

Inovace studia molekulární a buněčné biologie reg. č. CZ.1.07/2.2.00/07.0354



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Investice do rozvoje vzdělávání

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



Investice do rozvoje vzdělávání

ZTOX: Základy Toxikologie

ce do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



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



Investice do rozvoje vzdělávání

Úvod do toxikologie

Historie a základní pojmy toxikologie
Metody hodnocení toxicity

Radim Vrzal

ce do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



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



Investice do rozvoje vzdělávání

Cílem je seznámit posluchače s historií toxikologie, jejími úkoly a způsoby stanovení toxického účinku

Jed, škodlivina, dávka, odpověď

ce do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



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

Rozsah a definice toxikologie

Toxikologie – studium nepříznivých účinků jedů na lidi, zvířata a prostředí (dle Society of Toxicology, <http://www.toxicology.org/>)

Jed = Chemický, fyzikální, biologický činitel

Toxický = nežádoucí, nepříznivý

Toxicita – sekvence událostí (expozice, distribuce, metabolismus, interakce s intracelulárními molekulami)
(Toxikolog)



Studium toxicit.....PROČ?



Služba společnosti - Ochrana a Vývoj

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

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

Rozsah a definice toxikologie II.



Jed - kvantitativní pojetí

(např. vinyl chlorid – hepatotoxikant -> karcinogen -> bez efektu)

„ All things are poison and nothing is without poison, only the dose permits something not to be poisonous.“ –

Paracelsus, Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim – 1493-1541)

Klinicky užívaná léčiva – Prospěšnost vs. Toxicita

Aspirin – chronické užívání poškozuje žaludeční sliznici, letální při 0.2-0.5 g/kg

Kovy, vitamíny:

- *Cu* – součástí enzymů, inhibitor ve vysoké koncentraci
- *vitamin A* – vidění, zvracení, bolesti hlavy etc.



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

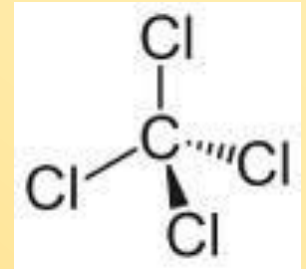
Investice do rozvoje vzdělávání

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

Rozsah a definice toxikologie III.

Jed – kvalitativní aspekt (co je toxické pro jeden druh, nemusí být toxické pro druhý)

- CCl_4 – netoxické pro drůbež, většinou hepatotoxikant



- *Atropa belladonna* (Rulík zlomocný) – netoxická pro určité druhy králíků, cca 10 bobulí pro dospělého - parasymphatolytikum



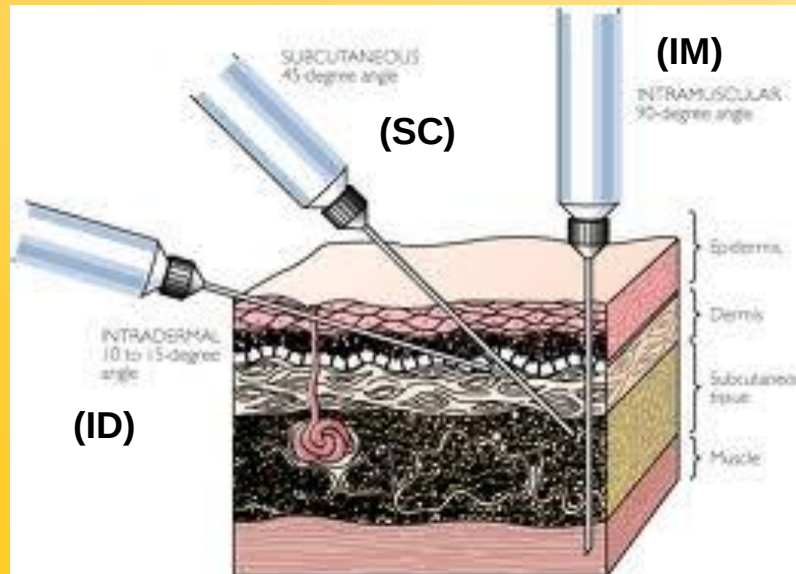
Rozsah a definice toxikologie IV.

- Toxicita - akutní, chronická, orgánově specifická**
- závislá na pohlaví, věku, složení stravy, **genetické variabilitě** (LD_{50} – závislá na rozsahu s jakou je výše uvedené kontrolováno; - výrazná mezilaboratorní variabilita)
 - **odlišnost dle cesty vstupu** - perorální (PO)

intravenosní (IV)

