

Experimentální a aplikovaná toxikologie a ekotoxikologie

Klára Hilscherová

RECETOX

www.recetox.muni.cz

Toxikologie

- věda, která se zabývá studiem nepříznivých účinků chemických, fyzikálních a biologických agens na živé organismy a ekosystémy včetně prevence a léčby těchto nepříznivých účinků. (Society of Toxicology)

- v užším slova smyslu - věda, která se zabývá škodlivými účinky chemických látek na živé organismy včetně jejich buněčných, biochemických a molekulárních mechanismů a odhadem jejich možného výskytu.

Hlavním cílem toxikologie je zjištění škodlivých a nežádoucích biologických vlastností (toxicity) chemických sloučenin i jejich směsí.

K jejím hlavním cílům patří stanovit bezpečné dávky a určit mechanismy působení biologických účinků chemických látek. Hledá preventivní opatření na ochranu před jejich škodlivými účinky, a pokud již k otravě dojde, pak také účinné způsoby diagnostiky a léčby.

Ekotoxikologie

Vědní disciplína zabývající se studiem toxického působení látek a faktorů antropogenního či přirozeného původu na živé organismy, jejich populace a společenstva.

Cíl: poznat interakce mezi živými organismy a chemickými látkami v prostředí na všech úrovních a využít těchto znalostí pro ochranu přírodních druhů a společenstev (celý ekosystém), predikce účinků

Toxikologie	Ekologie	Ekotoxikologie
Chránit člověka před toxickými účinky látek	Sleduje vztahy mezi organismy a mezi organismy a prostředím	Chránit populace mnoha druhů před toxickými účinky
Vychází z pokusů na zvířatech	Vychází z polních studií	Využívá různé citlivosti druhů (bakterie, rostliny, bezobratlí, obratlovci)
Definuje mechanismy působení	Sleduje fyziologické stavy (teplota, vlhkost, světlo aj.)	Sleduje nefyziologické stavy (působení stresorů)
Standardizované testovací metody	Ekologické studie	Mnoho metod, málo standardních

Cílem toxikologie je vyvíjet a používat takové metody, které umožňují sledovat nepříznivý vliv látek na člověka za standardních, reprodukovatelných podmínek.

Cílem ekotoxikologie je vyvíjet a používat takové metody, které umožňují sledovat nepříznivý vliv látek na živé organizmy za standardních, reprodukovatelných podmínek.

Metody musí umožnit srovnání účinků různých látek či u různých organizmů mezi sebou a především srovnání odpovídajících výsledků z různých laboratoří.

- testy toxicity

Koncept eko-toxikologie

Sleduje změny na různých úrovních biologické organizace:

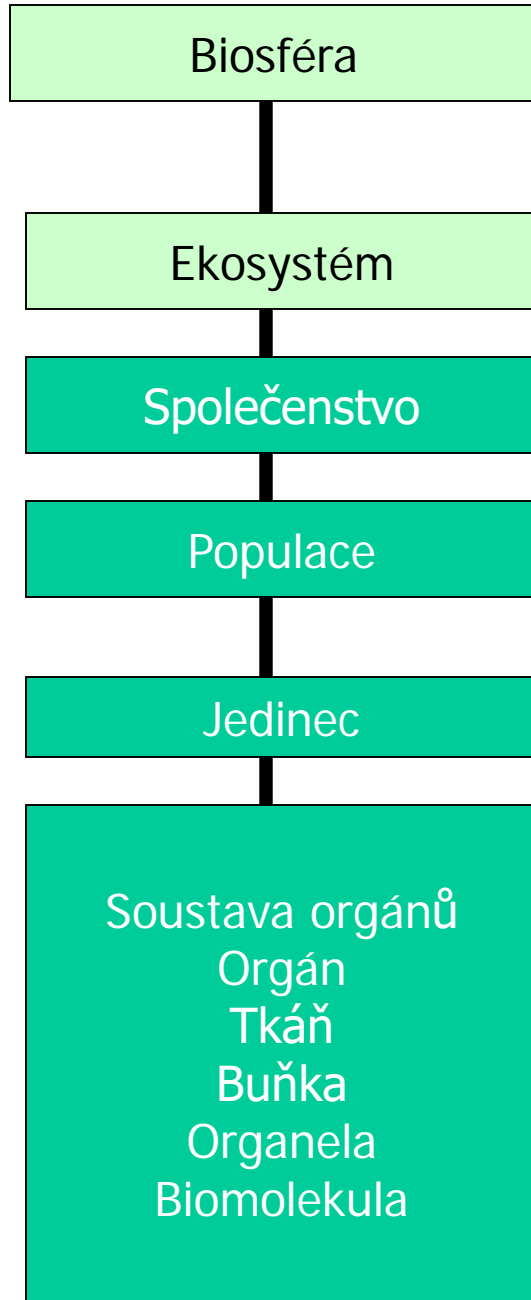
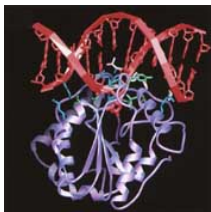
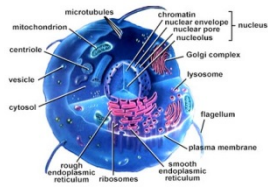
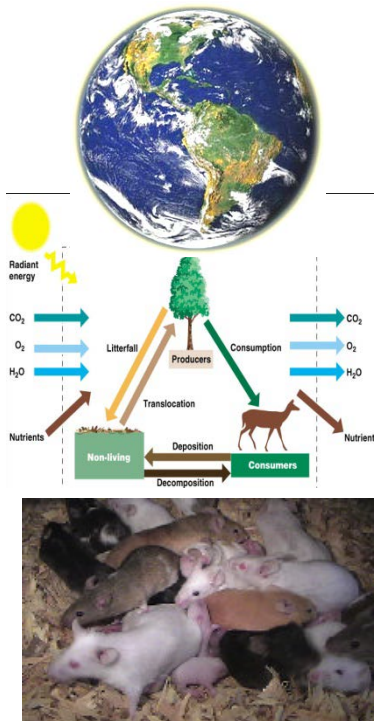
Molekuly - geny - buňky - orgán - organismus - populace
- společenstvo - ekosystém - biosféra

Růst - rozmnožování - interakce - metabolismus

Hlavní cíl:

Poznání interakcí mezi živými organismy a stresory v prostředí na všech úrovních

Využití těchto poznatků pro ochranu lidského zdraví (toxikologie), živých organismů, jejich populací, společenstev a ekosystémů



