

# Inovace studia molekulární a buněčné biologie

reg. č. CZ.1.07/2.2.00/07.0354

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.*



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)**



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.*

# Studium toxicit.....PROČ?

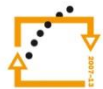


Investice do rozvoje vzdělávání

## Služba společnosti - Ochrana a Vývoj



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.

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

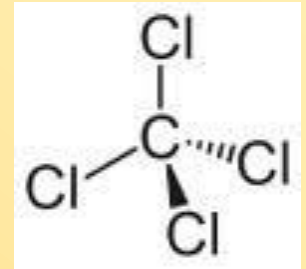
INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Rozsah a definice toxikologie III.

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

-  **$\text{CCl}_4$**  – netoxické pro drůbež, většinou hepatotoxikant



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





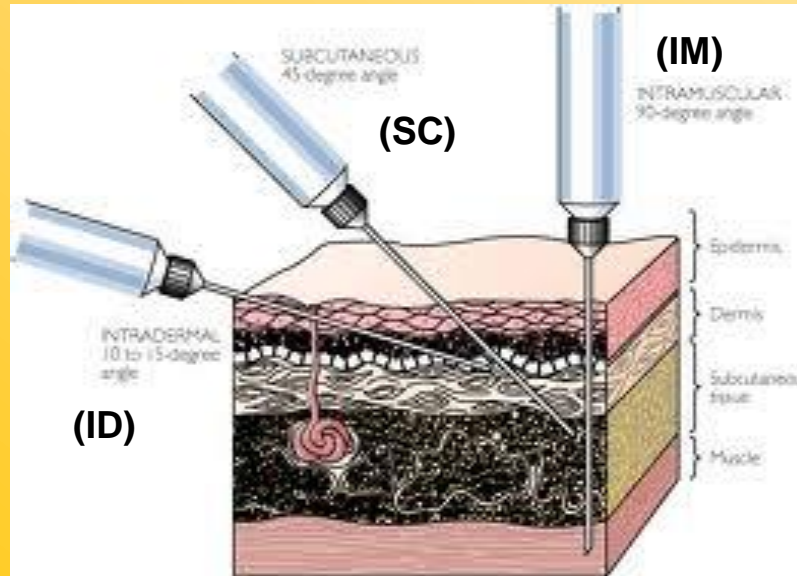
# Rozsah a definice toxikologie IV.

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

intravenosní (IV)



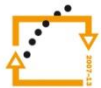
intraperitoneální (IP)



Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



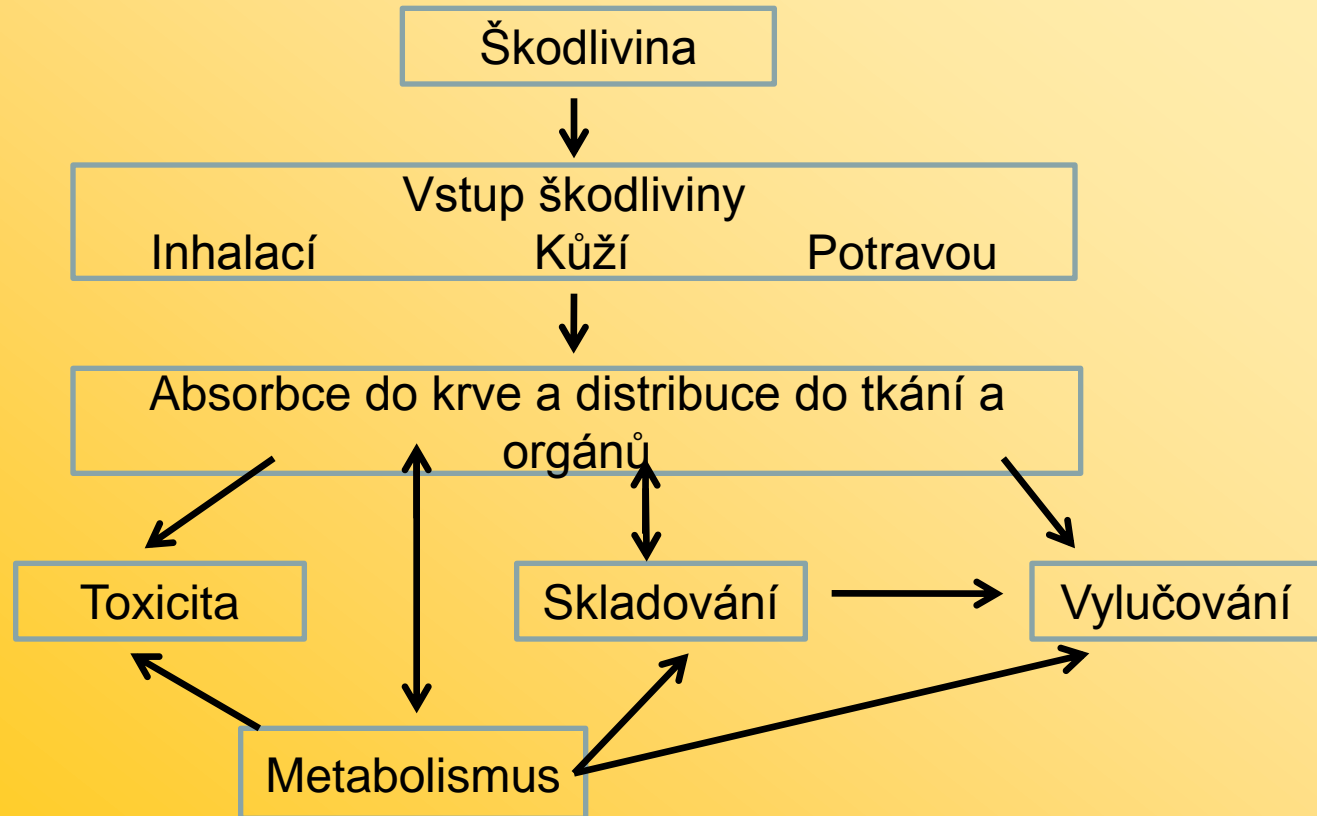
OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Rozsah a definice toxikologie V.

