of bisphenol A develop the largest tumours. Moderate and high doses are thought to induce tumour-cell proliferation, but high doses also trigger cell death.



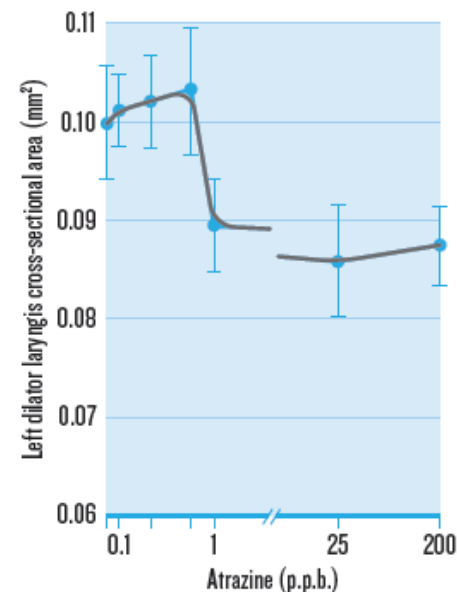
SOURCE: Jenkins, S. *et al. Environ. Health Perspect.* **119**, 1604–1609 (2011)

The oestrogen mimic *p*-nonylphenol stimulates the ERK cell-signalling pathway at low and high doses. Interactions with hormone receptors and other membrane proteins explain the complex shape of the curve.



SOURCE: Bulayeva, N. N. & Watson, C. S. *Environ. Health Perspect.* **112**, 1481–1487 (2004)

Above a certain dose, the herbicide atrazine causes the larynx muscle to shrink in male frogs. But the effect does not increase at higher doses.



SOURCE: Hayes, T. A. *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 5476–5480 (2002).

Výsledkem hodnocení toxicity jsou tedy „KONCENTRACE“

Vyjádření KONCENTRACÍ při hodnocení TOXICITY

(1) čisté látky a definované směsi látek

(barvy, produkty chemické výroby ...)

KONCENTRACE hmotnostní nebo molární

– mg/L, ug/L, mmol/L (=mM), nmol/L (=nM) apod.

! Znat přepočty koncentrací !

(2) vzorky z prostředí a jejich extrakty (výluhy apod.)

- KONCENTRACE původní matrice

př. Voda EC50 = 1% (100x ředěná voda vyvolává 50% efekt)

- KONCENTRACE EXTRAKTU (% ředění ...)