NÍZKÁ

VYSOKÁ

Ekologická
relevance
Trvání odpovědi
Dlouhodobější
následky

Flexibilita
Schopnost určit
příčinu
Specifita
Citlivost

VYSOKÁ

NÍZKÁ

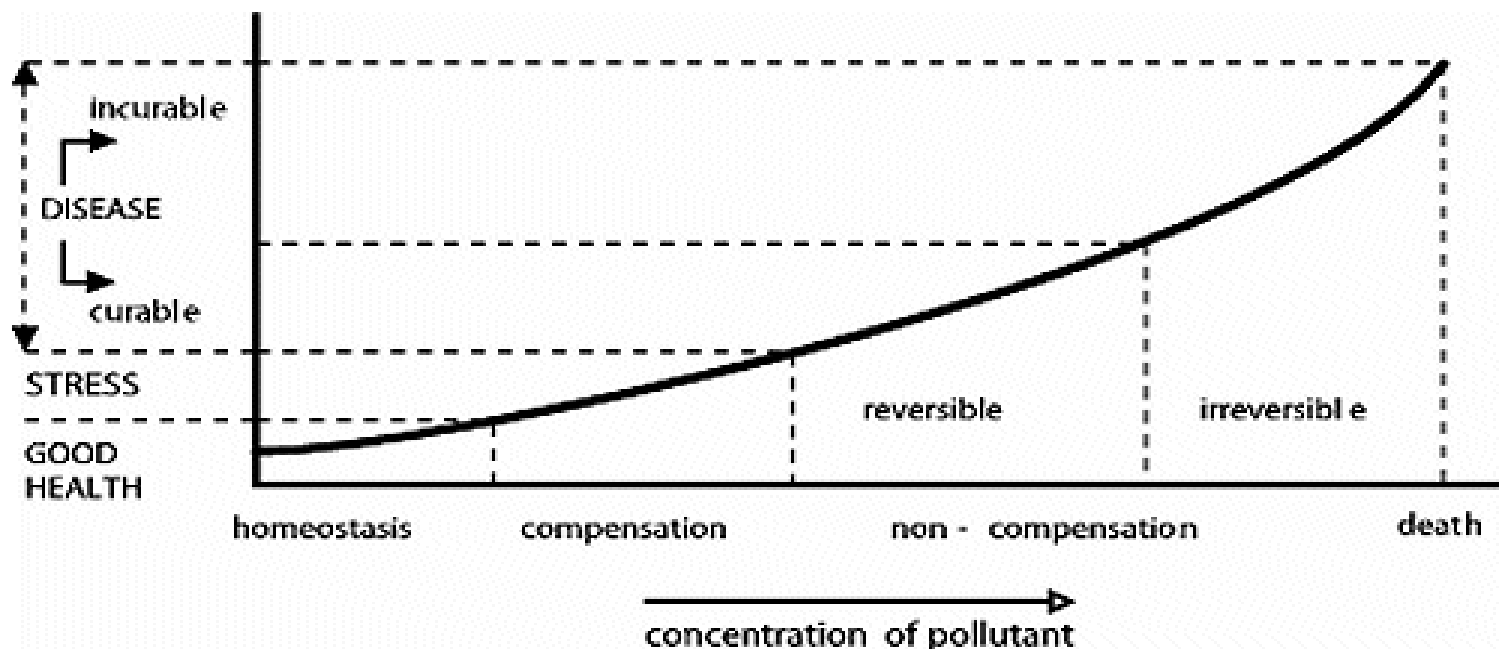
Stresory a ekosystém

Stres: stav mobilizace obranných a nápravných procesů vůči podnětům přesahující obvyklý rozsah homeostázy a odpověď na podněty, které vytvářejí abnormální podmínky

Stresor: každý faktor či situace, které vedou k mobilizaci vnitřních rezerv a využívání abnormální energie pro udržení ekosystému

Poplachové stadium - resistance - vyčerpání

Opakované působení stresu může vést k adaptaci



Stres v prostředí

Fyzické změny prostředí

úpravy vodních toků, stavby vodních děl, železnic, silnic, průmyslových a obytných objektů. Změny užívání půdy.

Vnášení nepůvodních druhů, nových organismů (**GMO**)

Uvolňování cizorodých látek a změny poměrů přírodních látek: globální změny - ozonová díra, skleníkový efekt, změny hydrologických poměrů. Změny přírodních ekosystémů, eutrofizace, toxicita pro živé organismy.

Chemický stres

Toxikanty: chemické látky uvolňované do prostředí, které mohou působit toxicky v relativně nízkých koncentracích a poškozovat ekosystém.

Antropogenní původ: průmyslové produkty, odpady, pesticidy a další látky v zemědělství, farmaceutika, domácí chemie, ropné produkty atd.

Přirozený původ: toxiny sinic - eutrofizace

ZDROJE EXPOZICE

Expozice chemickým látkám může pocházet z mnoha zdrojů:

- Environmentální
- Pracovní
- Terapeutická
- Dietární
- Náhodná, nehody
- Záměrná, úmyslná



Vnášení látek do prostředí

Zemědělská činnost: pesticidy, hnojiva

Průmyslová činnost: výrobky, vedlejší produkty výroby, odpady

Komunální činnost: odpady, spalování domácích odpadů

Produkty spalování

Doprava: emise, otěry, úniky, havárie

Humánní a veterinární léčiva, domácí chemie

Faktory ovlivňující osud, distribuci a toxicitu látek

- Chemicko - fyzikální faktory
- Koncentrace
- Rozpustnost ve vodě a v tucích
- Struktura látky
- Perzistence
- Faktory prostředí - teplota, vlhkost, intenzita světla, kontaminace prostředí

Vlastnosti ekotoxikantů

Fyzikálně-chemické: rozpustnost, odpařování, transformace

Biochemické: bioakumulace, biotransformace, potenciace (inhibice detoxikace, zvýšení metabolické aktivace)

(Pato)fyziologické: letalita, subletální účinky, poruchy reprodukce atd.