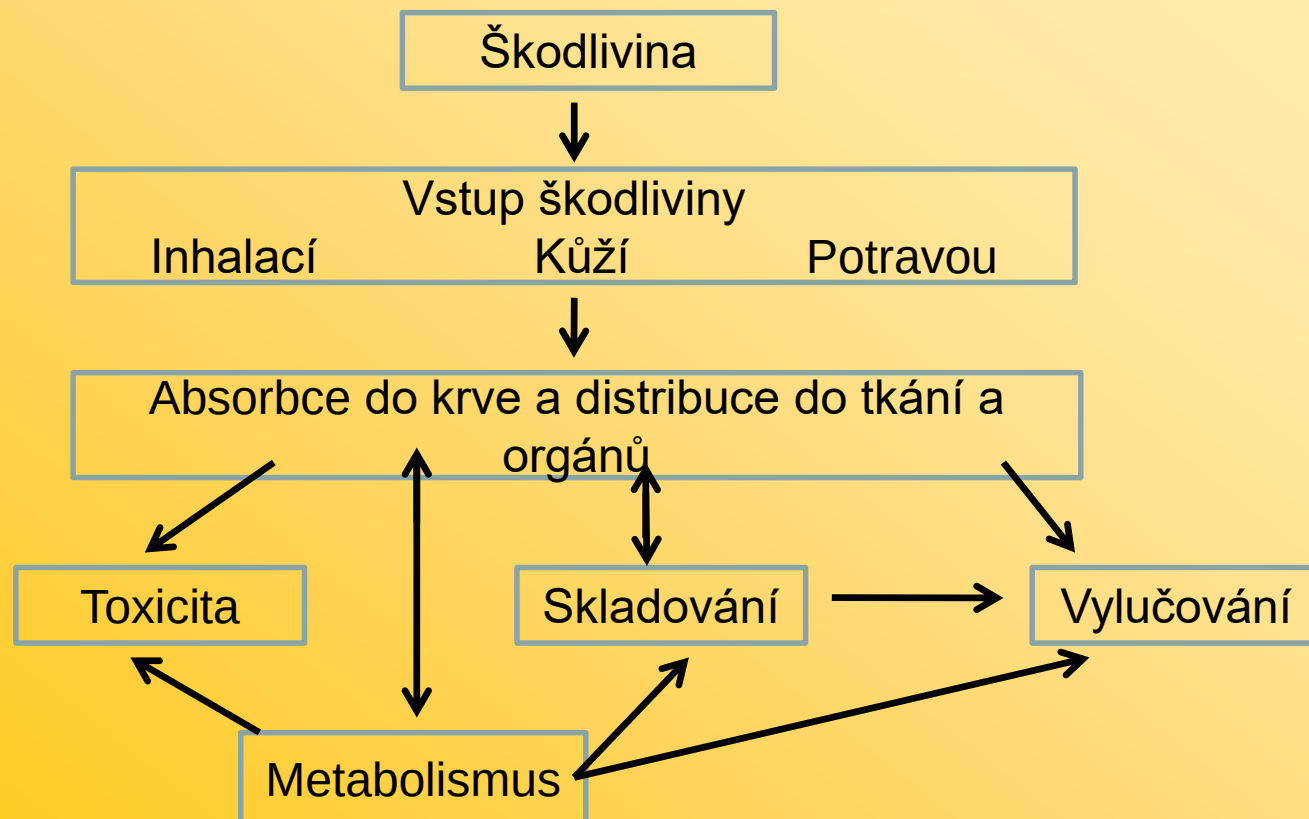


intraperitoneální (IP)



Rozsah a definice toxikologie V.

- Cesty účinku škodliviny



Některé specifické oblasti toxikologie

„Mechanismus“ účinku – Biochemická a molekulární toxikologie (enzymy, ROS, interakce s makromolekulami), Behaviorální toxikologie (vliv na chování), Nutriční toxikologie (vliv stravy), Orgánová toxikologie, Karcinogenese, Teratogenese, Mutagenese

Měření toxicit – Analytická toxikologie (identifikace škodlivin), Testování toxicit (použití živých systémů), Biomatematika a statistika (analýza dat a odhad rizika), Epidemiologie (vztah mezi expozicí a nemocí v aktuální populaci)

Aplikovaná toxikologie – Klinická toxikologie (léčba otrav), Veterinární toxikologie (léčba otrav zvířectva, možný přenos na lidi), Forenzní toxikologie (lékařsko-právní aspekty otrav), Environmentální toxikologie (pohyb škodlivin v prostředí a v potravním řetězci)

Třídy chemikálií – Potravní additiva, Průmyslové chemikálie, Produkty spalování, Návykové látky

Regulační toxikologie – Legální aspekty (FDA, EPA), Odhad rizika



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Investice do rozvoje vzdělávání

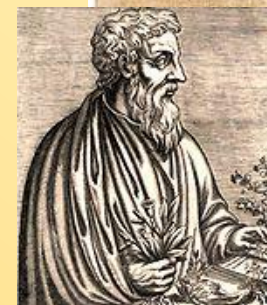
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Historie toxikologie

- Egyptský papyrus - Ebers, 1500 BC
- Hippokrates, Aristoteles – 400 – 250 BC –
zmínky o jedech



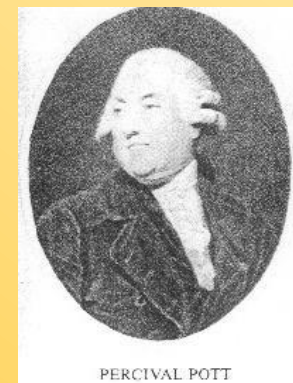
- Dioscorides – (40-90) -klasifikace jedů dle
toxických a léčebných účinků, návrh použití emetik



- Galen (130 – 200), Paracelsus (1493 – 1541) – „Otec
toxikologie“, rozpoznal závislost dávka-účinek (dose-response)

- 18. století – Ramazini – Nemoci pracujících
(Diseases of workers) – „otec nemocí z povolání“

**Percival Pott - Korelace mezi
povoláním kominíka a rakovinou šourku
– 1775**



Investice do rozvoje vzdělávání

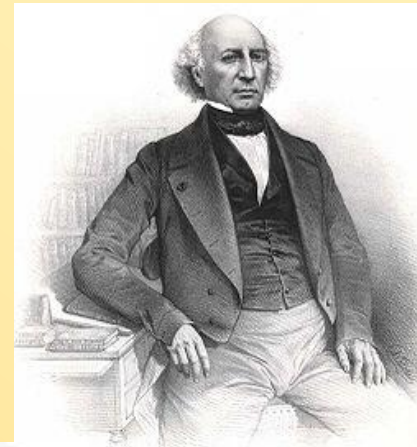


INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

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

Historie toxikologie II.

- **Orfila** - „Otec moderní toxikologie“,
1815 - první publikace věnovaná
exklusivně toxikologii



- **Claude Bernard** (1813-1878) –
mechanismus působení kurare



- **1962 – The Silent Spring** – Rachel Carson – iniciace éry
environmentální toxikologie, katalyzátor ke vzniku US EPA



- **Až doposud** – vývoj z deskriptivní formy
na formu s rozpoznáním mechanismu účinku

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

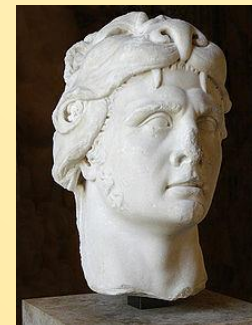


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

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

Historicky známé otravy

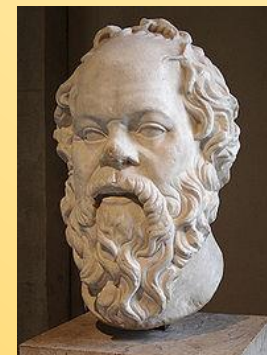


Král Mithridates Eupator (1. století před Kristem)

- imunita vůči jedům = mithridatismus.
- Princip návyku: zvýšení obrany při resorpci, zvýšení kapacity detoxifikačních mechanismů, zabudování jedu do biochemických procesů

Sokrates

- Donucen k sebevraždě, vypil číši bolehlavu
- Bolehlav plamatý (*Conium maculatum*), obrna svalstva a smrt zadušením

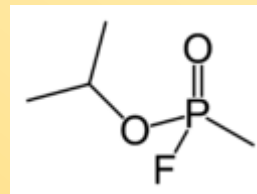
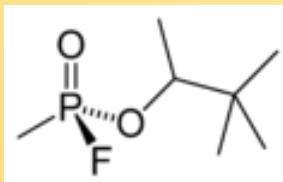


Středověk - traviči

- Kateřina Medicejská (manželka francouzského krále Jindřicha II.) a Lukrezia Borgia (dcera papeže Alexandra VI.)
- Itálie, Giulia Tofana, kosmetika s obsahem arsenu ("Aqua Tofana")

Historicky známé otravy II.

