

# **E5081: Obecná ekotoxikologie**

## **cvičení**

### **úvod**

**Jiří Novák**

# Časový rozvrh

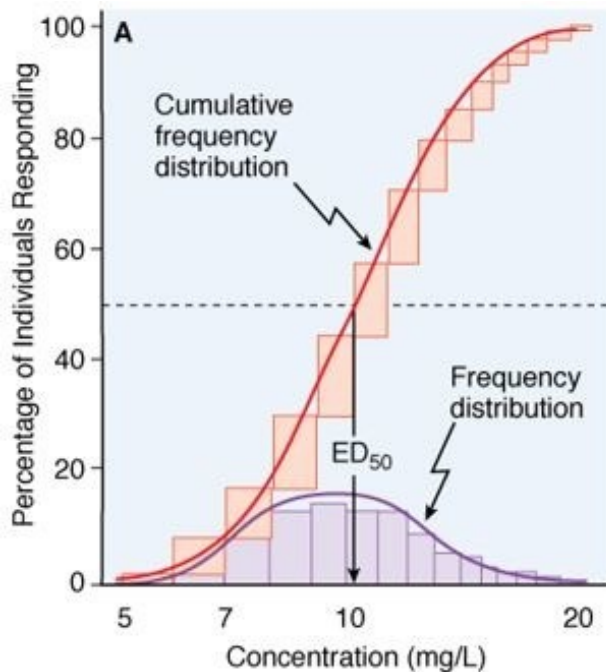
- Středa 25.10- představení úkolů k praktickým cvičením 11-12 RCX2
- Pátek 27.10. – 9:00 lab 1S22, založení testu klíčivosti semen a inhibice růstu kořene hořčice bílé
- Úterý 31.10. – 11:00 lab 1S22 vyhodnocení testu klíčivosti (počítání délek kořene)
- Ukázka přípravy testu -Dafnie
- Středa 1.11.
  - 9-10h: 1.skupina – založení testu inhibice pohyblivosti Daphnia magna lab 1S16, 1S22
  - 2.skupina – vyhodnocení dat experimentu s hořčicí učebna RCX1
  - 10-11h: 2.skupina – založení testu inhibice pohyblivosti Daphnia magna lab 1S16,1S22
  - 1.skupina – vyhodnocení dat experimentu s hořčicí učebna RCX1
- Čtvrtek 2.11. vyhodnocení experimentu s Dafnií (počítání inhib. jedinců)
- Do 16.11.2023 odevzdání protokolů

# Test s hořčicí

- Kde/kdy: 27.10. D29 lab 1S22
- Co připravit:
  - přečíst návod !!! Před biotestem bude rychlý test znalostí!
  - vzít plášť, prezůvky, nůžky, psací potřeby

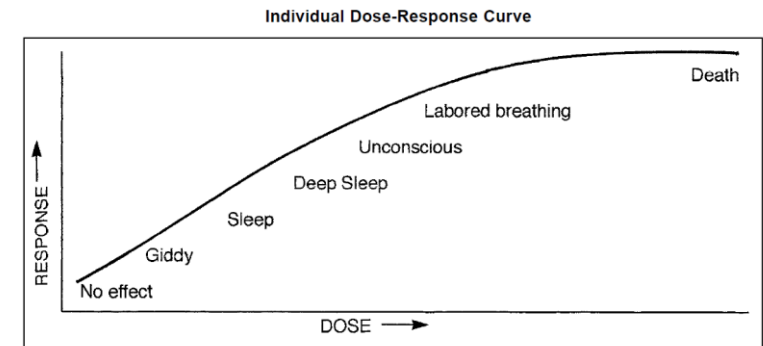
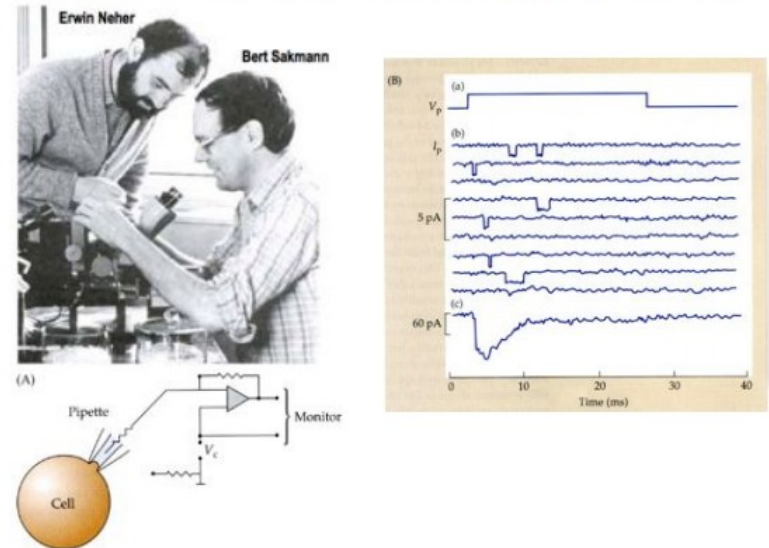
# Závislost dávka-odpověď