Ekologické: zásah do klíčových procesů v ekosystémech - fotosyntéza apod.

Osud látky v prostředí

Distribuce - transformace:

Kompartmenty:

Akvatická: biota/voda, sediment/voda

Terestrická: atmosféra/biota, atmosféra/půda, biota/potrava. Biomagnifikace

Atmosférická: dálkový transport, fotochemické reakce

Transformace: biodegradace - dosažení rovnováhy

Změna struktury, degradace na menší molekuly (až CO_2 a H_2O)

Detoxikace/bioaktivace - vznik toxičtějších produktů

Oblasti (eko)toxikologie:

- **Popisná** – zabývá se testováním a hodnocením toxicity látek, jejich nebezpečnosti. Je zaměřena buď jen na člověka (toxikologie - účinky polutantů, léků, drog, aditiv) nebo na jiné organismy (ekotoxikologie – účinky polutantů - ryby, ptáci, rostliny).
- **Mechanistická** – studuje mechanismy toxických účinků látek, převádí laboratorně stanovené vlastnosti (na zvířatech) na možné účinky na člověka či jiné cílové organismy. Uplatňuje se při vyhledávání alternativních látek a při terapii otrav, predikci účinků netestovaných látek, spolupůsobení látek ve směsích.
- **Regulační** – stanovuje praktickou použitelnost dané látky tak, aby nepůsobila toxicky. Pomáhá stanovit limitní hodnoty pro různá média a prostředí.

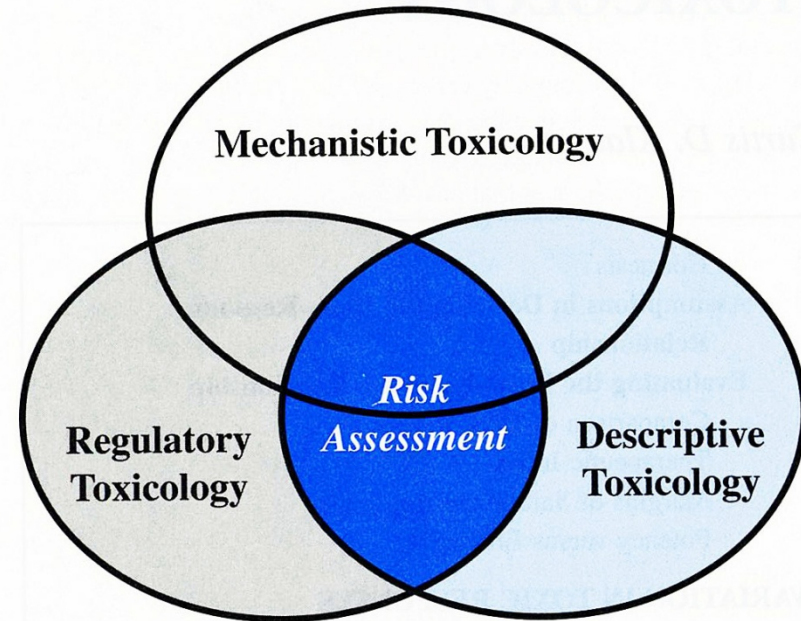


Figure 2-1. Graphical representation of the interconnections between different areas of toxicology.

Prospektivní a retrospektivní (eko)toxikologie

Prospektivní - prevence znečištění prostředí,
testování nových chemických látek
před jejich použitím

- zhodnocení míry humánního či ekologického rizika při použití nových látek a pro využívání a recyklace odpadů

Retrospektivní - hodnocení již používaných chemických látek

- hodnocení starých zátěží
- sledování varovných příznaků nežádoucích účinků (náhlé úhyny, změny biodiverzity apod.)