TOXICITA SMĚSÍ



Vzorky v prostředí = KOMPLEXNÍ SMĚSI

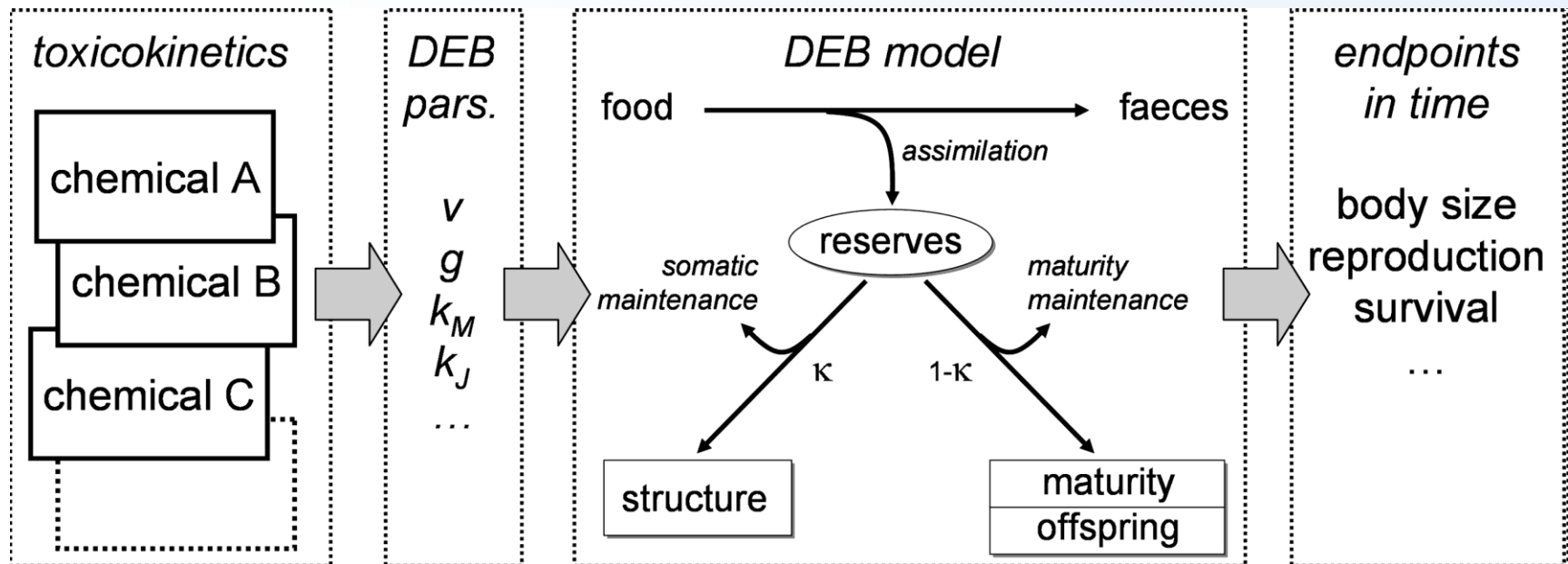
- Látky ve směsích mají ve srovnání s čistými – izolovanými – látkami odlišné biologické vlastnosti (vč. toxicity)

- Látky se mohou v efektech ovlivňovat

ADITIVITA / SYNERGISMUS / ANTAGONISMUS

- Připomínka: model „Dynamic Energy Budget“

(tři hlavní procesy v biotě a jejich ovlivnění toxickými látkami)

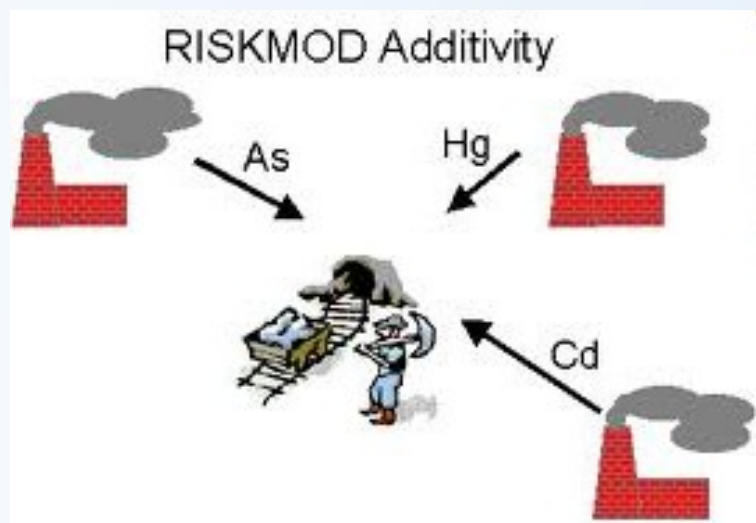


Vzorky v prostředí – KOMPLEXNÍ SMĚSI

(1) ADITIVITA

- nejčastější princip v realitě směsí
- základní princip kumulativní toxicity = Aditivní model
- nejčastější u látek s "nespecifickým" mechanismem toxicity (*polární narkoza*)

Př. látka 1 vyvolá v koncentraci c_1 , efekt 25%
látka 2 vyvolá v koncentraci c_2 , efekt 30%
směsný roztok L1 a L2 v koncentracích c_1 a c_2
vyvolá efekt 55% (25 + 30)