První světová válka – použití bojových plynů (soman, sarin)



Druhá světová válka - nacističtí důstojníci – kyanid

Minamata Disease (Japonsko, 1950 – 1960)
– otrava methylrtutí



Itai-Itai Disease (ouch-ouch disease)
– 50. léta 20. století – otrava kadmíem

Investice do rozvoje vzdělávání



INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

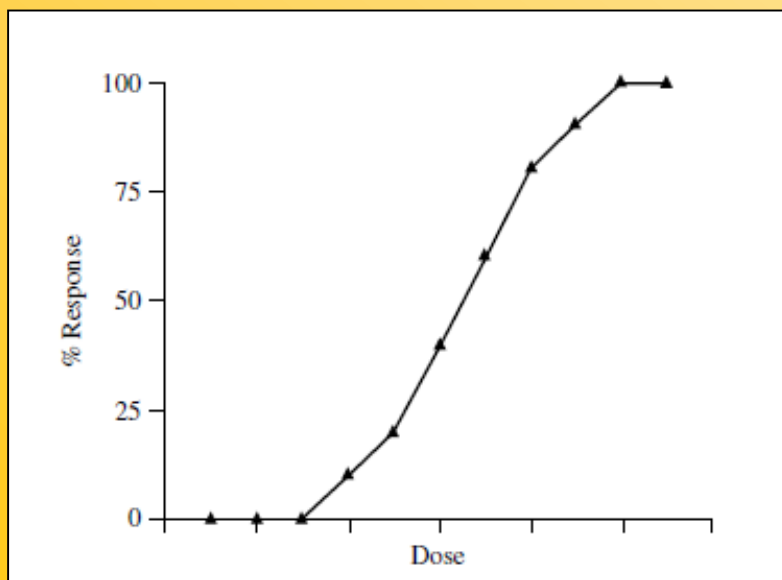
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Vztah dávka – odpověď

Tento vztah (dose-response) existuje, pokud změny v dávce produkují konsistentní nenáhodné změny v účinku

Toxicita – chemikálie vs jedinec

Paracelsus – vztah dávka – odpověď (dose-response)



prahová dávka – pod ní není pozorovatelný účinek

➔ **Existence NOEL** (no observed effect level) - bezpečnost potravních additiv, pesticidů

Neplatí pro karcinogeny

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



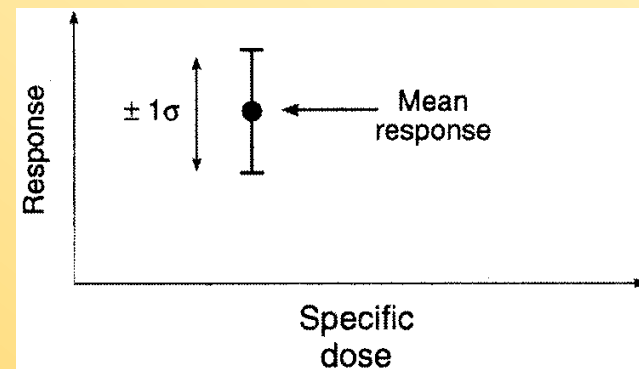
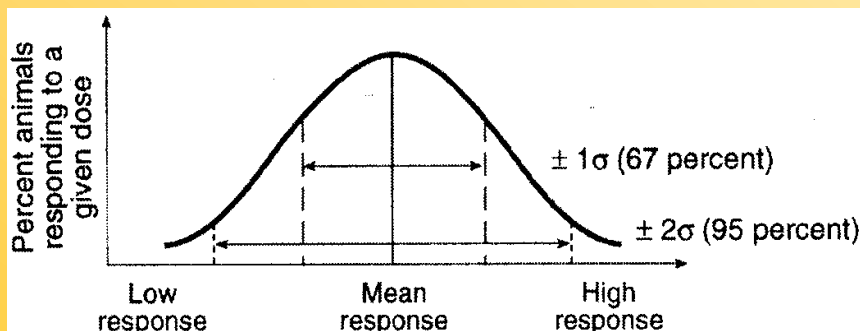
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

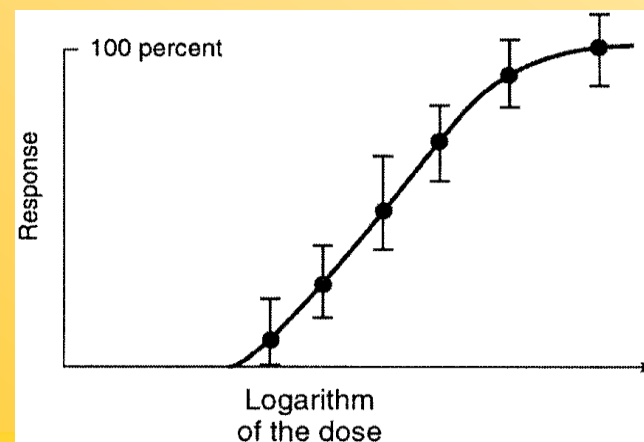
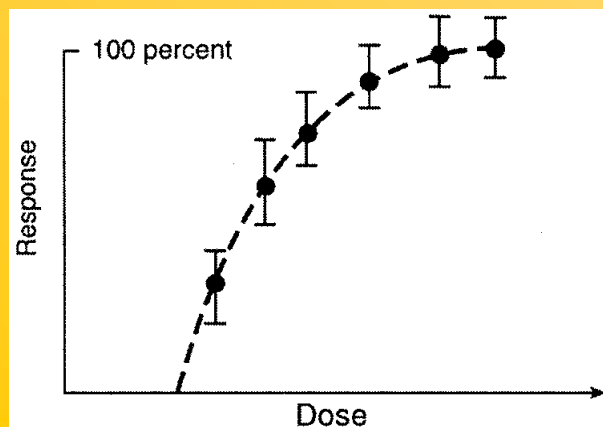
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Vztah dávka – odpověď II.

