

Environmentální toxikologie

podzim 2015/1

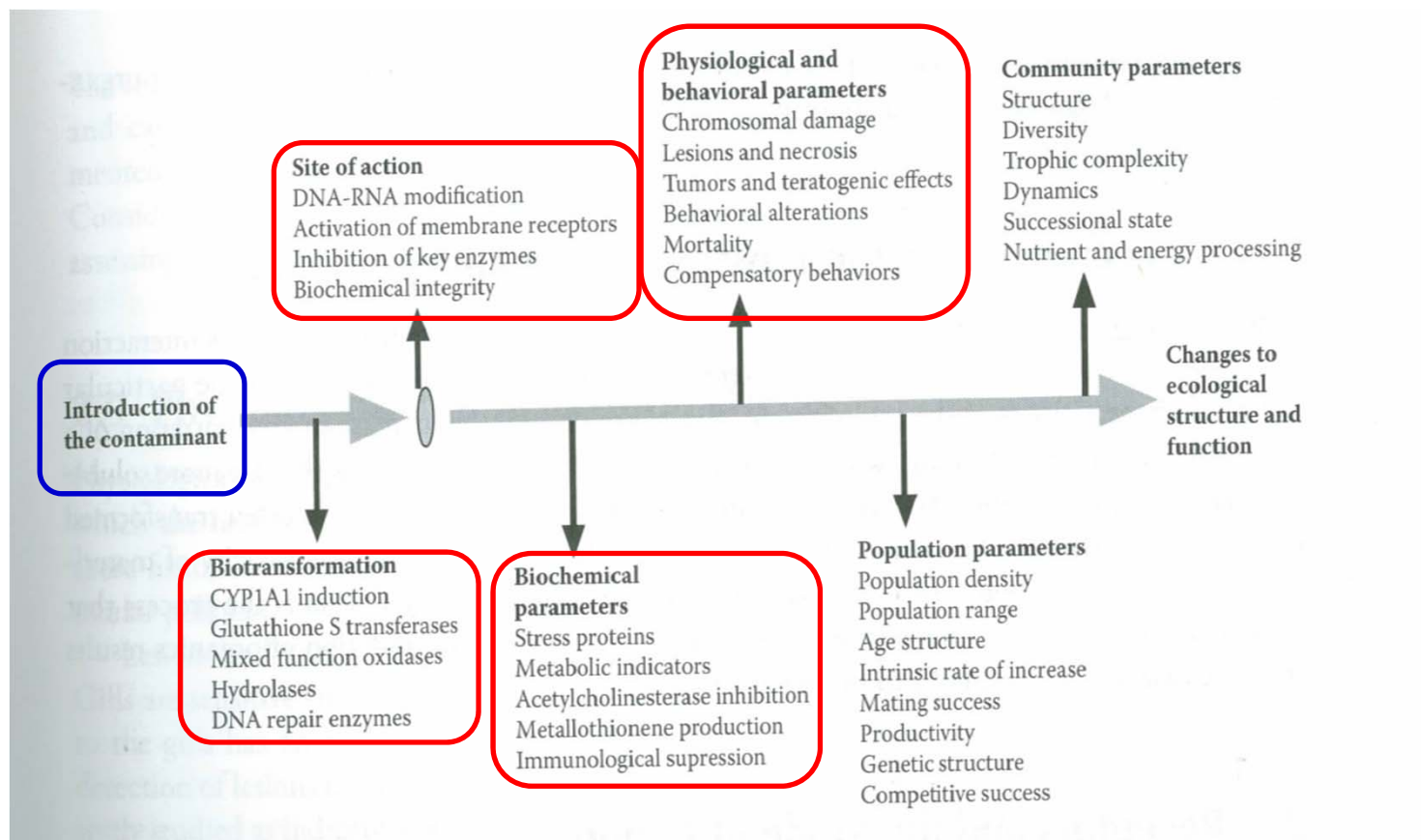
Environmentální toxikologie – moderní multidisciplinární obor

- „Environmentální toxikologie = studium dopadu účinků látek znečišťujících životní prostředí (polutantů) na strukturu a funkci ekologických systémů.“ (*W.G. Landis a kol., 2011, Introduction to Environmental Toxicology*);
- Environmentální toxikologie vs. ekotoxikologie – **environmentální toxikologie je někdy vnímána jako podobor ekotoxikologie, který je specificky zaměřený na dopad znečištění životního prostředí na lidské zdraví;**