- Na řadě úrovní
  - Molekulární úroveň (receptory, kanály,...)
  - Organismální (odpověď ano/ne, kontinuální škála)
  - Populační



Source: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12th Edition*: [www.accessmedicine.com](http://www.accessmedicine.com)  
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

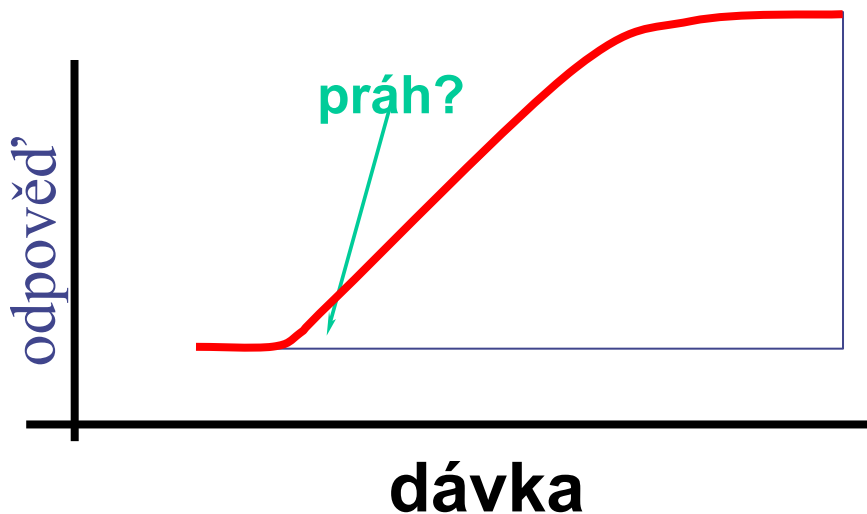
Invention of the Patch-clamp (1976) allowed single channel recordings



From: Marczewski, A.E., and Kamrin, M. *Toxicology for the citizen* (Figure 6). Institute for Environmental Toxicology, Michigan State University, reprinted with permission.

# Křivky dávka-odpověď

- Dávka vyjádřena např. mg/kg živé váhy, nebo mg/l
- Řada důležitých údajů:
  - Prahová hodnota toxicity/dávka bez toxických účinků (pro nekarcinogenní účinky)
  - Dávka vyvolávající plný efekt (např. 100% toxicitu)