Variace mezi jedinci jednoho druhu → **Gausovské rozdělení** – četnost odpovědi organismu na velikosti odpovědi pro konkrétní dávku



Častěji se používá kumulativní dose-response vztah – zjemnění s použitím logaritmu dávky



Investice do rozvoje vzdělávání



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

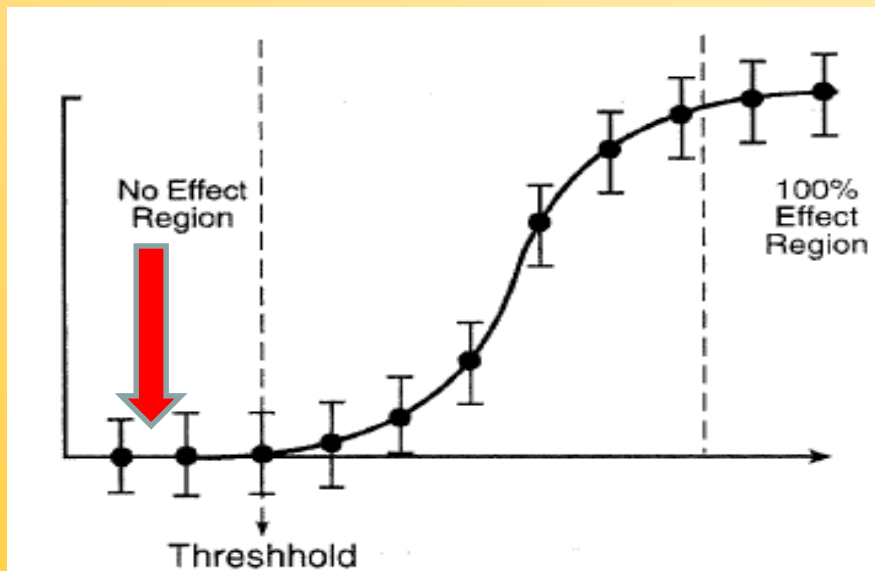


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

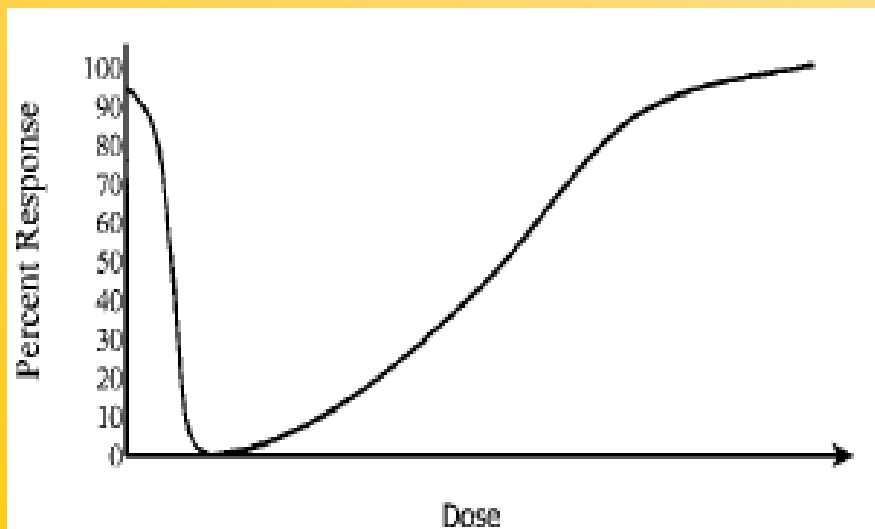
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Vztah dávka – odpověď III.



**Bezpečná oblast
(NOEL)**

**Toxikologové
hledají NOEL.**



**U-tvar typický
pro vitaminy,
esenciální prvky.**

Investice do rozvoje vzdělávání

esf
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

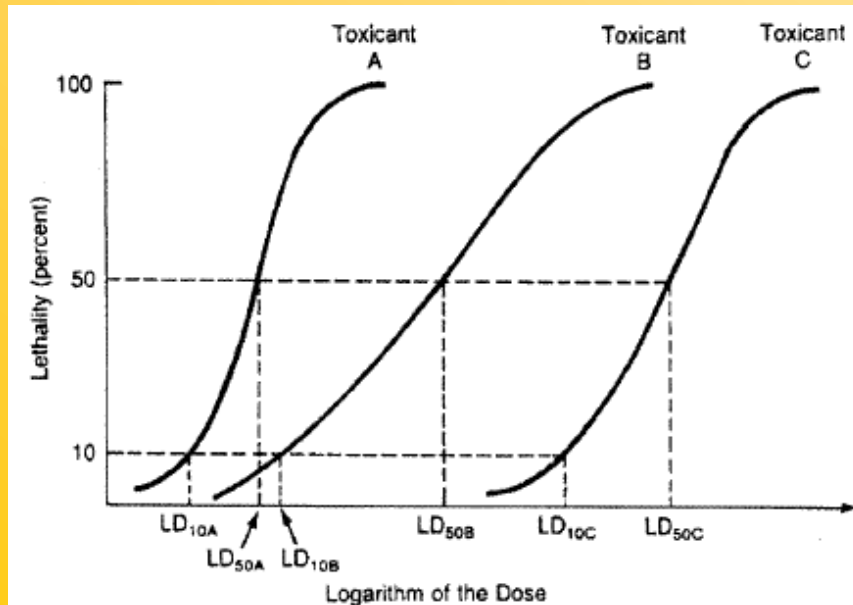
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Vztah dávka – odpověď IV.

Smrtelné/letální dávky – LD, měřenou veličinou je úmrtnost

Toxické dávky – TD, vážný nežádoucí účinek jiný než smrt

Příznakové (sentinel) dávky – SD, žádný či minimální nepříznivý účinek (bolesti hlavy, rozespalost) slouží jako varování



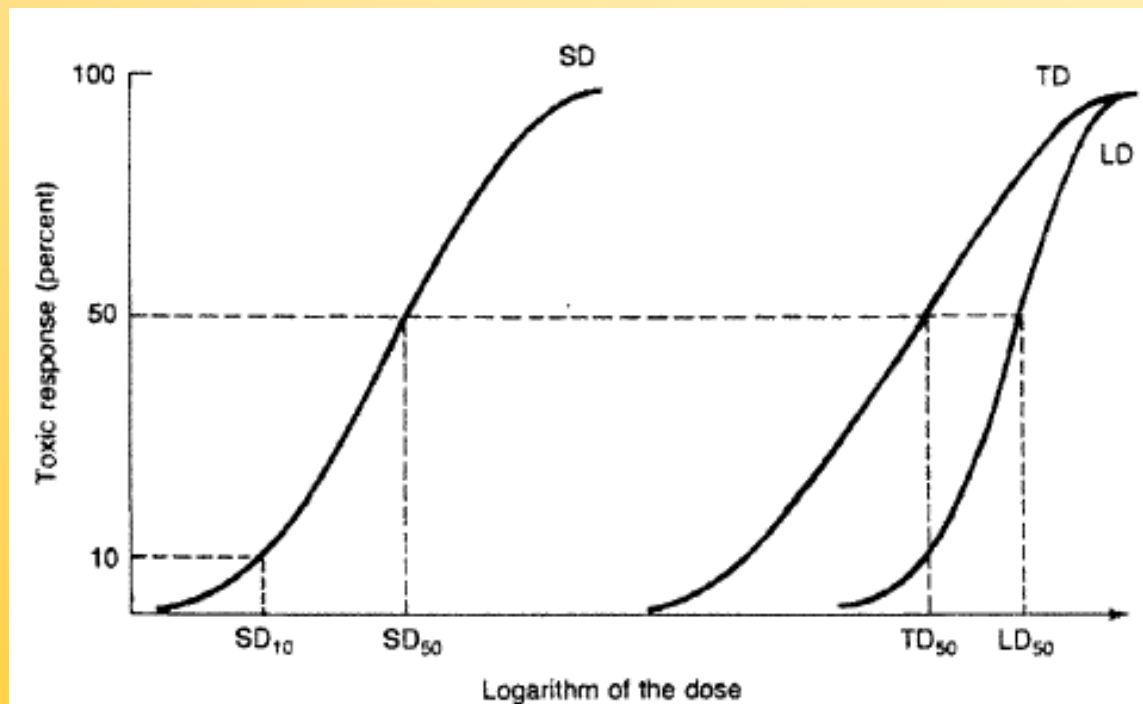
Srovnání toxického potenciálu látek.