Typy empirických studií v eko-toxikologii

- **pozorovací studie** - pozorování objektů a měření proměnných, bez pokusného zásahu
- **experimentální studie** (intervenční studie) – studium účinků specifických pokusných zásahů, které nás zajímají. Můžeme kontrolovat prostředí pokusného zásahu, a držet na konstantní úrovni faktory, jejichž vliv nás momentálně nezajímá, ale které by mohly ovlivnit výsledky

Vysoké náklady (na čas, materiál, práci, etické aspekty) – každý experiment by měl získat co možná nejvíce informací k zodpovězení studované otázky

Zjišťování toxicity látek a materiálů

Případové a epidemiologické studie (retrospektivní i prospektivní)

- v pracovním prostředí
- v životním prostředí
- v důsledků havárií apod.
- záměrná kontrolovaná expozice dobrovolníků



Epidemiologické studie



Klinické studie

Experimentální metody (prediktivní)

- Experimenty s živými organismy – *in vivo*
- Experimenty s částmi živých organismů – *ex vivo*
- Experimenty s *in vitro* modely

Počítačové simulace a modelování – *in silico* (prediktivní)

- metody předpovědi toxicity

Experimentální toxikologie

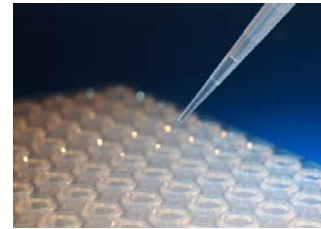


Experimenty s živými organismy – *in vivo*

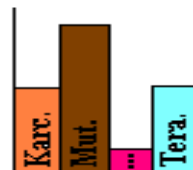
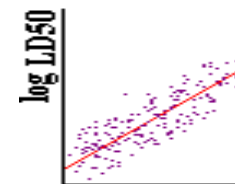
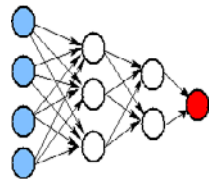
- nejčastěji používané, všechny vývojové stupně (bakterie až savci)
- standardizované metody - Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) a International Organization for Standardization (ISO)

Experimenty s částmi živých organismů – *ex vivo & in vitro*

- Izolované orgány
- Tkáňové kultury
- Buněčné organely a extrakty
- Purifikované biomakromolekuly



Minimalizace počtu experimentálních zvířat
(metody *in silico*, stanovení výpočtem na základě
matematických modelů – prediktivní toxikologie)





Biotest = proces, při němž je testovací systém (tkáň, organismus, populace apod.) exponován v přesně definovaných podmínkách různými koncentracemi zkoumané chemické látky nebo směsného či přírodního vzorku.

TOXIKOLOGIE & EXPERIMENTY NA ZVÍŘATECH

- Eticky diskutabilní - tlak odborné i laické veřejnosti
- 1959: Russel & Burch: “**3Rs principle**”
- **Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely**
aktivní podpora vývoje, validace a zavádění metod v souladu s 3R principem
- **„Cosmetic Directive“ 76/768/EEC**
platí zákaz testování kosmetických produktů a přísad na zvířatech a zákaz marketingu takových produktů v EU
- **ECVAM JRC** European Centre for Validation of Alternative Methods, Joint research Centre, EU, Ispra, Itálie
- **USA** – zákony na státní úrovni (California, New Jersey, New York)

3R - zásady práce s pokusnými zvířaty

Russel a Burch (1959)

Replacement (náhrada klasických testů)

- pokus se provádí na zvířeti jen tehdy, neznáme-li žádnou alternativu, jinak dáme přednost alternativě (tkáňové kultury atd.)
- využití databází a počítačových programů – QSAR, rešerše,
- testy „*in vitro*“ - tkáňové kultury, bílé krvinky, jaterní buňky, testy na nižších organismech (bakterie, řasy, červi, houby, kvasinky, hmyz, semena rostlin)

Reduction (snížení spotřeby laboratorních zvířat)