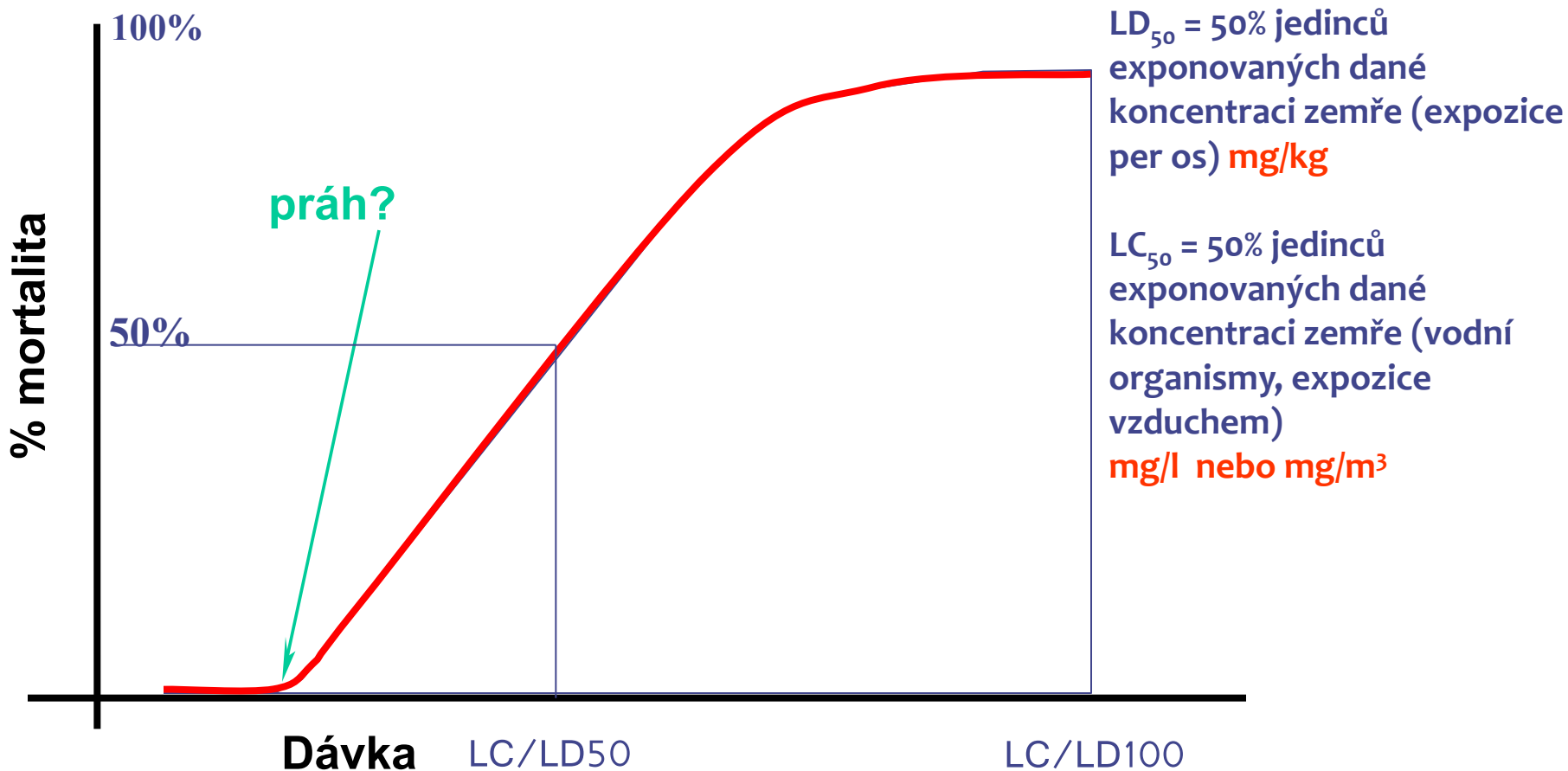


- Je možné se otrávit vodou?
- 10 g kofeinu vyvolává křeče a zvracení (1 šálek kafe ~ 150 mg kofeinu)
- NaCl ~ 250g smrtelná dávka

# Křivky dávka-odpověď

- Způsob redukce křivky na jediné číslo:
  - $LD_{50}$  (střední letální dávka; lethal dose) dávka, která zabije 50 % populace v testu
  - $LC_{50}$  (střední letální koncentrace; lethal concentration) koncentrace, která zabije 50 % populace v testu
  - $ED_{50}$  (střední efektivní dávka; effective dose) dávka, která vyvolá 50% účinek u pokusného modelu
  - $EC_{50}$  (střední efektivní koncentrace; effective concentration) koncentrace, která vyvolá 50% účinek u pokusného modelu

# Křivky dávka-odpověď

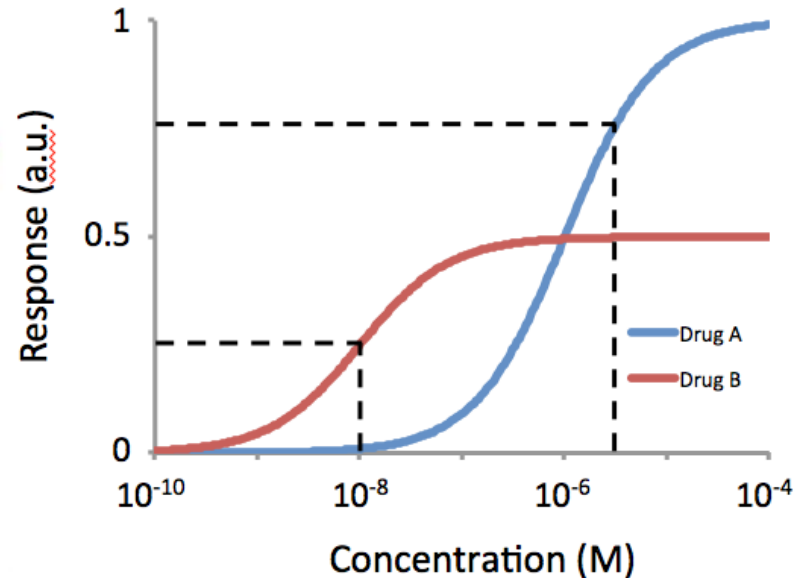
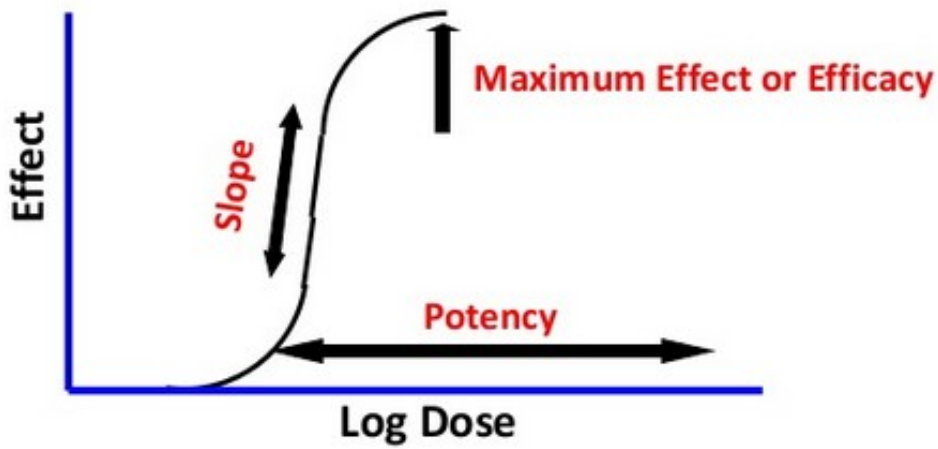