Neznámá látka vykazuje podobnost s alespoň jednou ze studovaných → relativní risk

Předpoklad je že lidé jsou tak citliví jako testovaný druh

Vztah dávka – odpověď V.

Relativní klasifikační systém ke kategorizaci akutní toxicity.



„rozmezí bezpečnosti“ (margin of safety)

Therapeutic Index/Margin of safety = TD_{50}/SD_{50}

-čím větší, tím bezpečnější

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

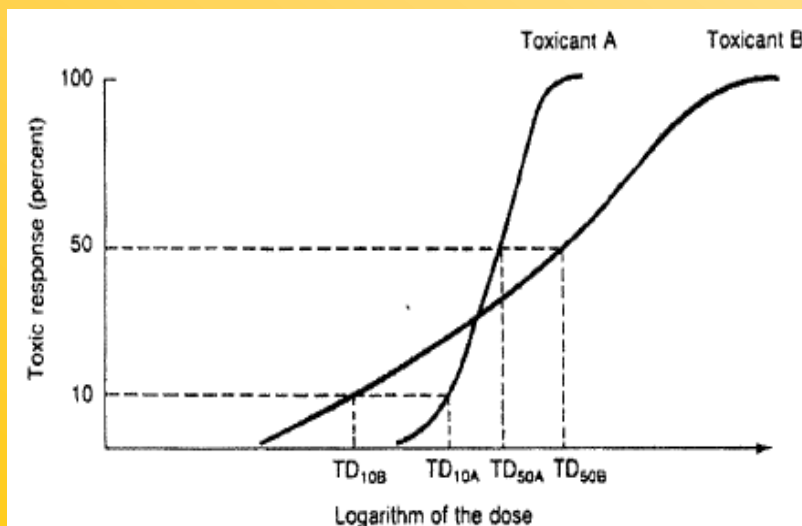
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Vztah dávka – odpověď VI.

Limitace - z jedné hodnoty nelze určit tvar (A vs. B); A horší kvůli strmější závislosti, B nižší prahovou hodnotu

- akutní toxicita často nemusí přesně odrážet chronickou (benzen vs. toluen)

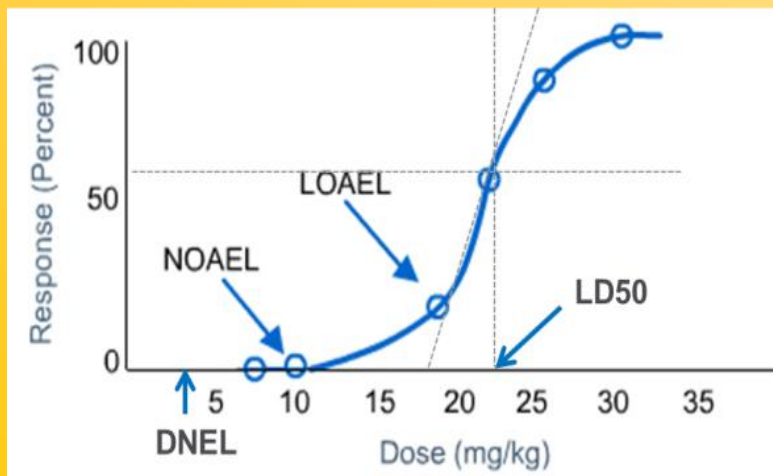
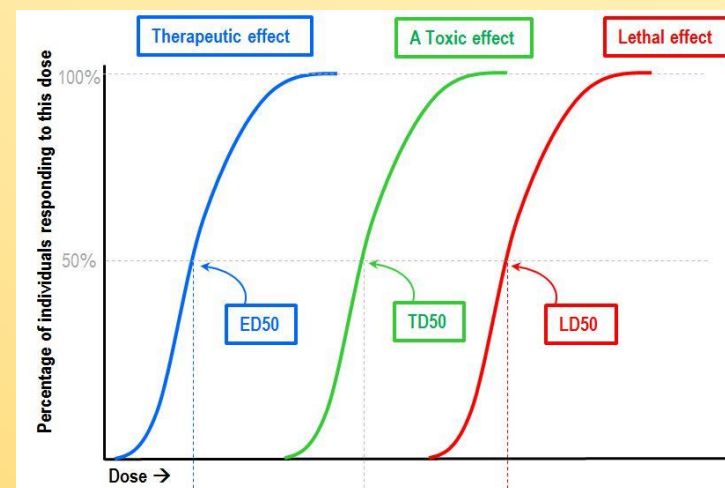
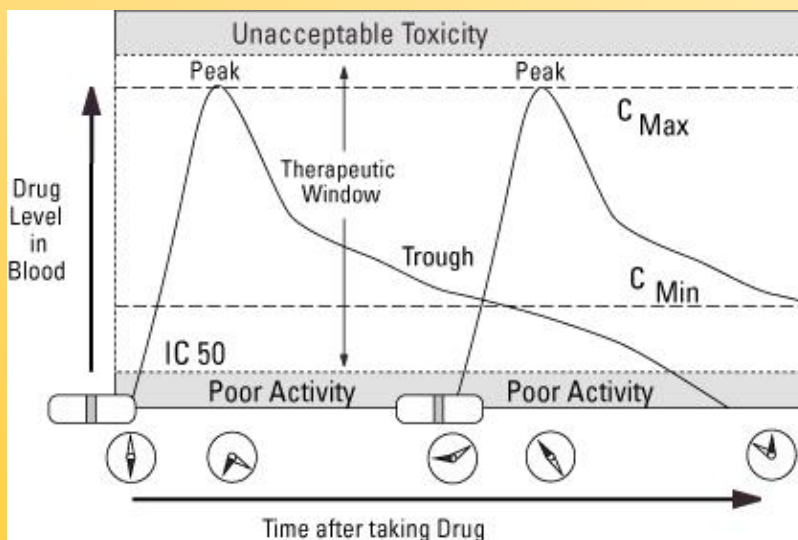
- málo informací na to která zvířecí data nejlépe vyhovují pro srovnání s člověkem



Oral LD₅₀ Data for Chloroform

Species	LD ₅₀ (mg/kg/day)
Rabbit (Dutch Belted)	100 ^a
Mouse (CD-1)	250
Human	602
Rat (Sprague-Dawley)	908
Mouse (Swiss)	1100
Mouse (ICR-Swiss)	1400 ^b
Rat (Wistar)	2180

Vztah dávka – odpověď VII.