Environmentální toxikologie – moderní multidisciplinární obor

- **Analytické chemické metody** – stanovení hladin/transportu toxických látek;
- **Akutní a chronická toxicita** – testy vycházející z klasické toxikologie i specifické metody zavedené právě pro environmentální toxikologii;
- **Metodika zaměřená na studium populací** – klasická ekologie a epidemiologie;
- **Molekulární toxikologie** – zaměření na studium molekulárních mechanismů toxicity na úrovni buněk, tkání i orgánů; úzká provázanost s obory genetiky a molekulární biologie;
- **Statistické obory a matematické modelování**; analýza rizik

Vymezení oboru – rozsah přednášek



Definice základních pojmů

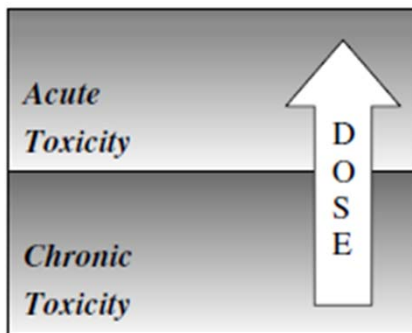
- **Toxicita** = schopnost dané látky (směsi) poškozovat organismus;
- **Toxikant** (polutant) = látka (nebo směs) schopná při environmentálně relevantních (reálných) koncentracích poškozovat organismus;
- **Toxin** = produkty organismů (bakterie, sinice, houby rostliny, živočichové);

Definice základních pojmů

- **Expozice** = doba po kterou je organismus vystaven toxikantu (-ům);
- **Akutní expozice** = krátkodobá expozice – definice je dána jejím vztahem k délce života organismu;
- Subchronická expozice
- **Chronická expozice** = dlouhodobá expozice zahrnující významnou část života či či více fází životního cyklu daného organismu);

Definice základních pojmů

- **Akutní toxické účinky** = projevují se již v průběhu akutní expozice nebo bezprostředně po jejím ukončení;
- **Chronické toxické účinky** = přetrvávají dlouhodobě nebo se mohou projevit až po delším časovém období po skončení expozice;
- **Letální účinky** = smrt organismu;
- **Subletální účinky** = významné negativní ovlivnění životních funkcí, vč. chování;

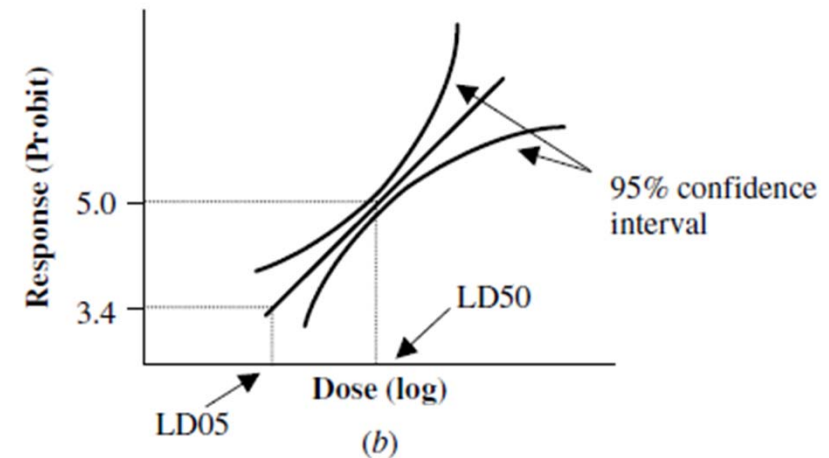
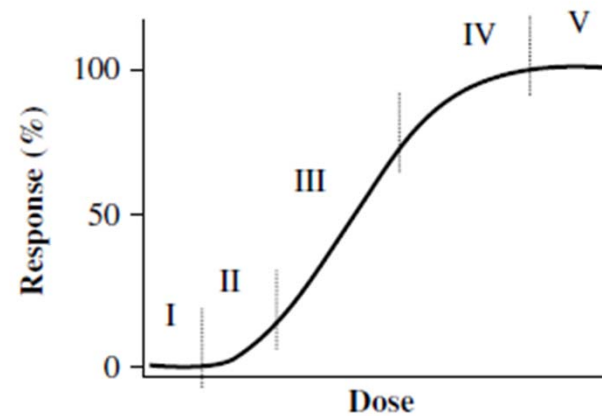
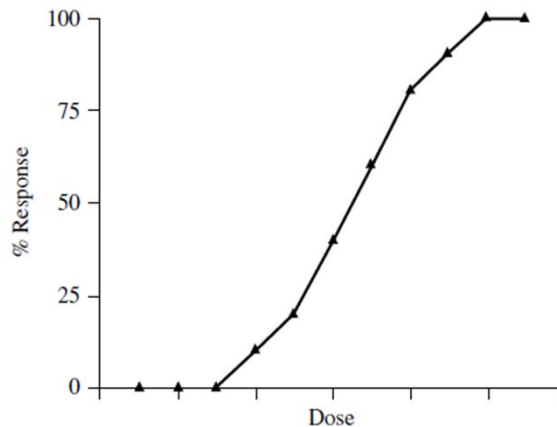