Prahová dávka – první výskyt toxicity, překonání kapacity organismu detoxikovat/opravit poškození

# Křivky dávka-odpověď

## Důležité parametry křivky

- Potence- toxicita/efektivita ve srovnání s jinými látkami
- Efektivita/maximální efekt
- Sklon křivky (slope)
- Variabilita -







# Normalizace dat

- Normalizovaná hodnota
- Škála 0-1 nebo 0-100%
- Indikuje softwaru, kde čekat horní a dolní asymptotu křivky dávka odpověď

## Normalization Formula

$$X_{\text{normalized}} = \frac{(X - X_{\text{minimum}})}{(X_{\text{maximum}} - X_{\text{minimum}})}$$



## MINMAX SCALING

Rescales feature values to between 0 and 1

Original value  $X_i$

Minimum value in feature  $\min(x)$

Maximum value in feature  $\max(x)$

Rescaled value  $X'_i$

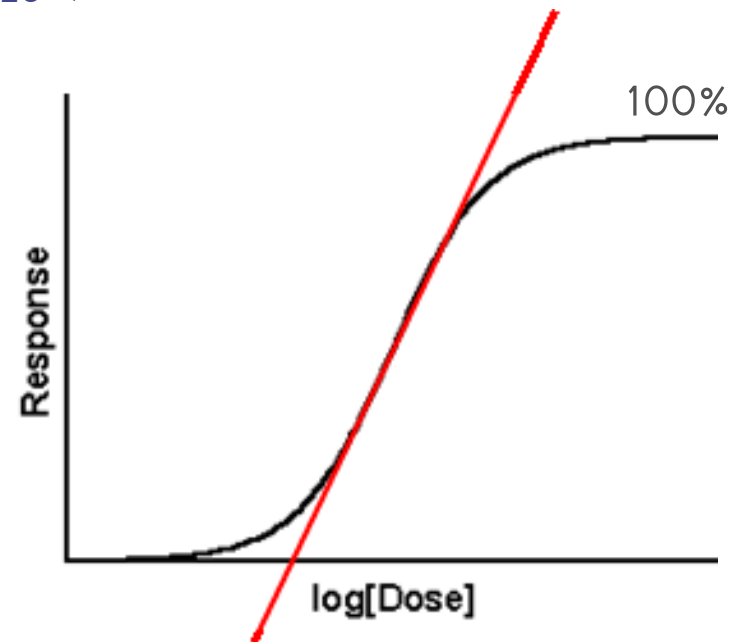
$$X'_i = \frac{X_i - \min(x)}{\max(x) - \min(x)}$$

ChrisAlbon

- $X_{\text{normalized}}$  normalizovaná hodnota
- $X$  surová data k normalizaci
- $X_{\text{minimum}}$  – průměrná data z kontroly (solventové, negativní)
- $X_{\text{maximum}}$  – průměrná hodnota dat maximální odpovědi referenční látky či