LD50
LOAEL
NOAEL (NOEL)
DNEL

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

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

Vztah dávka – odpověď VII.

Chloroform Toxicity: Inhalation Studies

Species	Toxicity of Interest	Duration of Exposure	Exposure/Dose (ppm)
Mouse	No effect—liver	6 h/day for 7 days	3
Mouse	Mild liver damage	6 h/day for 7 days	10
Mouse	Severe liver damage	6 h/day for 7 days	100
Mouse	No effect—kidneys	6 h/day for 7 days	100
Mouse	Mild kidney injury	6 h/day for 7 days	300
Mouse	No effect—respiratory	6 h/day for 7 days	300
Rat	No effect—respiratory	6 h/day for 7 days	3
Rat	Nasal injury	6 h/day for 7 days	10
Rat	No effect—kidneys	6 h/day for 7 days	10
Rat	Mild kidney injury	6 h/day for 7 days	30
Rat	No effect—liver	6 h/day for 7 days	100
Rat	Mild liver damage	6 h/day for 7 days	300

Bez znalosti toxických účinků → chybný závěr pro posouzení vlivu u jiného druhu
(např. 100 ppm poškozuje játra myši, ale ne potkana → tato koncentrace je bezpečná !!!!!)

→ dose-response je závislá na podmínkách testu

→ nejistota tkvící v jakékoliv extrapolaci dat ze zvířat pro účely bezpečných limitů pro lidi je závislá na šíři prováděných toxických studií a počtu rozdílných druhů testovaných ve studii

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

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

Faktory ovlivňující závislost dávka-odpověď

- **Cesta vstupu** = rychlost a rozsah absorpce, rozpustnost ve vodě, tucích; může změnit orgánovou toxicitu dle podání – Intravenosně vs. Perorálně –(first-pass effect)
- **Pohlaví** – více tuku u žen než u mužů, vyšší metabolická kapacita samců potkanů než samic (strychnin je méně toxický pro samce, PerOs)
- **Věk** – starší lidé mají rozdíly v obsahu svalstva a metabolické kapacitě oproti dětem
- **Účinek chemické interakce** – směs může měnit odpověď (synergismus, potenciace, antagonismus)

Effect	Relative Toxicity (hypothetical)	Example
Additive	$2 + 3 = 5$	Organophosphate pesticides
Synergistic	$2 + 3 = 20$	Cigarette smoking + asbestos
Potentiation	$2 + 0 = 10$	Alcohol + carbon tetrachloride
Antagonism	$6 + 6 = 8$ or $5 + (-5) = 0$ or $10 + 0 = 2$	Toluene + benzene or caffeine + alcohol or BAL + mercury

Klasifikace látek (?škodlivin?)

- **Obtížná klasifikace** z důvodů struktury či mechanismů účinku
- Některé jsou přírodní látky, jiné syntetické sloučeniny, vedlejší produkty průmyslu
- Kategorizace dle:
 - expozice (**exposure classes**) — škodliviny v potravě, vodě, půdě, vzduchu



- užití (**use classes**) — potravní doplňky, návykové látky, léky, rozpouštědla, kosmetiku



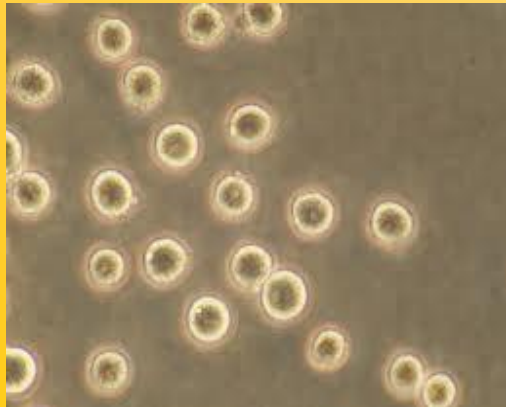
Metody hodnocení toxicit

Buněčné kultury

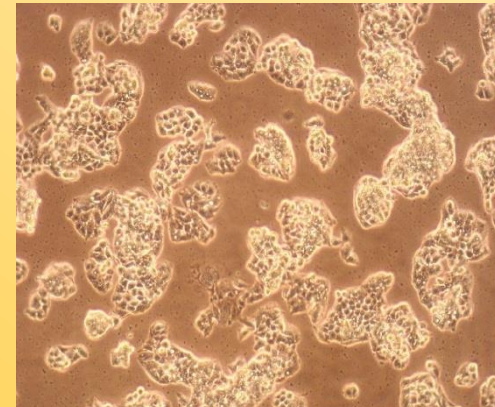
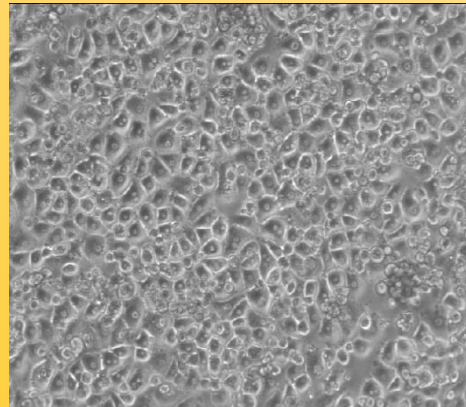
nevýhody

- živý systém pro sledování toxicity
- zjednodušený oproti celému organismu
- náhrada za testování na zvířatech
- ne všechny buňky těla „in vitro“
- ztráta diferenciací
- problematická extrapolace na zvířata
- použití nedefinovaných medií (serum)

Suspenzní



Adherentní



Komerční živná média + suplementy



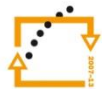
Inkubátor na CO₂ + flowbox



Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

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

Co musí splňovat test?