- racionální a efektivní využití laboratorních zvířat
 - screeningové a pilotní studie
 - vhodný statistický design studie
 - nahrazení „skupinových testů“ individuálními
- zmenšení počtu zvířat, délky pokusu, pokus se nesmí na stejném zvířeti znovu opakovat
- alternativy „klasických“ testů toxicity, použití technik „Acute toxic class“ „Up and down procedure“

Refinement (zjemnění)

- provádět testy tak, aby docházelo k co nejmenšímu utrpení zvířat
- dobrá obživa, adekvátní zacházení školenými pracovníky, prostor pro život, pokusy v anestézii, nepoužívat extrémní koncentrace (dermální testy)

Ekotoxikologické testy se používají

Pro stanovení toxicity různých druhů vod

Pro posouzení rizikovosti průmyslových odpadů a kalů

Pro základní informace při ekologických haváriích

Pro čistírny odpadních vod

Pro testování výrobků přicházejících do styku s pitnou vodou

Pro posuzování kontaminace půdy, vlivu skládek na okolní půdu a vodu

Pro kontrolu efektivity dekontaminačních procesů

Interakce stresoru a živého systému

Organismy a prostředí jsou v neustálé interakci

In vitro studie - poznání mechanismů účinku

Testy toxicity s jednotlivými organismy:

Akutní expozice - akutní toxicita - letalita

Chronická expozice - chronická toxicita (karcinogenita, reprodukční poruchy, imunotoxicita atd.)

Ekotoxikologie populační, společenstev a ekosystémů:

Polní studie: populační změny, změny společenstev a ekosystémů

Biologické systémy

Toxikokinetika:

příjem - transport - distribuce - metabolismus - eliminace

Toxikodynamika:

Biochemické interakce s receptorovými místy

Toxikologické projevy na úrovni:

Molekulární - buněčné - orgánové - organismální

Ekotoxikologie:

Efekty na úrovni populace a společenstev

DOBA EXPOZICE

- doba, po kterou je organismus vystaven účinku škodlivých látek. Škodlivý účinek se může objevit bezprostředně, nebo až po delším časovém období.
 - » **EXPOZICE AKUTNÍ** - do organismu vniklo najednou nebo v krátké době větší množství látky. Trvá krátkou dobu ve srovnání s dobou života organismu vystaveného expozici. Účinek se projeví okamžitě nebo ve velmi krátkém čase. Může mít vážné následky až smrt, ale může být i vratný.
 - » **EXPOZICE CHRONICKÁ** - dlouhodobé a opakované působení nižších dávek nebezpečných chemických látek. Opakovaná expozice po dobu delší než přibližně 10% života. Účinky mohou být patrné až za delší dobu (opožděná odpověď) a často jsou nevratné.
 - » **DLOUHODOBÁ EXPOZICE NÍZKÝM HLADINÁM** - dlouhodobé vystavení organismu malým koncentracím chemických látek.
 - » **SUBAKUTNÍ, SUBCHRONICKÁ**

Typy expozice (trvání) – u savců a lidí

Akutní	≤ 24 h	často jednorázová expozice
Subakutní	≤ 1 měsíc	opakované dávky
Subchronická	1-3 měsíce (<10% života)	opakované dávky
Chronická	> 3 měsíce (>10% života)	opakované dávky



Frekvence expozice (jednorázová/opakovaná) = v jakých časových intervalech expozice probíhá a jaká je délka jednotlivých intervalů (délky působení chemické látky a délky přestávek).

ovlivňuje toxicitu látky v závislosti na jejím osudu v organismu:

- při dostatečně dlouhých intervalech může díky metabolizaci látky na netoxické produkty nebo díky vylučování látky dojít k tomu, že každá další expozice probíhá jako akutní jednorázová expozice. Podobně v případech, kdy dochází k obnovení (reparaci) narušených biochemických pochodů, biologických struktur a tkání.
- při krátkých intervalech může absorpce látky být vyšší než rychlost její biotransformace a exkrece a docházet tak k hromadění látky v organismu. V čase se může akumulovat a redistribuovat množství látky v těle, může dojít k překonání obranných a odstraňovacích mechanismů. Kumulace vede k postupnému zvyšování koncentrace chemické látky v některých orgánech, což může vést k jejich nevratnému (ireversibilnímu) poškození.