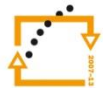
## - Cesty účinku škodliviny



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.

# 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

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

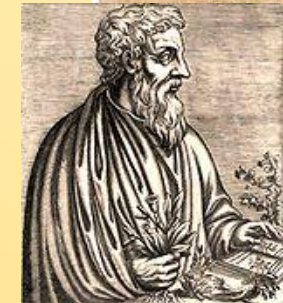
*Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.*

# Historie toxikologie

-Egyptský papyrus - Ebers, 1500 BC

- Hippokrates, Aristoteles – 400 – 250 BC –  
zmínky o jedech

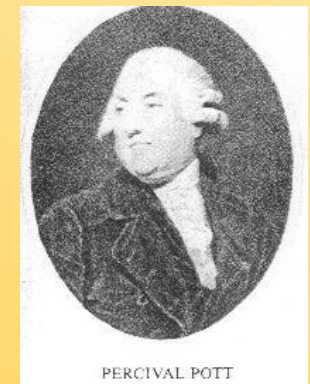
-Dioscorides – (40-90) -klasifikace jedů dle  
toxických a léčebných účinků, návrh použití emetik



- 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**

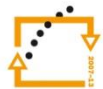


PERCIVAL POTT

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



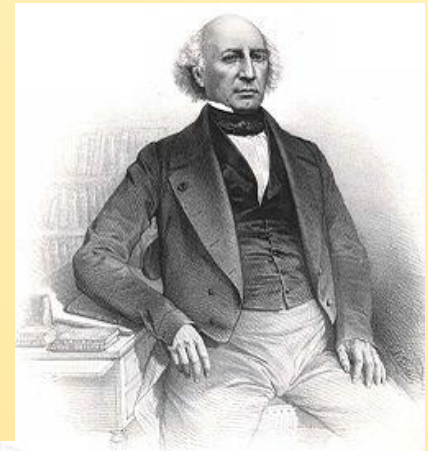
OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

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

# 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

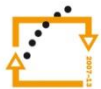


- Až doposud – vývoj z deskriptivní formy  
na formu s rozpoznáním mechanismu účinku

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

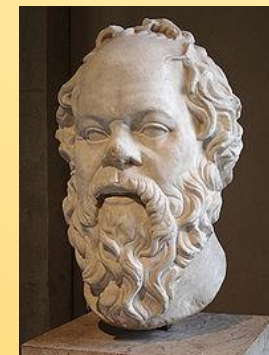


## Král Mithridates Eupator (1. století před Kristem)

- 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

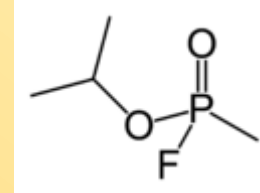
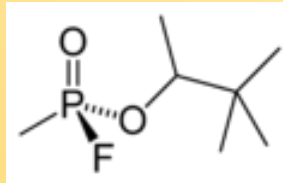