-Návrh jakéhokoliv toxického testu zahrnuje:

- 1) výběr testovaného organismu (buněčné kultury – zvířata /rostliny)
- 2) výběr odpovědi, která se bude měřit (změny ve fyziologii – smrt)
- 3) dobu expozice (hodiny – roky)
- 4) dobu trvání (pozorovací periodu)
- 5) koncentrace které se budou testovat

-Testy musí být objektivní, přesvědčivé i přes krátkou dobu, a pro předpověď vlivů na lidský organismus musí mít vybraný organismus podobnou odpověď jako člověk



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

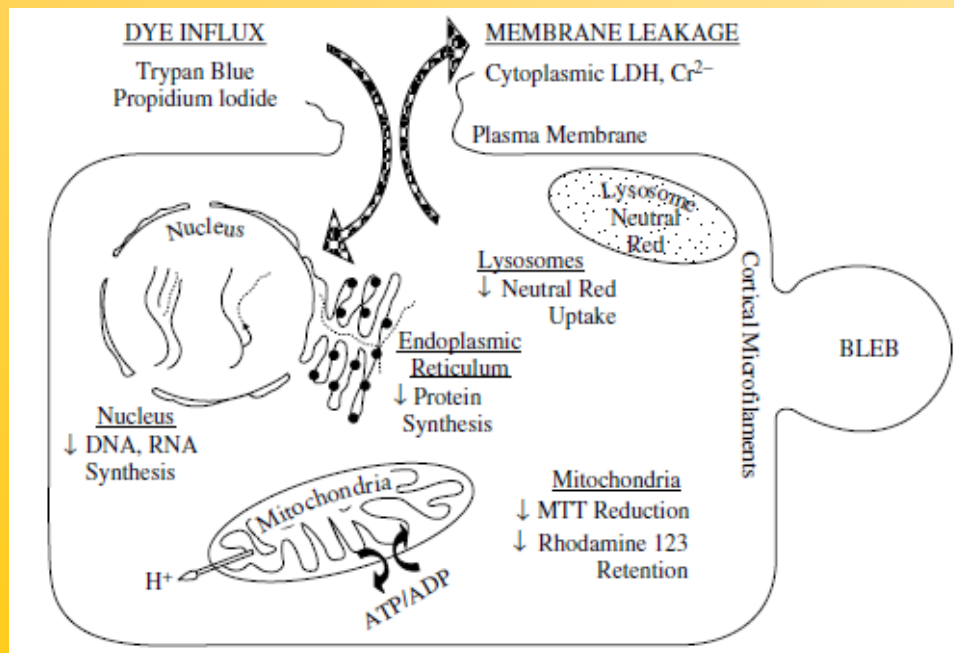
INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Investice do rozvoje vzdělávání

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

Indikace hodnocení toxicit

- Mikroskopicky
- Stanovení koncových „bodů“ indikujících účinky na buněčné organely



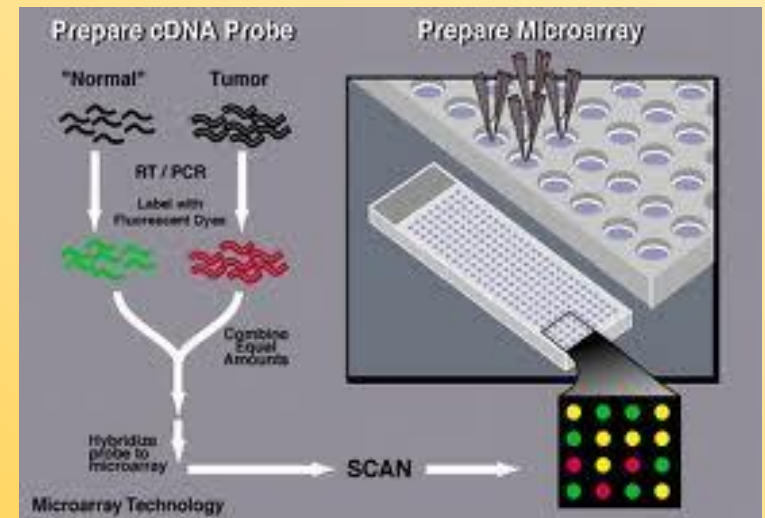
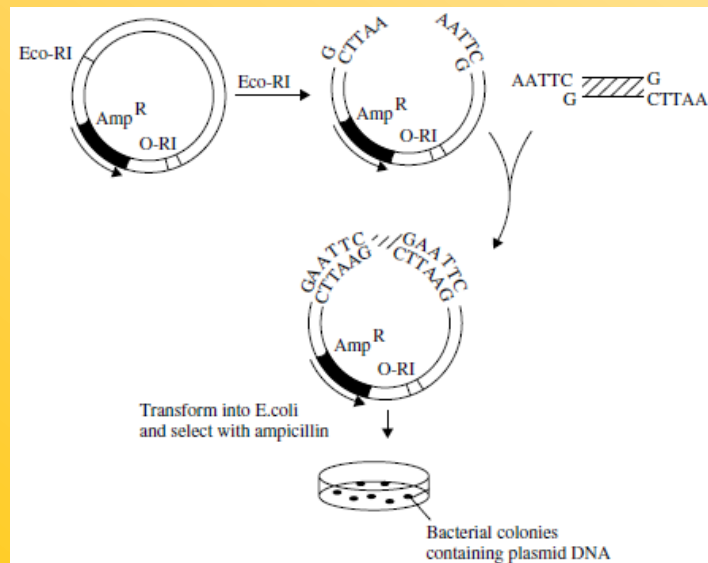
- 1) Výtok intracelulárních složek do media (LDH)
- 2) Inkorporace barviv (trypanová modř, neutrální červeň)
- 3) Redukce barviv (MTT)
- 4) Syntéza klíčových složek (mRNA, protein)
- 5) Specifické testy (apoptosa, nekrosa, prodloužení doby pro otevření napětově-řízeného kanálu, atd.)

Molekulární techniky I.