Dávka – množství látky přijaté sledovaným biologickým objektem. Závisí na:

- * Expoziční koncentraci
- * Vlastnostech látky
- * Frekvenci expozice
- * Době trvání expozice
- * Expoziční cestě/ způsobu expozice

TOXICKÝ ÚČINEK

biologická odpověď na nepříznivé působení chemických látek na živý organismus
– může být na molekulární, buněčné, orgánové nebo organismální úrovni

= odpovídá množství chemické látky, které pronikne do organismu.

Projevy a míra toxického účinku závisí na :

1. vlastnostech toxické látky
2. charakteristikách biologického systému
3. parametrech expozice
4. na způsobu kontaktu chemické látky s organismem, bráně vstupu
5. dalších vlivech – vnější podmínky, fyzikální faktory, infekce, další stresory

Toxikokinetika - Vstup látek do organismu

(inhalace, ingesce, tělním povrchem) - distribuce k jednotlivým orgánům - interakce s cílovým orgánem

Jednobuněčné organismy:

Pasivní difuze přes membránu, selektivní vstup přes transportní systémy

Vícebuněčné organismy/řasy:

Difuze přes membránu a mezi buňkami

Terestrické rostliny:

Rozpuštěné ve vodě/půdě: vstup kořeny, listy

Plynné látky: vstup listy

Lipofilní látky: voskovou kutikulou

Toxikokinetika - Přívod látek do organismu:

živočichové:

Potrava, voda (biotransformace, mikroflóra)

Respirace:

Trachea u hmyzu, žábry, plíce

Povrch těla (větší význam u vodních organismů)

Toxikokinetika - transformace

Detoxikace, indukce biotransformačních systémů (u živočichů i rostlin)

Biotransformační schopnosti mikroflóry

Uložení xenobiotik v inertních tkáních:

Živočichové: tuk, zuby, vlasy, rohy

Rostliny: vakuoly, kůra, listy (opadání)

Exkrece:

Močí, žlučí, střevem, dýchacími cestami

Vodní živočiši: žábry, žluč

Rostliny: ukládání ve vakuolách, vylučování plyných látek

Hodnocení efektů v eko-toxikologii

Ekotoxikologie	Toxikologie	Úroveň molekulární, buněčná	Laboratoř
		Jednotlivé organismy	Laboratoř, epidemiologie
		Populační efekty	Laboratoř, kontrolované pokusy, epidemiologie
	Společenstva	Polní studie, terénní pozorování	
	Ekosystémy	Terénní pozorování	

Účinky stresorů (toxikantů)

Na molekulární a biochemické úrovni:

interakce s DNA, změny enzymových aktivit, zásahy do regulačních drah, narušení průchodnosti membrány, gradientů na membránách, porušení redox potenciálu, kompetice se substráty, indukce stresových proteinů, mitochondriální jedy, inhibice enzymů, estrogení a androgení účinek

Na úrovni organismu:

Respirace a fotosyntéza, příjem potravy, růst, reprodukce (páření, hnízdění), endokrinní změny, neurotoxicita, behaviorální změny (schopnost lovit, únik před predátory, reprodukční rituály), imunotoxicita, rozvrácení homeostázy, smrt

Neurofyziologické - porucha komunikace mezi receptory (insekticidy)

Behaviorální - změny chování, pohybu, lovu apod.,

Reprodukční - endokrinní modulátory (disruptory)

Účinky stresorů

Na úrovni populací a společenstev:

Změny počtu, změny demografie (věk, pohlaví apod.),
změny zastoupení druhů

Na úrovni ekosystémů:

Změny toků látek, energií a informací, narušení
stability, katastrofy

Vztah mezi predátorem a kořistí, hostitelem a
parazitem

Eko-toxikologické testy

Laboratorní: studium mechanismů účinku, biomarkery

Porovnání citlivosti různých druhů (indikátorové organismy)

Polní řízené studie s jednotlivými druhy (vodní, terestrické), intervenční epidemiologické studie

In situ hodnocení efektů (terénní pozorování, epidemiologické studie)