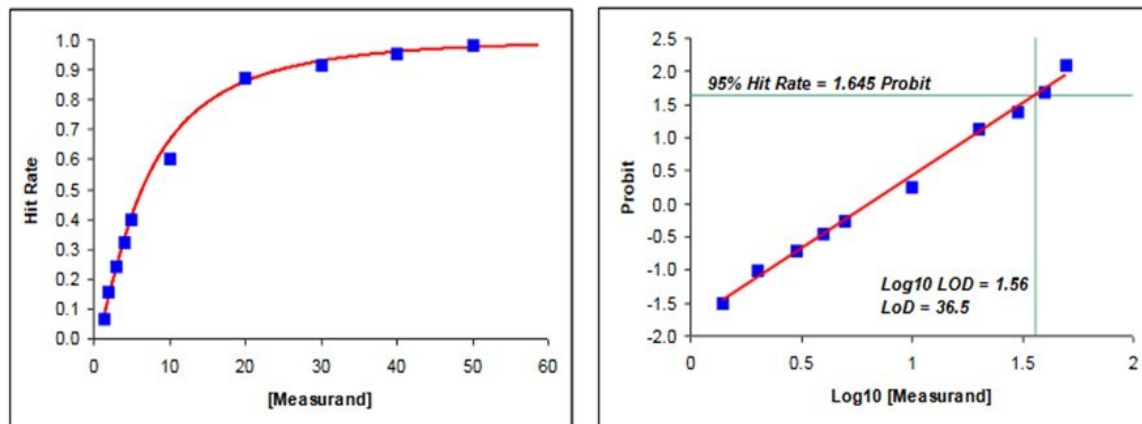
# 1. Způsob hodnocení -Lineární regrese

- Proložení exponenciálního modelu lineární částí křivky dávka-odpověď v excelu
- jednoduchý ale nepřesný
- Vhodný pro odhad  $EC_{50}$  u „hezkých“ křivek
- Nevhodný pro odhad  $EC_{10}$  či  $EC_{20}$  (oblast křivky, která se odchyluje od linearity)



## 2. Způsob hodnocení –probitová transformace

- Probitová transformace linearizuje křivku a umožňuje snazší odhad  $EC_{50}$
- jednoduchý ale ne vždy přesný – vychází z normálního rozložení citlivosti
- Vhodný pro odhad  $EC_{50}$  u „hezkých“ křivek



Abbreviation: LoD, limit of detection.

**Figure 3. Probit Analysis.** These plots illustrate hypothetical experimental results (left hand plot) an regression analysis to determine the LoD for a molecular measurement procedure by the probit approach (right hand plot).

# Tabulka pro probitovou transformaci

%	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	6,555
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

### 3. Způsob hodnocení – Nelineární regrese (logit)

- – zahrne celou křivku dávka-odpověď, pokryje i okrajové části, je zpravidla lepší/spolehlivější, hlavně pokud počítáme hodnoty blízko okrajových částí křivky ( $EC_{20}$ ,  $EC_{80}$  –kde je větší pravděpodobnost odchylky od linearity)
- Důležité je, jak podrobně je proměřená křivka dávka odpověď !
- více bodů – lepší regrese
- Je třeba specializovaný nástroj (GraphPad Prism; R; ...)
- GraphPad Prism –
  - Dostupná 30 denní zkušební verze

**Graphpad  
Prism 9**



# GraphPad Prism 5 – odhad EC50

Welcome to GraphPad Prism

GraphPad  
**PRISM**

Version 5.00 (Trial), března 12, 2007

**Available analyses**

- Linear regression
- Nonlinear regression
- Correlation (Pearson or Spearman)
- Cubic spline & LOWESS
- Smooth curve
- Area under curve

[Organization of data table](#)

**Sample data**

Start with an empty data table

Use sample data How is an XY table organized?