Definice základních pojmů

- Z hlediska cílového orgánu nebo tkáně u obratlovců pak rozlišujeme specifické typy toxicity: hepatotoxicita, nefrotoxicita, hemotoxicita, neurotoxicita, imunotoxicita, reprodukční toxicita;
- Teratogenita
- Endokrinní disrupce
- Genotoxicita a karcinogenita

Definice základních pojmů

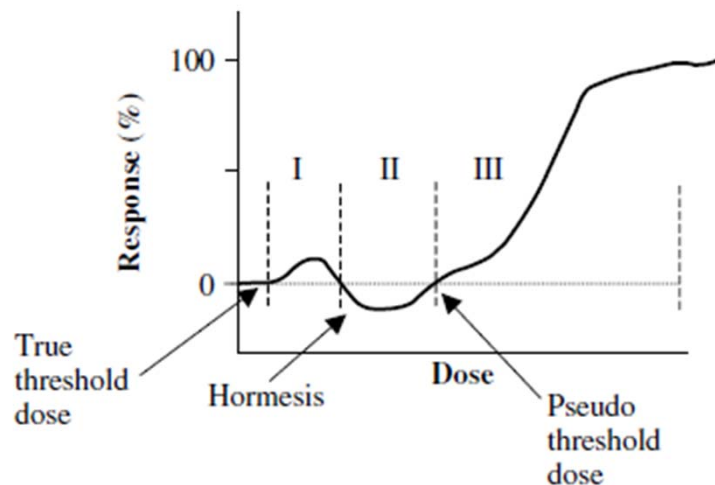
- Účinky daného toxikantu jsou dány vztahem **dávka – odpověď** (dose-response);



Hodgson a kol., 2004, A Textbook of Modern Toxicology, 3. vydání

Definice základních pojmů

- „**No threshold**“ – neexistuje žádný **práh (prahová dávka)** – jakkoliv nízká dávka toxikantu má toxické účinky;
- „**Threshold model**“ (prahový model) – organismus je schopen bez následků tolerovat určitou hladinu toxikantu;
- „**Hormesis**“ (hormeze) – nízké dávky toxikantu mohou naopak podporovat přežívání nebo mít kladné účinky na



Hodgson a kol., 2004, A Textbook of Modern Toxicology, 3. vydání

Definice základních pojmů

- no observed effect concentration (NOEC); no observed effect level (NOEL);
- no observed adverse effects level (NOAEL); no observed adverse effects concentration (NOAEC);
- lowest observed effect concentration (LOEC); lowest observed effect level (LOEL);

Typy znečištění

- **bodový zdroj** (point source) – bodové (lokální) znečištění;
- **plošný (difúzní) zdroj** (no-point source) – plošné (difuzní) znečištění;
- **základní třídy toxikantů** – anorganické plynné polutanty (oxidy síry, oxidy dusíku, ozón, oxid uhelnatý); těžké kovy (Pb, Hg, Cd, As, Cr, Zn, Cu); organické polutanty (pesticidy; produkty nedokonalého spalování; průmyslové chemikálie); anorganické toxikanty (kyanidy apod.)

Definice základních pojmů

Při posuzování toxicity a rizik spojených s expozicí je u daného typu toxikantu třeba zvažovat:

- zdroj;
- distribuce toxikantu v prostředí (vzduch-voda-půda-organismy);
- specifické vlastnosti toxikantu – biodostupnost, transformace a biodegradace;
- bioakumulace, biokoncentrace a biomagnifikace (bioobohacování);

Faktory ovlivňující toxicitu látek

- míra poškození daného organismu (toxicita) závisí na celé řadě faktorů a je dána jak **vlastnostmi toxikantu**, tak jeho koncentrací v prostředí, biodostupností, **vlastnostmi cílového organismu** (biodostupnost, bioakumulace, detoxikace, přítomnost specifických receptorů, genetická variabilita, pohlaví, stáří, výživa apod.) i dalšími **faktory prostředí**, jako jsou např. teplota prostředí, vlhkost, světlo, pH vodného prostředí, interakce mezi toxikanty apod.