Vzorky v prostředí – KOMPLEXNÍ SMĚSI

(2) ANTAGONISMUS

- látky ve směsi vzájemně inhibují toxický efekt
- efekt po působení směsi je menší než podle předpovědi aditivního modelu
- u látek se specifickými biologickými-toxikologickými vlastnostmi, spíše vzácný

Příklady

Současné působení neurotoxinů s různým mechanismem (*princip "protijedů"*)

- Veratridin (*otevření membránových kanálů pro Na⁺/K⁺*)
- Saxitoxin (*inhibice kanálů*)

Vyšší tvrdost vody (Ca, Mg) snižuje toxicitu těžkých kovů (Cu, Cd apod.)
(Kompetice toxických kovů vs. Ca/Mg na žábrech o přenašeče
→ vyšší tvrdost: menší příjem toxických kovů
→ menší toxicita (antagonismus)



Vzorky v prostředí – KOMPLEXNÍ SMĚSI

(3) SYNERGISMUS

- látky ve směsi se vzájemně potencují
- efekt po působení směsi je vyšší než podle předpovědi aditivního modelu
- často u látek se specifickými biologickými-toxikologickými vlastnostmi

Příklad

Toxicita pro Ryby:

současné působení detergentu (snížení povrchového napětí na membránách žaber)

a polární látky (např. inhibitoru mitochondriální respirace)

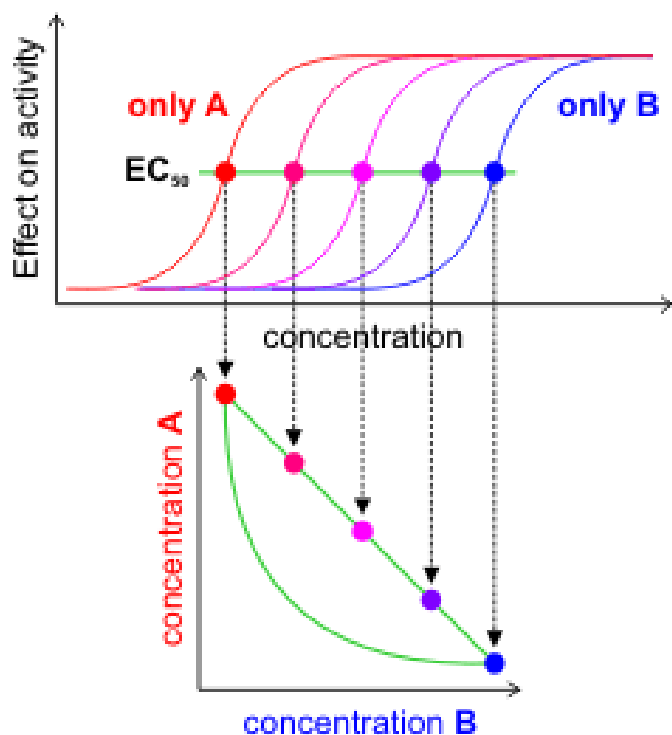
(samotný jed obtížně vstupuje do buňky ALE v přítomnosti detergentu

→ rychlý vstup, významný toxický efekt)