**Choose a graph**

Points only

**Subcolumns for replicates or error values**

**X error bar:**  Enter X error values to plot horizontal error bars

**Y:**  Enter and plot a single Y value for each point

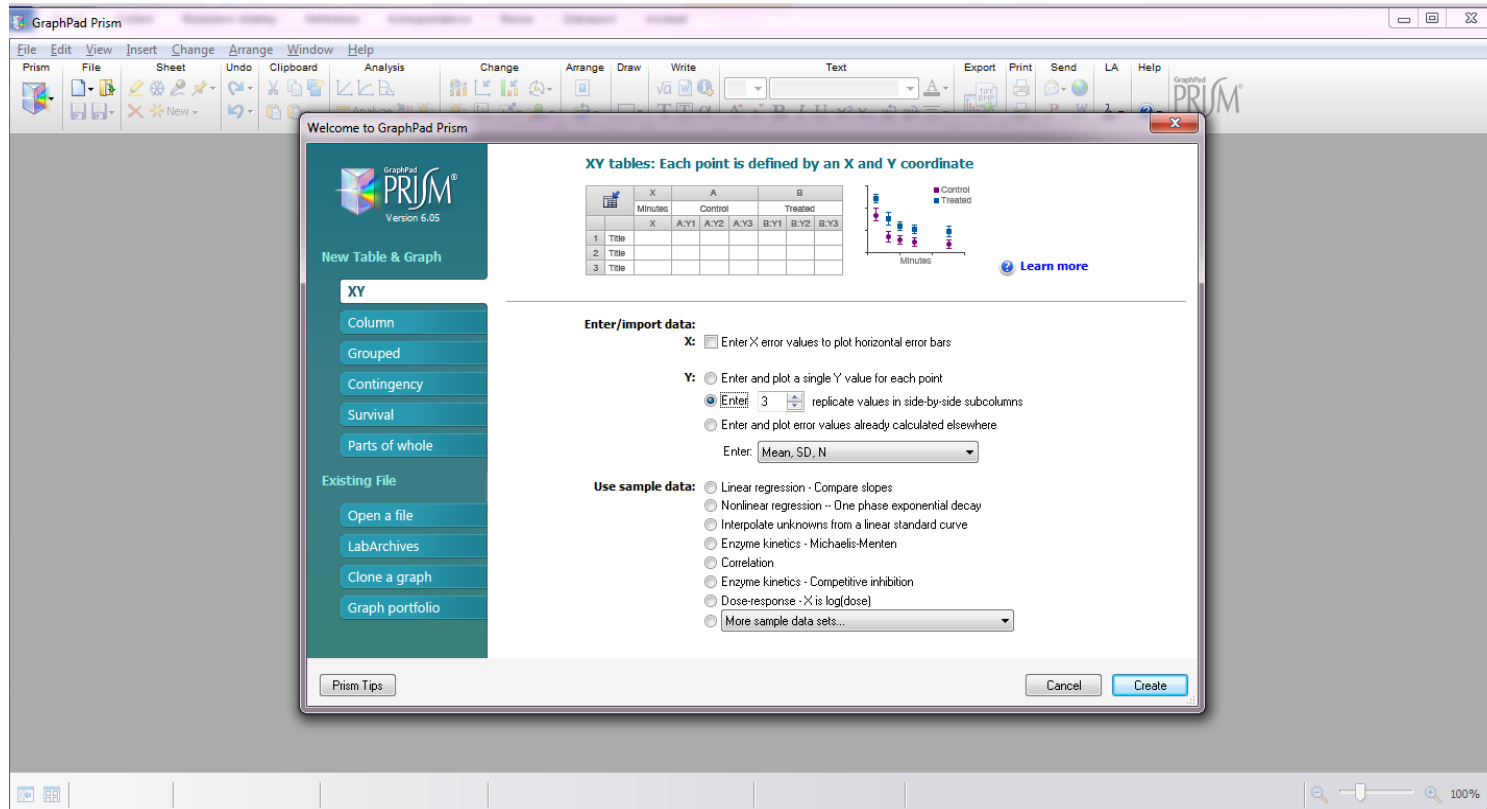
Enter  replicate values in side-by-side subcolumns,  
and plot Mean and Error SEM

Enter and plot error values already calculated elsewhere  
Enter: Mean, SD, N

Cancel Create

# GraphPad Prism – odhad EC50

- Create a new data file
- New Project File
- XY
- Y: Enter 3 replicate values ... (v případě triplikátů)
- Create





# GraphPad Prism – odhad EC50

- Vložíme data:
  - X – koncentrace testované látky/vzorku (v log formě (log C))
  - A, B,... Datové sady (opakování jsou vedle sebe (triplikáty))- vložit normalizovaná data
  - POZOR popisujte všechno, aby tomu rozuměli i ostatní

GraphPad Prism - [Project1:Data 1]

File Edit View Insert Change Arrange Window Help

Prism File Sheet Undo Clipboard Analysis Change Import Draw Write Text Exp

Table format: XY

Table format: XY		X	A			B		
		koncentrace c	datová sada 1			datová sada 2		
		X	A:Y1	A:Y2	A:Y3	B:Y1	B:Y2	B:Y3
1	triplikát 1	1	1	2	3			
2	triplikát 2	2	1	2	3			
3	triplikát 3	3	1	2	3			
4	triplikát 4	4	1	2	3			
5	Title							
6	Title							
7	Title							
8	Title							
9	Title							
10	Title							

# GraphPad Prism – odhad EC50

- Analýza:
  - XY analyses
  - Nonlinear regression (curve fit)
  - Log(agonist) vs normalized response

**1**

m - [Project1:Data 1]

View Insert Change Arrange Window Help

Sheet Undo Clipboard Analysis Analyze

Table format: XY

	X	
	koncentrace c	
	X	A:Y
1	triplikát 1	1
2	triplikát 2	2
3	triplikát 3	3
4	triplikát 4	4
5	Title	
6	Title	
7	Title	
8	Title	
9	Title	
10	Title	

**2**

Analyze Data

Built-in analysis

Which analysis?