Faktory ovlivňující toxicitu látek

- **hydrofilní látky** účinkují velmi rychle (rychlá distribuce uvnitř organismu) a snadno se metabolizují a vylučují;
- **hydrofóbní (lipofilní)** sloučeniny se pomaleji vstřebávají i vylučují, mají schopnost bioakumulace v tukách – nárůst koncentrace v organismu i nárůst hladin se vzrůstající hladinou trofického řetězce;
- rozpustnost dané látky je definována jako její **rozdělovací koeficient** – poměr rovnovážných koncentrací látky rozpuštěné v oktanu a ve vodě;

$$K_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{water}}$$

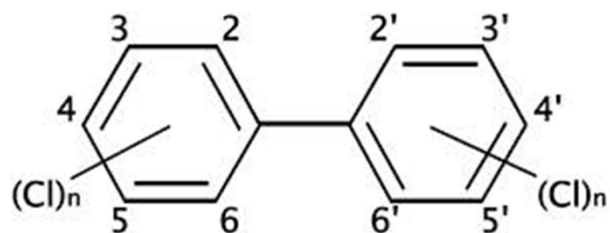
Faktory ovlivňující toxicitu látek

Toxicita dané látky závisí dále na:

- **perzistenci** dané sloučeniny;
- **koncentraci** dané sloučeniny;
- **struktura** – charakter substituentů;
- **doba** a způsob expozice;

Faktory ovlivňující toxicitu látek

Modelový příklad – polychlorované bifenyly:



Počet a poloha atomů Cl definuje jak biodegradovatelnost a stabilitu těchto látek, tak jejich biologické účinky.

Faktory ovlivňující toxicitu látek

Faktory prostředí:

- teplota – významně ovlivňuje kinetiku chemických reakcí, ale i další vlastnosti prostředí, jako např. hladinu kyslíku;
- světlo - fototoxicita;
- ve vodném prostředí hrají významnou roli další parametry kvality vody – pH, obsah solí, vápenatých iontů, huminových kyselin, apod.

Faktory ovlivňující toxicitu látek

Interakce mezi toxikanty – toxicita směsí:

- aditivita;
- synergismus a potenciace;
- antagonismus;

Faktory ovlivňující toxicitu látek

Biologické faktory:

- genetická variabilita;
- vývojové stadium;
- onemocnění;
- vliv pohlaví;
- výživa – příjem proteinů, cukrů a zejména tuků; stopové prvky a vitamíny;

Testy toxicity:

Testujeme hypotézu, že daná látka či vzorek jsou toxické:

- výběr vhodného zástupce cílové skupiny organismů;
- výběr reprezentativních druhů daného ekosystému;
- typ expozice – koncentrace/dávka, doba;
- příjem toxikantu – expoziční scénář;
- statistické zpracování a využití výsledků;
- jaká je cílová informace?

Odběr a zpracování vzorku



Odběr a zpracování vzorku



High volume vs. passive air sampler

Slobodian a kol., Environment Canada

Odběr a zpracování vzorku

Zpracování vzorku je dáno:

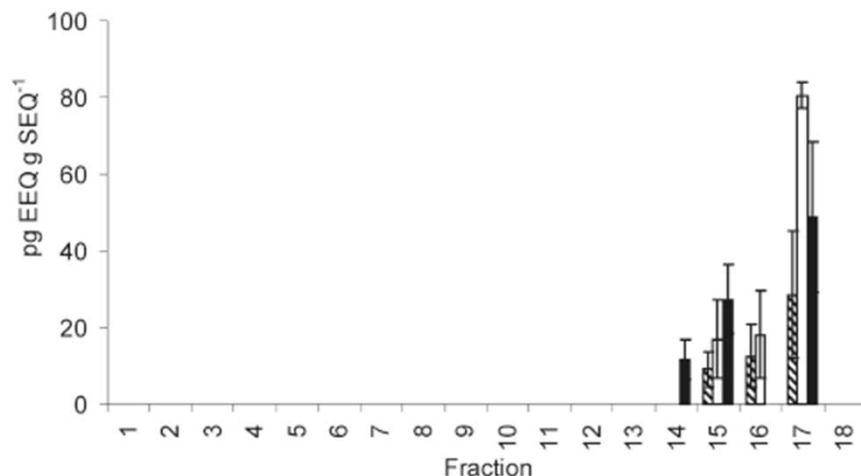
- typ testu/analýzy;
- archivace vs. využití čerstvého vzorku;
- v případě analýzy určité specifické skupiny toxikantů/polutantů - vysušení, homogenizace, extrakce a frakcionace;
- pro posuzení akutní toxicity v daném prostředí se většinou používají tzv. kontaktní testy, jen s minimální úpravou vzorku;

Odběr a zpracování vzorku

- vzorek musí buď co nejlépe **reprezentovat danou lokalitu**, nebo je odebírán s ohledem na **specifickou skupinu látek/látku**, které chceme studovat/analyzovat; typ testu/analýzy;
- vlastní úprava vzorku poté zahrnuje procesy směřující ke zlepšení chemicko-fyzikálních vlastností – usnadnění vlastního testu nebo opět s ohledem na specifickou skupinu látek/látku, která bude studována;