## Středověk - traviči

- 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 methylrtuťí

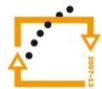


**Itai-Itai Disease** (ouch-ouch disease)  
– 50. léta 20. století – otrava kadmíem

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

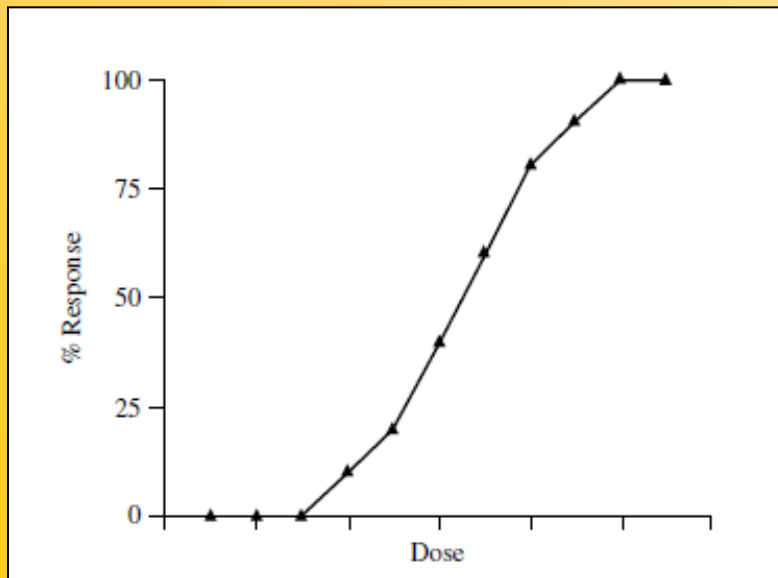
*Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.*

# Vztah dávka – odpověď

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

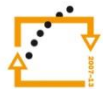
➔ **Existence NOEL** (no observed effect level) - bezpečnost potravních additiv, pesticidů

**Neplatí pro karcinogeny**

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

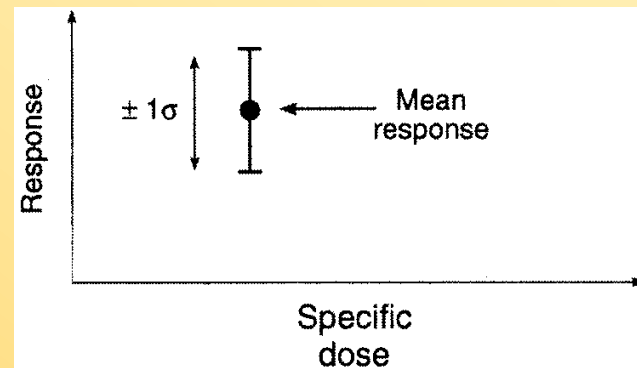
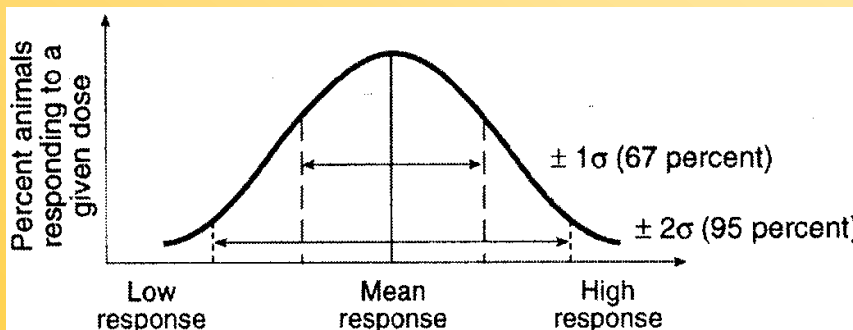
INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