Sledování:

- genové exprese – mikroarray
- polymorfismu XMEs
- transgenních zvířat (knockout)

Klonování



Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



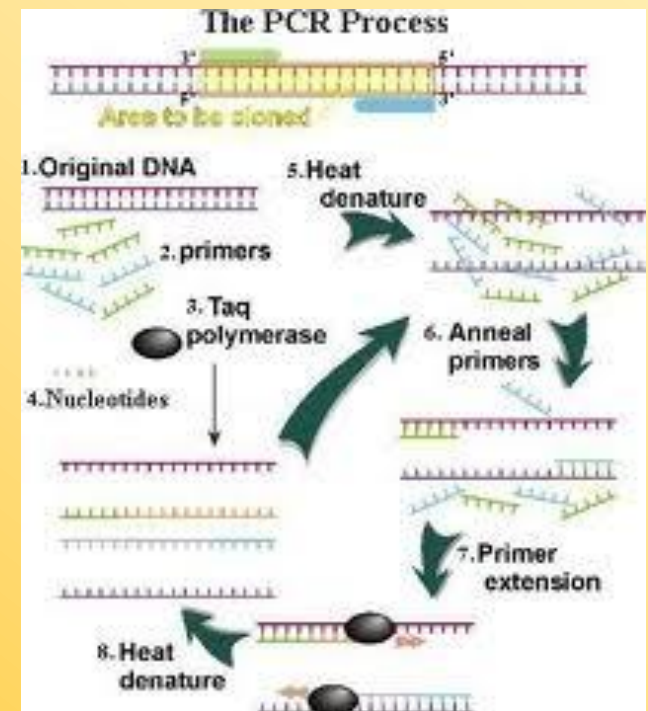
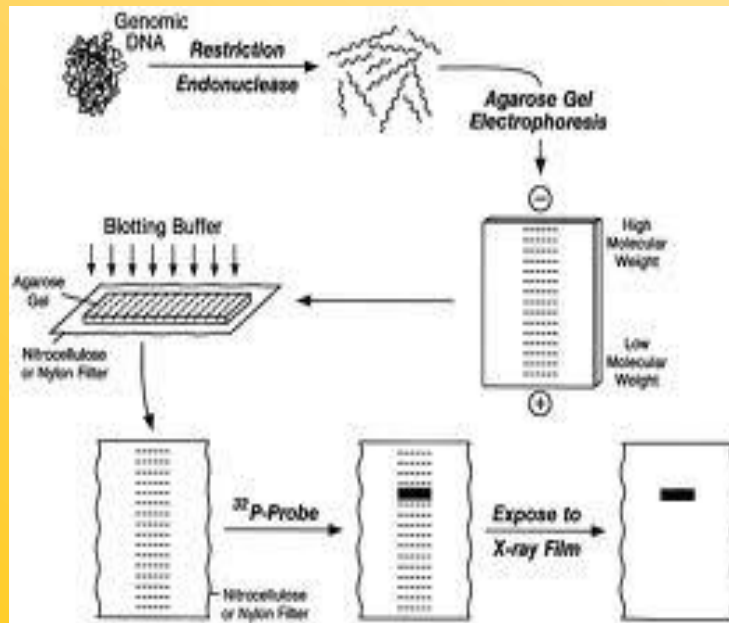
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

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

Molekulární techniky II.

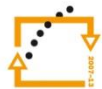
Northern, Southern blotting, PCR



Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

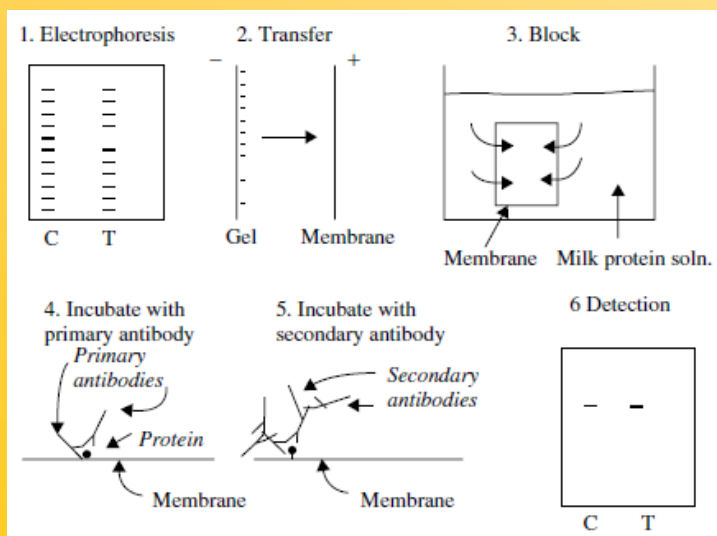
INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

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

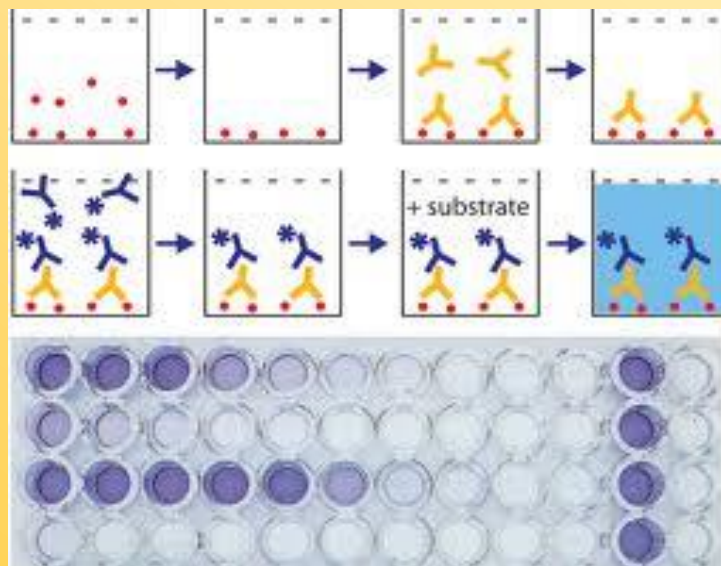
Imunochemické techniky

- Protilátky – mono- a polyklonální – produkty jednoho / více klonů B-lymfocytů – detekce proteinů ale i haptenu

Western blotting



RIA, ELISA



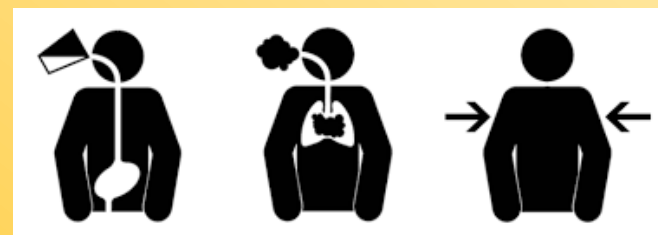
Take home message

- Toxicita sloučenin závisí na dávce → Toxický účinek nabývá na intenzitě s rostoucí dávkou (dose-response)

Substance	 Non-toxic or beneficial dose	 Toxic dose	 Lethal dose
Aspirin	 0.65 g (2 tablets)	9.75 g (30 tablets) (Acute Oral Dose)	34 g (105 tablets)
Ibuprofen	 400 mg (2 tablets)	1,400 mg (7 tablets) (Acute Oral Dose)	12,000 mg (60 tablets)

- Existují výrazné mezidruhovové rozdíly v toxicitě

- Toxicita sloučeniny je závislá na cestě vstupu



- Toxické látky jsou přítomny takřka všude
- Sledování toxicit na molekulární úrovni vyžaduje zjednodušené buněčné modely

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

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

Slovo závěrem.....



One man's meal is another
man's poison.

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

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