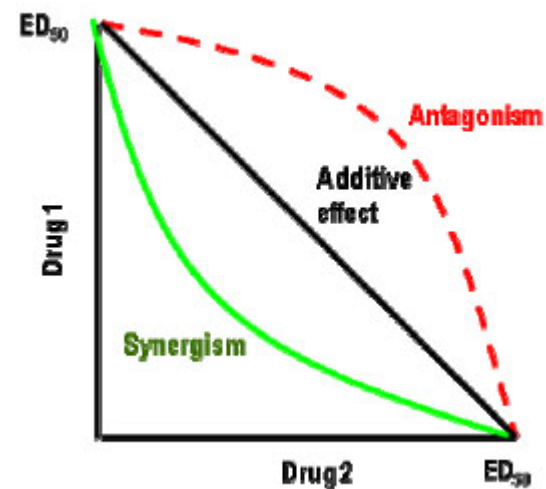
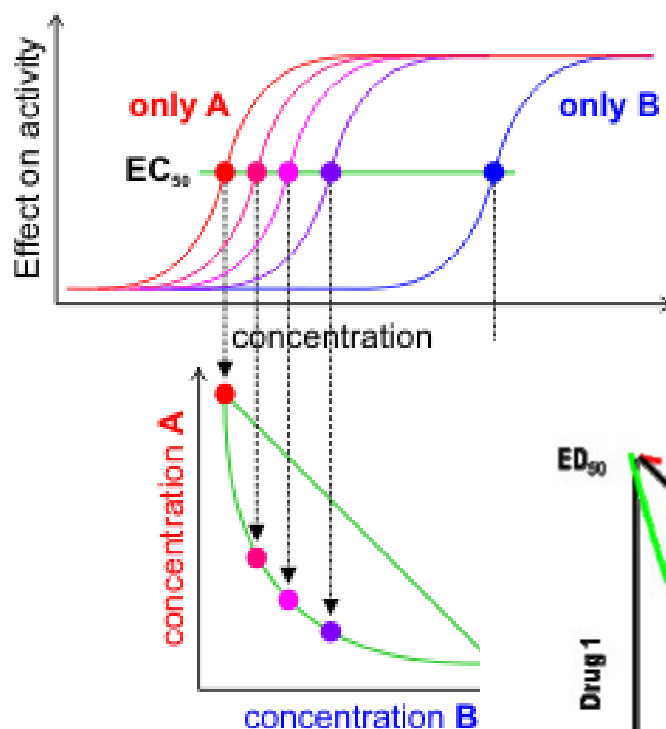