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

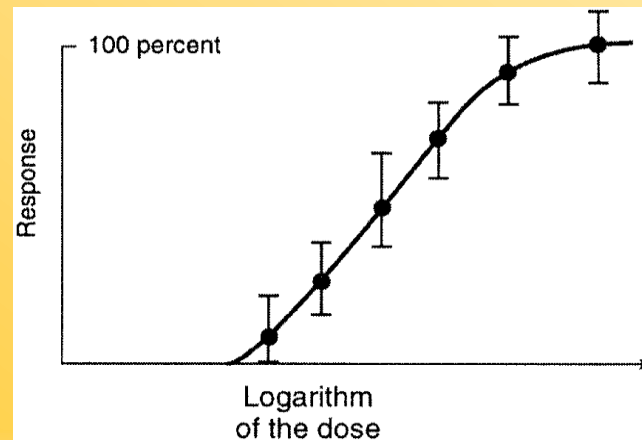
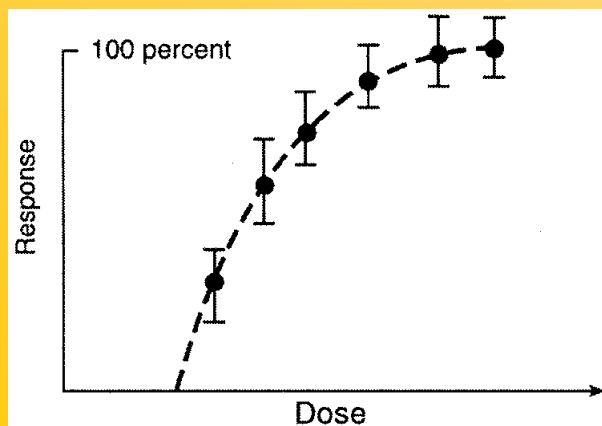


# Vztah dávka – odpověď II.

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

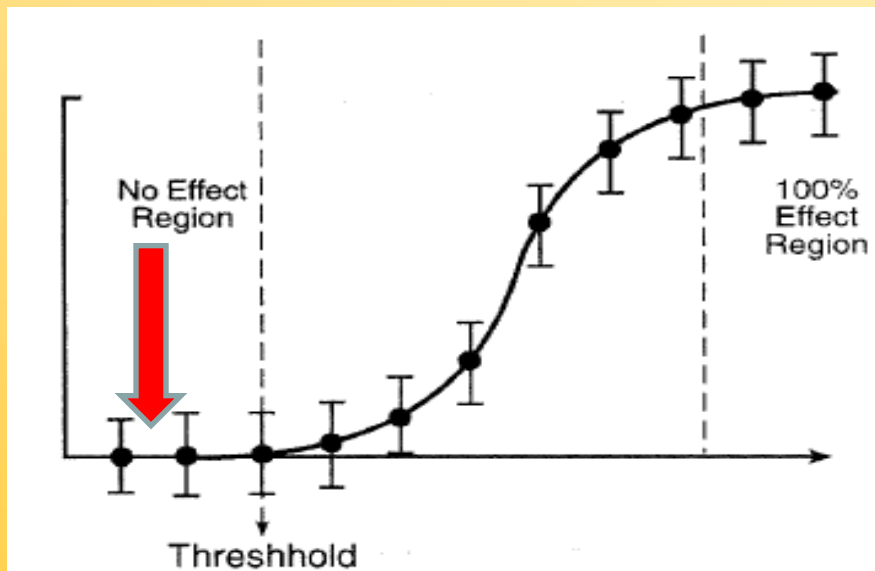


OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

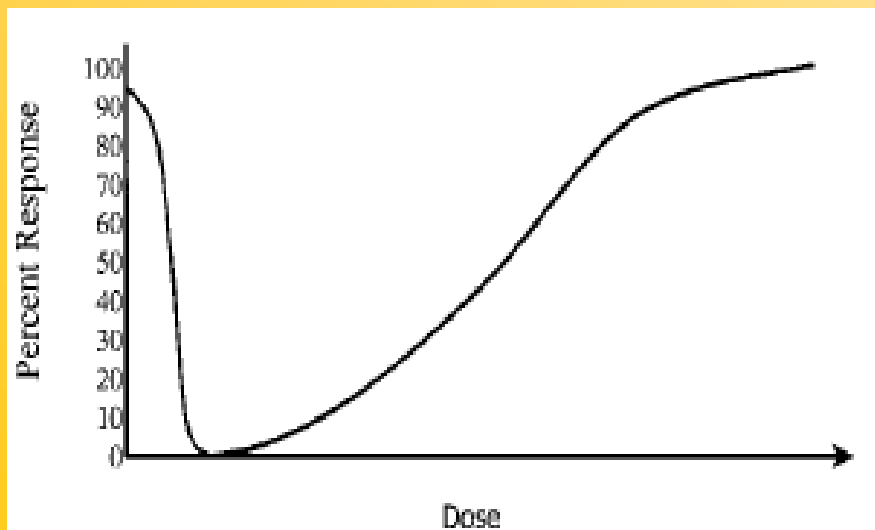
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