Odběr a zpracování vzorku

- v případě **kapalných vzorků** je upraveno pH, teplota, obsah solí, množství kyslíku; může být provedena extrakce;
- u **pevných vzorků** je důležitá především jejich homogenizace (vysušení, rozemletí, úprava velikosti částic) nebo případné izolování předpokládaných účinných látek – může zahrnovat jak výluh (destilovaná voda, deionizovaná voda se sníženým pH), tak extrakci pomocí organických rozpouštědel (methanol, aceton, dichlórmetan, DMSO, apod.);
- **extrakty vzorků mohou být dále frakcionovány** – důvodem je snaha identifikovat účinné látky – **effect-directed analysis (EDA)**;



Postupná frakcionace umožňuje vytipovat účinné toxické skupiny sloučenin.

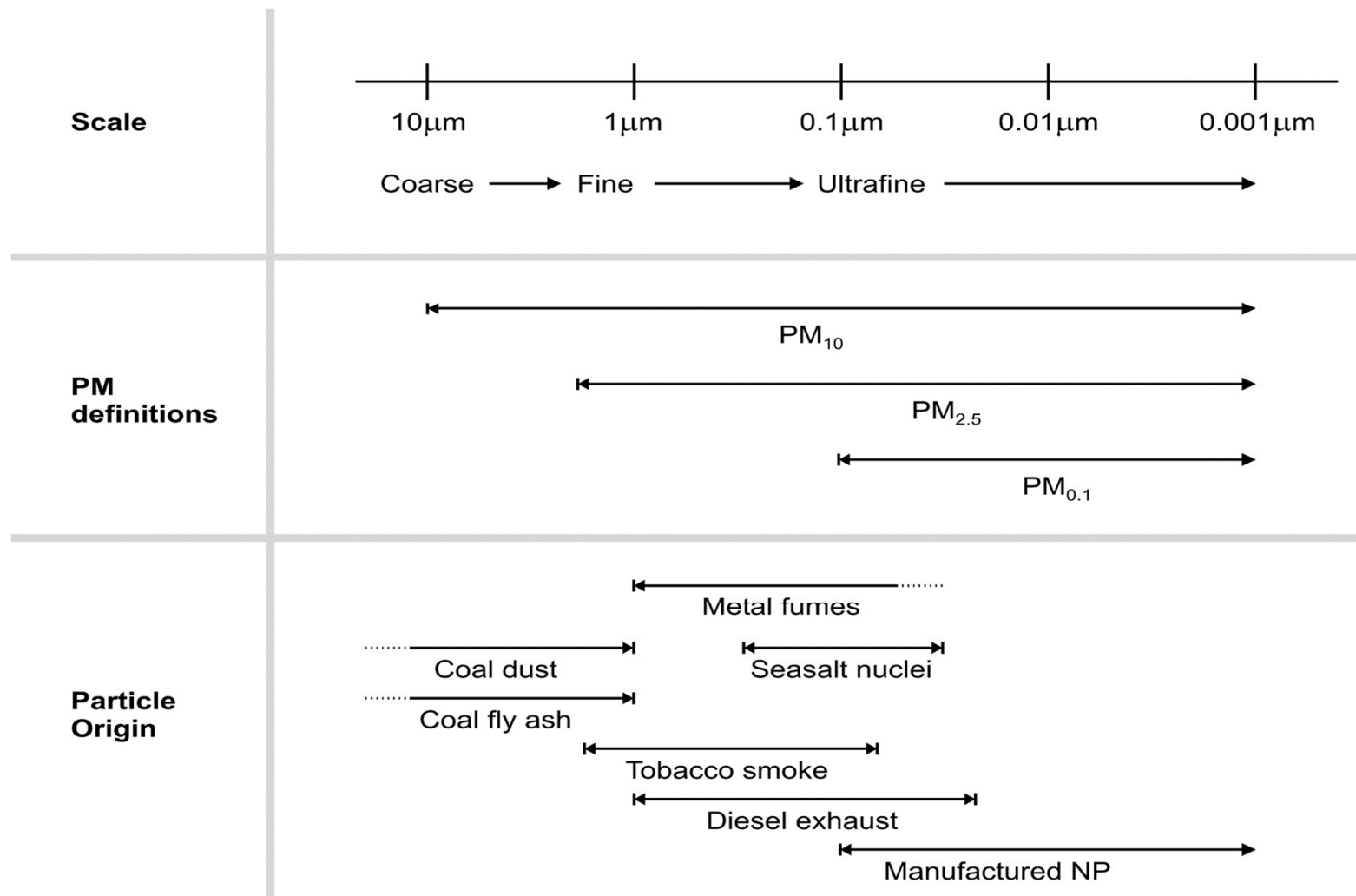
Figure 4. Estrogen receptor-mediated activity obtained for fractions 1–18 of the Přelouč (shaded), Most (white), and Bitterfeld (black) sediment extracts expressed as 17β -estradiol equivalents (EEQ) per g SEQ-1. 159 × 86 mm (600 × 600 dpi).