Vyhodnocení toxického působení látek v binárních směsích - tzv. isobologramy -

Příklady: Aditivita

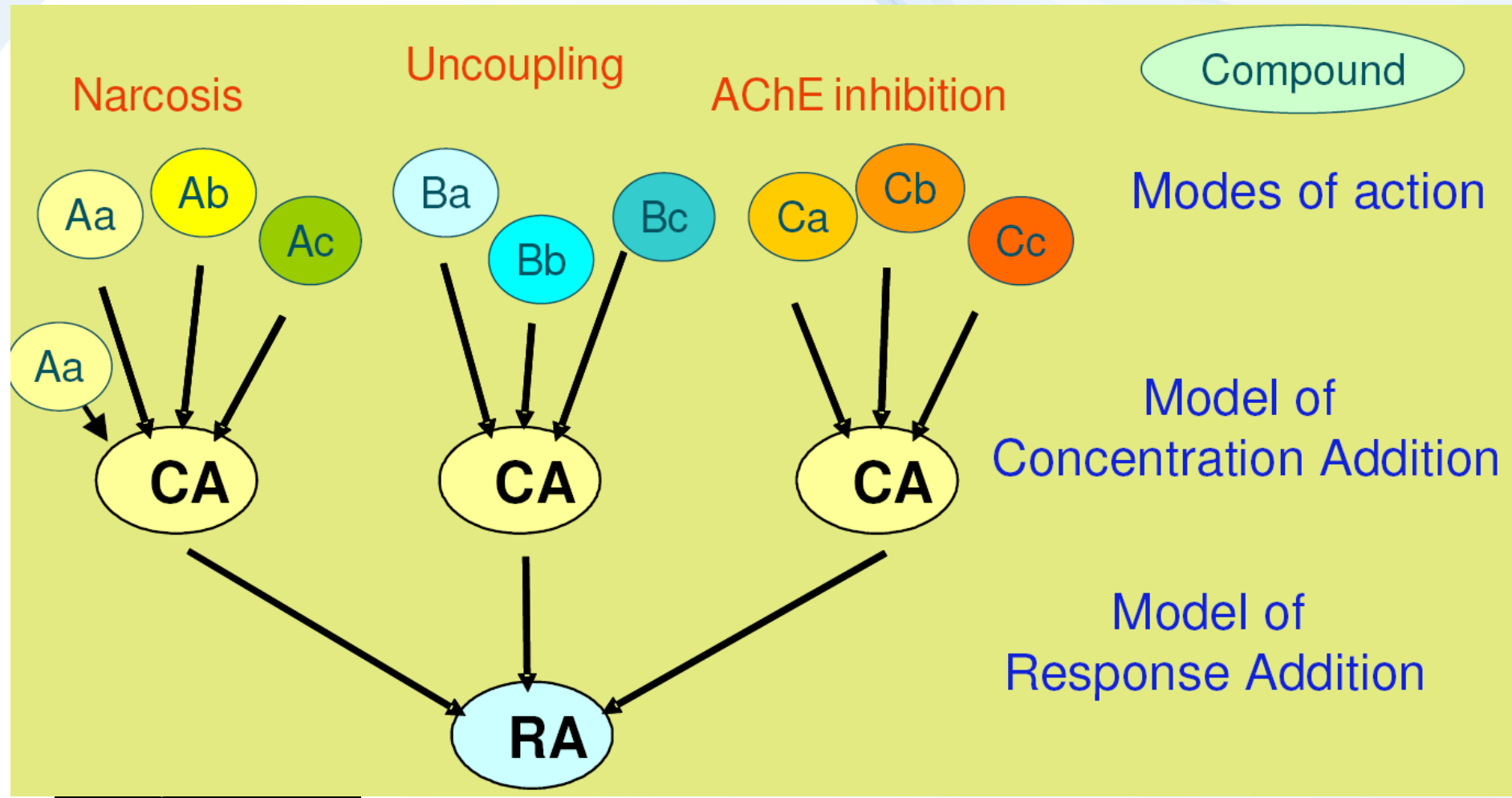


Synergismus



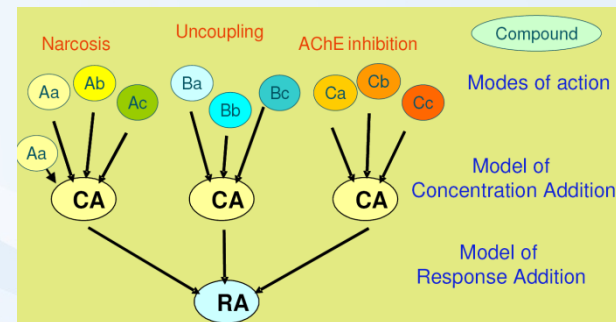
Praktické hodnocení toxicity směsí za předpokladu ADITIVITY

- 1) skupiny látek se stejným mechanismem toxicity
(„aditivita koncentrací“)
- 2) mezi skupinami („aditivita efektů“)



Příklad

Jaká bude pravděpodobně toxicita vzorku vody pro řasy, pokud v něm byly nalezeny uvedené toxické látky?



Chemikálie

a koncentrace ve vodě

Atrazin – 0,1 ug/L

Simazin – 0,2 ug/L

2,4-D – 3 ug/L

MCPA – 1 ug/L

Chlorfenol – 500 ug/L

Skupina

triazin

triazin

močovina

močovina

neutrální HC

Mechanismus toxicity

– vazba na PQ v PSII

– vazba na PQ v PSII

- rozpojení PSII

- rozpojení PSII

- polární narkoza

Víte, že

... EC50 jsou přibližně následující:

triazinové herbicidy

0,5 ug/L

deriváty močoviny

6 ug/L

chlorfenol

2 mg/L

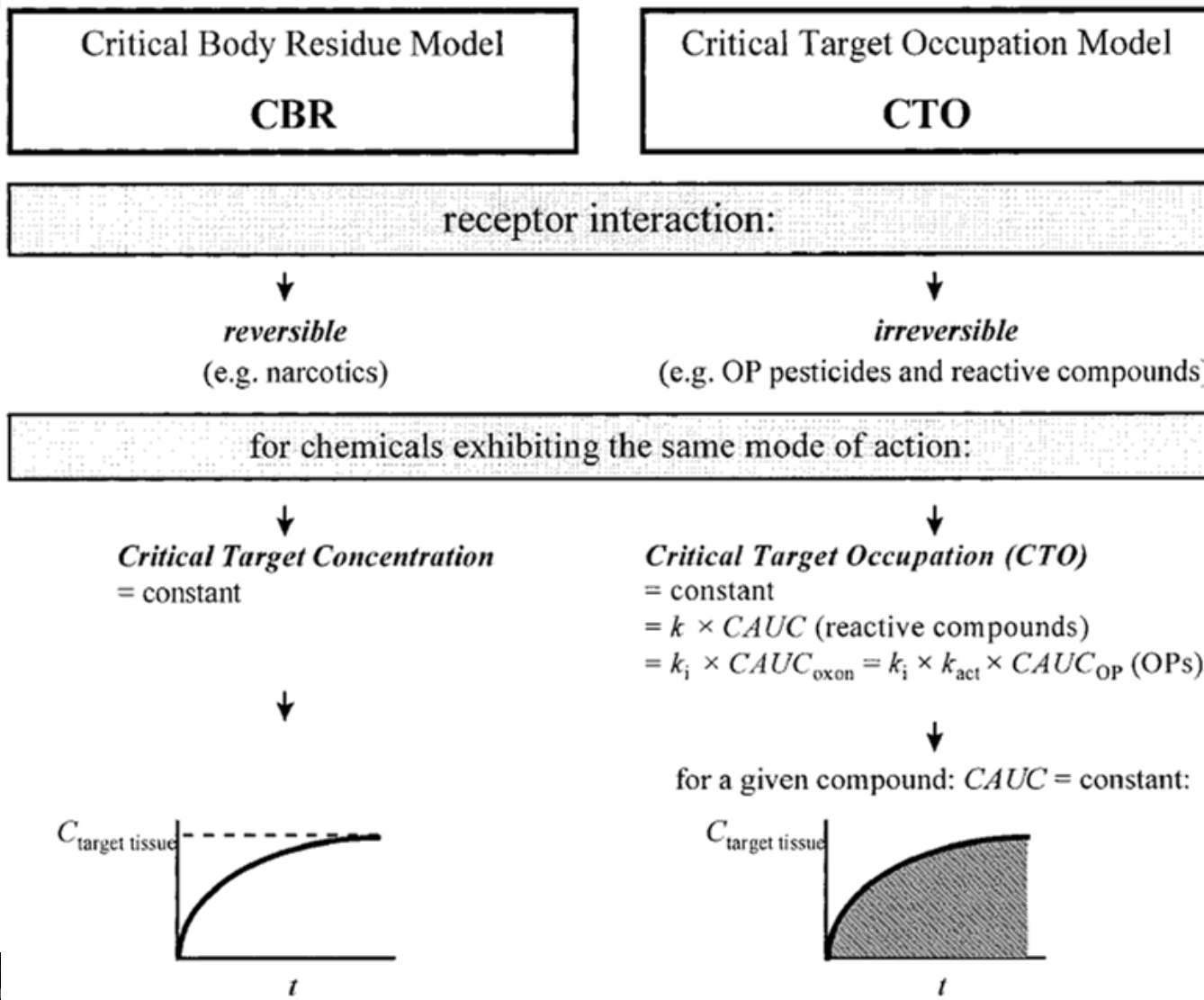
... směrnice křivky dávka-odpověď je pro všechny skupiny látek cca „1“
(zdvojnásobení dávky vyvolá u každé skupiny přibližně dvojnásobný efekt)