- Transform, Normalize...
  - Transform
  - Normalize
  - Prune rows
  - Remove baseline and column
  - Transpose X and Y
- XY analyses
  - Nonlinear regression (curve fit)
  - Linear regression
  - Fit spline/LOWESS
  - Smooth, differentiate or integr.
  - Area under curve
  - Deming (Model II) linear regre
  - Column statistics
  - Row means/totals
  - Correlation
- Column analyses
- Grouped analyses
- Contingency table analyses

**3**

Parameters: Nonlinear Regression

Fit Compare Constrain Weights Initial values Range Output

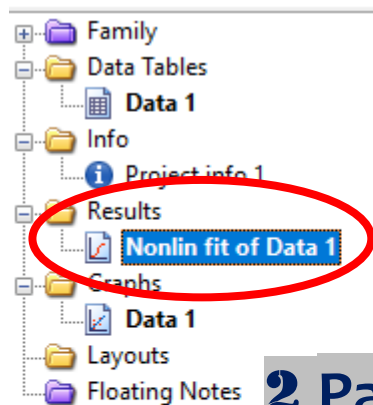
Choose an equation

- Dose-response - Stimulation
  - log(agonist) vs. response
  - log(agonist) vs. response -- Variable slope
  - log(agonist) vs. normalized response
  - log(agonist) vs. normalized response -- Variable slope
- Dose-response - Inhibition
- Dose-response - Special
- Binding - Saturation
- Binding - Competitive
- Binding - Kinetics
- Enzyme kinetics
- Exponential
- Lines
- Polynomial
- Gaussian
- Sine waves
- Classic equations from prior versions of Prism

-If X is not already the log of dose, go back and transform your data.  
-The Y values of the curve will go from 0 up to 100.

log(agonist) vs. normalized response -- Variable slope

# GraphPad Prism – odhad EC50



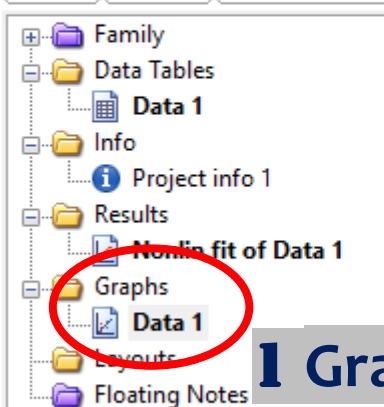
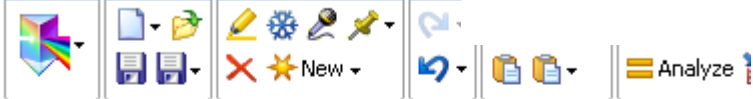
Nonlin fit		A
		datová sada 1
		Y
1	log(agonist) vs. normalized response – Var	
2	Best-fit values	
3	LOGEC50	-0.01459
4	HILLSLOPE	1.160
5	EC50	0.9670
6	CI	
7	HILLSLOPE	0.03793
8	HILLSLOPE	0.1004
9	95% Confidence Intervals	
10	LOGEC50	-0.09501 to 0.06582
11	HILLSLOPE	0.9471 to 1.373
12	EC50	0.8035 to 1.164
13	Goodness of Fit	

## 2 Parametry křivky

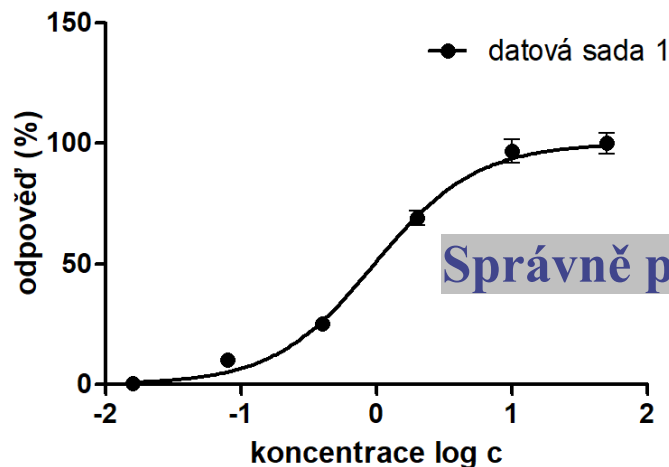
GraphPad Prism - [Project1:Data 1]

File Edit View Insert Change

Prism File Sheet Undc



## 1 Grafická data



Správně popište osy a data

# GraphPad Prism –NOEC/LOEC

Welcome to GraphPad Prism

GraphPad  
**PRISM**<sup>®</sup>

Version 5.00 (Trial), března 12, 2007

**Available analyses**

- t test (one-sample, paired and unpaired)
- Mann-Whitney
- Wilcoxon
- Column statistics (including normality tests)
- Correlation matrix
- One-way ANOVA (followed by Tukey, Dunnett, Newman-Keuls or Bonferroni post tests)
- Kruskal-Wallis
- Friedman

[Organization of data table](#)

**Sample data**

Start with an empty data table

Use sample data How is a Column data table organized?