		Fraction																		
Endpoint	site	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Mutagenicity	P								x	x	x	x		x			x	x		
	M								x	x				x	x	x	x	x		
	B								x	x	x			x			x	x		
AhR-mediated activity	P			x	x	x	x					x					x	x		
	M							x	x			x			x		x	x		
	B						x	x	x			x					x	x		
Tumor promotion	P														x		x			
	M															x	x	x		
	B																	x		
Estrogenic activity	P															x	x	x		
	M															x	x			
	B														x	x		x		
Thyroid hormone disturbing potency	P													x	x				x	
	M														x			x		
			no/weak effect			x medium effect								strong effect						

Odběr a zpracování vzorku

- je třeba si uvědomit, že výběr testu, zpracování vzorku a expoziční scénář představují vždy **kompromis**;
- **úpravy vzorku významně mění jeho chemicko-fyzikální vlastnosti – nemusí nutně odpovídat podmínkám reálné expozice;**
- **příklad: studium toxických účinků prachových částic**

Classification of particulate matter (PM) and sources of particles.

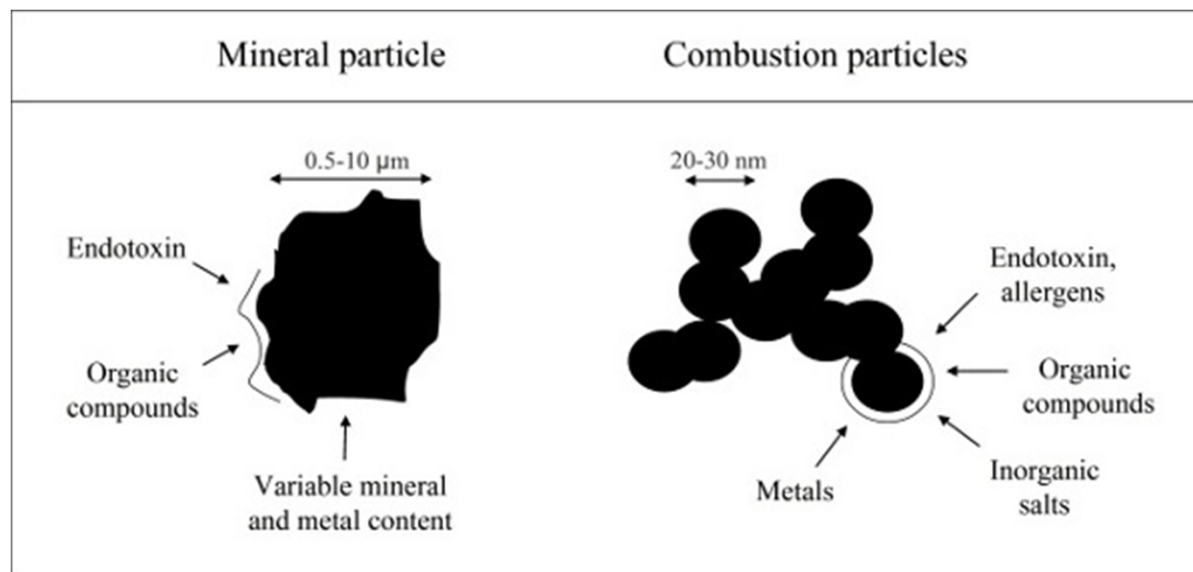


Mühlfeld C et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:L817-L829

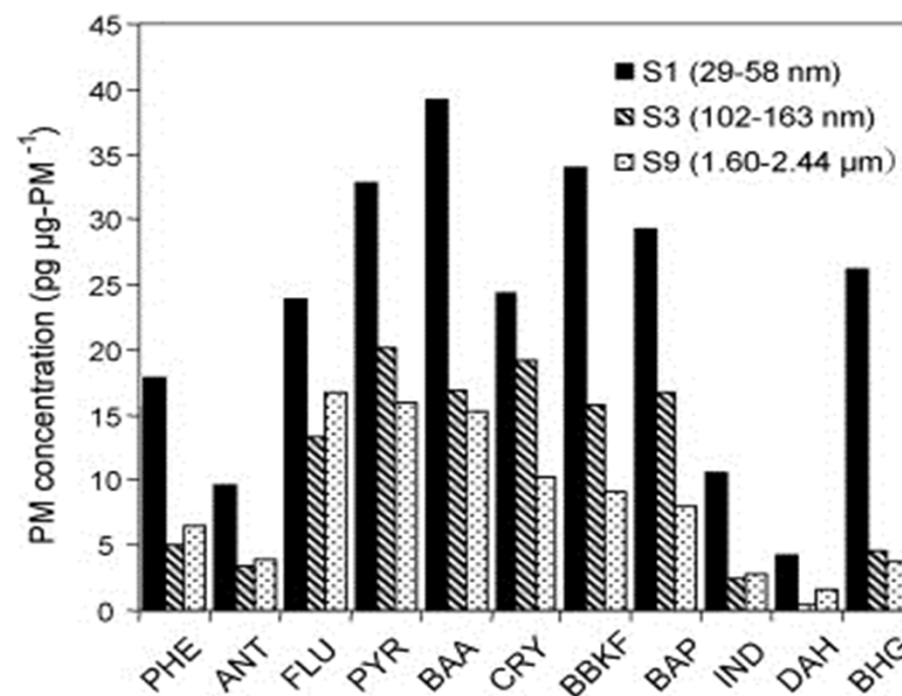
©2008 by American Physiological Society

AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY

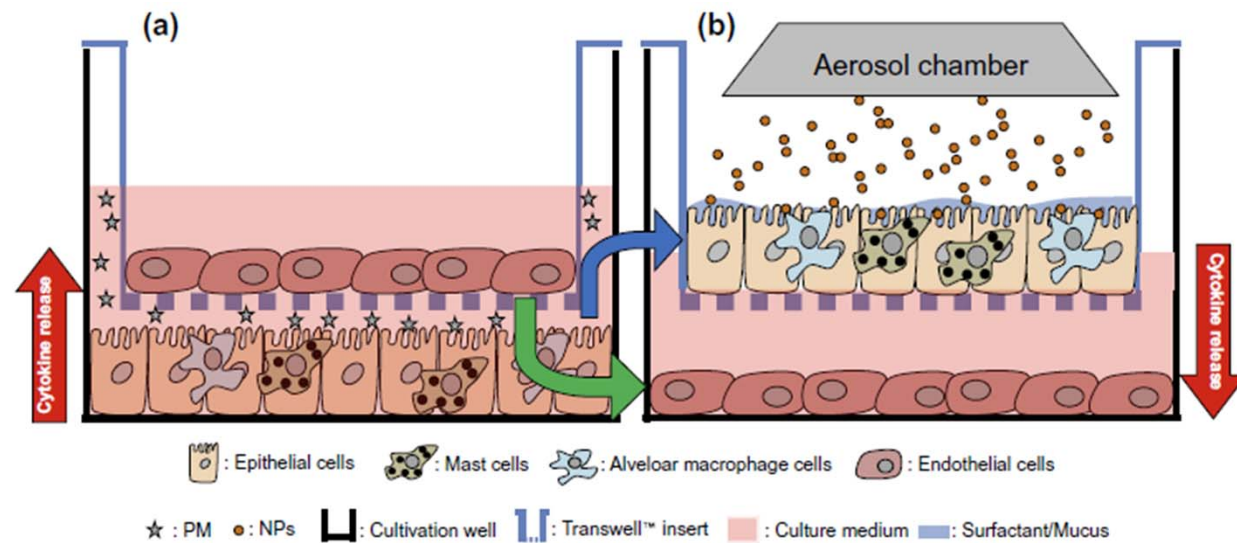
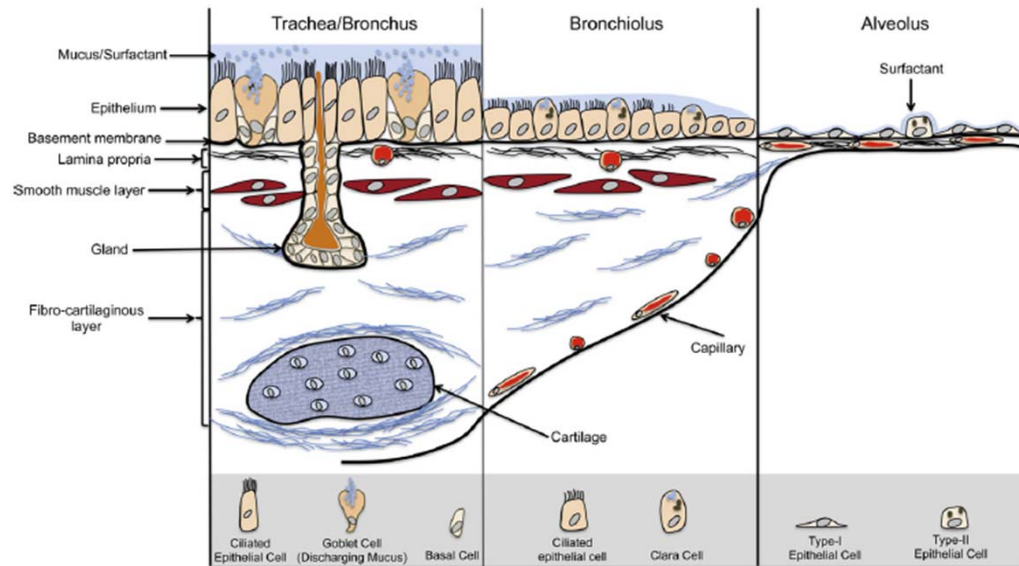
Lung Cellular and Molecular Physiology