Expozice (čas) vs. toxicita



Vztah mezi toxicitou (koncentrací) a časem „Kritická rezidua látky v organismu“



Vztah mezi toxicitou (koncentrací) a časem „Kritická rezidua látky v organismu“

- S prodlužující se expozicí přirozeně roste toxicita, ALE
- Toxicita neroste s časem nekonečně
(*resp. hodnota LC50 neklesá nekonečně*)
- Podle modelů CBR lze odvodit **nejnižší reálnou hodnotu LC50**

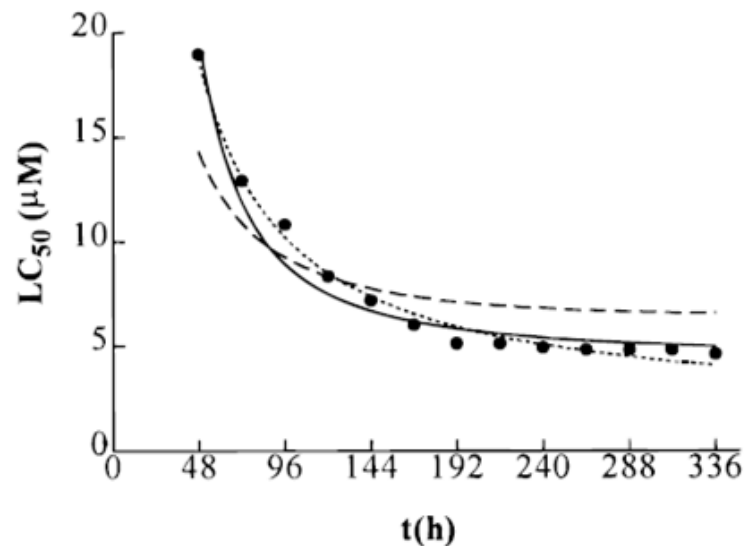
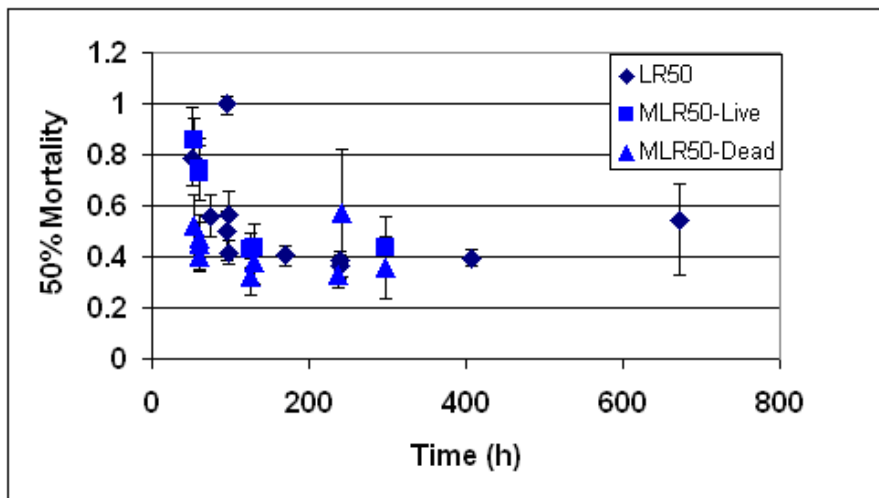


FIGURE 4. Fits of the critical body residues model (CBR, - -), the aqueous critical target occupation model (CTO_a, · · ·), and the whole-body critical target occupation model (CTO_{wb}, —) to the LC₅₀(t) data of chlordion in the pond snail.



Vztah mezi toxicitou (koncentrací) a časem (2)

- Nesouvislá, sekvenční expozice -

- Organismy nejsou chemickým látkám vystaveny kontinuálně
 - Expozice jednorázová
 - Expozice vícenásobná, dlouhodobá atd.
- Čas a působení „směsí“
 - 1) Expozice látky A
 - změna fyziologie, zvýšení/snížení citlivosti
 - 2) Následná expozice látky B
 - vyšší (neočekávaná) toxicita (viz *Nature* (2012) 490:462)