**Choose a graph**

Selected graph: **Scatter plot, vertical**

**Graphing replicates or error bars**

Plot: Mean with SEM

Cancel Create

# GraphPad Prism –NOEC/LOEC

- Porovnání statisticky významného rozdílu mezi daty
- T-test – porovnání dvou datových sad
- ANOVA – analýza rozptylu mezi 3 a více sadami dat
- ! Data musí mít normální rozložení a homogenní rozptyl napříč daty!
- Pomocí post-hoc testu identifikujeme, mezi kterými kategoriemi jsou rozdíly

The screenshot displays the GraphPad Prism interface. The main window shows a data table with columns A through G and rows 1 through 20. The 'Analyze Data' dialog box is open, showing the 'Built-in analysis' dropdown set to 'One-way ANOVA (and nonparametric)'. The 'Which data sets?' section is checked for columns A through F. The 'Parameters: One-Way ANOVA (and Nonparametric)' dialog box is also open, showing the 'Choose test' section with 'One-way analysis of variance' selected. The 'Post test' section is set to 'Dunnett: Compare all columns vs. control column'. The 'Significant differences' section is set to '4'. The 'Output' section has 'Create a table of descriptive statistics for each column' checked.

	A	B	C	D	E	F	G
1	kontrola	c1	c2	c3	c4	c5	Tit
2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							

**Parameters: One-Way ANOVA (and Nonparametric)**

**Choose test**

You may either choose a test by checking the two option boxes, or you may choose a test by name below.

Repeated measures test. Values in each row represent matched observations.

Nonparametric test. Don't assume Gaussian distributions.

Test name: One-way analysis of variance

**Post test**

Test name: Dunnett: Compare all columns vs. control column

Significant differences: No Post Test, Tukey: Compare all pairs of columns, Newman-Keuls: Compare all pairs of columns, Bonferroni: Compare all pairs of columns, Bonferroni: Compare selected pairs of columns, **Dunnett: Compare all columns vs. control column**, Test for linear trend between mean & col. number

Control column: 4

**Significant differences**

Show 4

**Output**

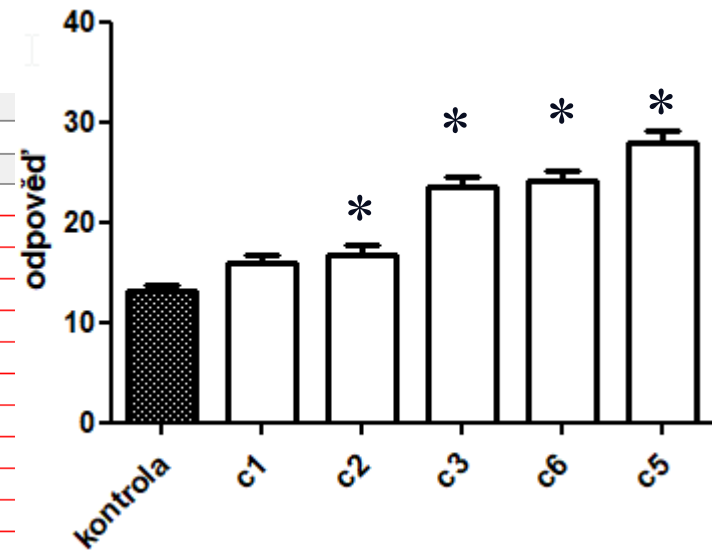
Create a table of descriptive statistics for each column

Learn Cancel OK

# GraphPad Prism –NOEC/LOEC

Porovnání statisticky významného rozdílu mezi daty

1way ANOVA Tabular results					
1	Table Analyzed	Data 1			
2					
3	One-way analysis of variance				
4	P value	P<0.0001			
5	P value summary	***			
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
7	Number of groups	6			
8	F	42.44			
9	R squared	0.9022			
10					
11	ANOVA Table	SS	df	MS	
12	Treatment (between columns)	771.4	5	154.3	
13	Residual (within columns)	83.60	23	3.635	
14	Total	855.0	28		
15					
16	Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary 95% CI of diff
17	kontrola vs c1	-2.800	2.322	No	ns -6.062 to 0.4619
18	kontrola vs c2	-3.600	2.985	Yes	* -6.862 to -0.3381
19	kontrola vs c3	-10.40	8.625	Yes	*** -13.66 to -7.138
20	kontrola vs c6	-11.00	9.123	Yes	*** -14.26 to -7.738
21	kontrola vs c5	-14.80	11.57	Yes	*** -18.26 to -11.34



koncentrace		
C1	NOEC	nejvyšší koncentrace s nevýznamným efektem
C2	LOEC	nejnižší koncentrace s významným efektem

# Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*)

## Zkouška akutní toxicity

- **Kde/kdy:** Úterý 31.10. – 1S14 Ukázka přípravy testu -Dafnie
- Středa 1.11.
  - 9-10h: 1.skupina – založení testu inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* lab 1S16
  - 10-11h: 2.skupina – založení testu inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* lab 1S16
- **Co připravit: přečíst návod !!!**

Zjistit LC50 pro vodní bezobratlé – Diuron CAS 330-54-1  
navrhnout koncentrační řadu

  - vzít plášť, přezůvky