Schwarze a kol. Importance of Components and Sources for Health Effects of Particulate Air Pollution



Ochiai a kol., J. Chromatog. A, 2007



Faktory ovlivňující testy toxicity

- **vzorkování (sampling)** – je nutné získat reprezentativní vzorek pro danou lokalitu nebo pro daný materiál;
- **skladování a úprava vzorku** – pro klasické biotesty se většinou používají vzorky čerstvé, nebo jen krátkodobě skladované při +4°C; pro sofistikovanější analýzy se vzorky dále zpracovávají okamžitě (homogenizace a extrakce) nebo se uchovávají hluboko zmrazené až do jejich přípravy;

Faktory ovlivňující testy toxicity

- při úpravách vzorků často měníme **teplotu** – to může ovlivnit např. mikrobiální aktivitu ve vzorku, mobilizaci či degradaci toxikantů, nebo odpařování látek s nízkým bodem varu;
- u některých testů se provádějí úpravy **osmotického tlaku** (např. testování na mořských nebo slanomilných organismech);
- optimalizace **pH**, zvýšení hladiny **kyslíku**;
- **homogenizace vzorku** – mletí, drcení či míchání – pozor na změny teploty;

Faktory ovlivňující testy toxicity

Standardizace:

- doba expozice;
- optimalizace teploty pro daný modelový organismus;
- dodržovat světelný režim – jak intenzitu osvětlení, tak fotoperiodu;
- optimální vlhkost;
- dostatečný objem;
- standardní kondice a stáří testovacích organismů;
- vhodná volba koncentračního rozmezí a dostatečný počet testovaných koncentrací – nezbytné pro správnou statistickou a matematickou analýzu;

Základní baterie testů toxicity

- testy mutagenity/genotoxicity;
- testy teratogenity;
- řasové testy;
- testy fytotoxicity na vyšších rostlinách;
- testy na prvocích;
- testy na rybách a korýších;
- kontaktní testy – organismy žijící v sedimentech;
- testy s organismy žijícími v půdě; terestrické testy;
- testy toxicity s terestrickými obratlovci;

Rozšířená baterie testů toxicity

- testy zahrnující různé trofické úrovně v ekosystému – producenty, konzumenty a destruenty;
- laboratorní testy vs. testy in situ;
- terénní studie;
- epidemiologické studie;
- vícedruhové testy toxicity – mikrokosmy a mesokosmy;

Standardizované vs. specifické testy zaměřené na mechanismy, konkrétní druhy organismů apod.

- stand. testy definované legislativou, a národními nebo mezinárodními regulačními orgány: ASTM (American Society for Testing and Materials), US EPA (Environmental Protection Agency), OECD (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals), EN, **ČSN**;
- specifické testy toxicity vyvíjené a používané ind. v laboratořích zaměřených např. na **studium principů toxicity na buněčné a molekulární úrovni** – aktivace obranných mechanismů buněk;

Analýza dopadů toxikantů na lidské zdraví jako náplň environmentální toxikologie - výzva

- nemůžeme testovat toxicitu na lidech – využití modelových organismů – obtížná extrapolace dat;



- limitované epidemiologické údaje, především o expozici;
- studium mechanismů toxicity individuálních toxikantů a jejich směsí na buněčné úrovni vs. dlouhodobé testy na experimentálních zvířatech – etické otázky – 3Rs;

Analýza dopadů toxikantů na lidské zdraví jako náplň environmentální toxikologie - výzva

Reduce, Refine, Replace

„Every effort should be made to Replace them with non-sentient alternatives, to Reduce to a minimum the number of animals used, and to Refine experiments which used animals so that they caused the minimum pain and distress“

William Russell, Rex Burch "The Principles of Humane Experimental Technique,, 1959.

- vývoj *in vitro* testů detekujících mechanismy toxického působení environmentálních toxikantů;
- interpretace a extrapolace těchto dat;

Analýza dopadů toxikantů na lidské zdraví jako náplň environmentální toxikologie - výzva

- přehled základních skupin environmentálních toxikantů (polutantů) z pohledu mechanismů jejich toxického působení na buněčné a molekulární úrovni vs. jejich možný dopad na lidský organismus;