# Vztah dávka – odpověď III.



**Bezpečná oblast (NOEL)**

**Toxikologové hledají NOEL.**



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

Investice do rozvoje vzdělávání



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

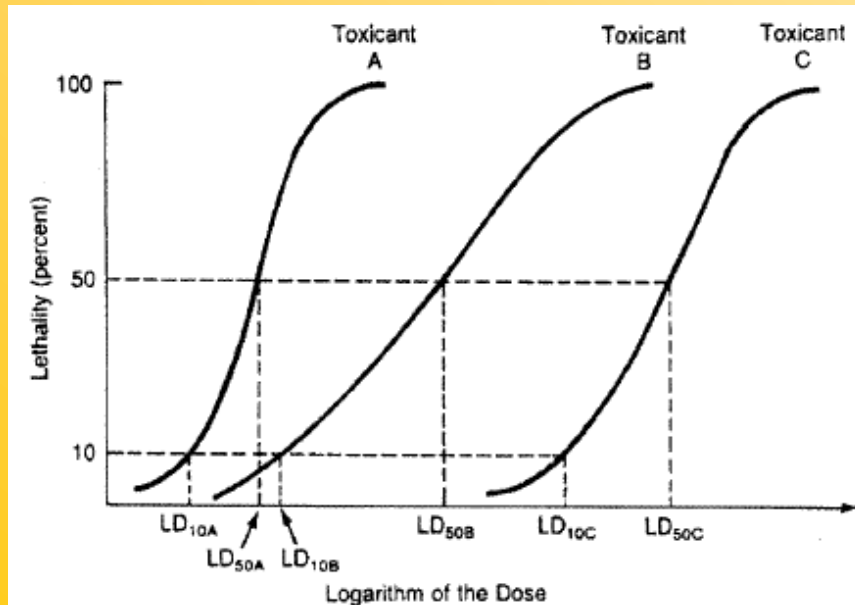
*Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.*

# 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



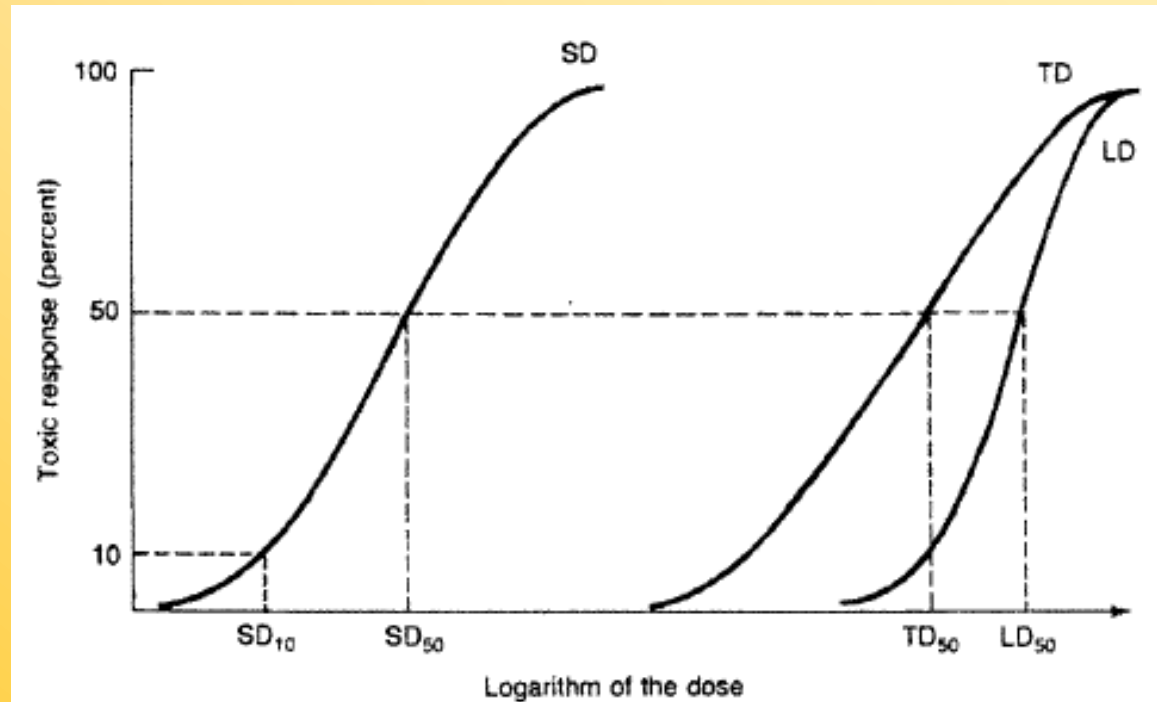
Srovnání toxického potenciálu látek.

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)

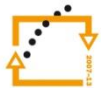
Therapeutic Index/Margin of safety =  $TD_{50}/SD_{50}$

-čím větší, tím bezpečnější

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



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

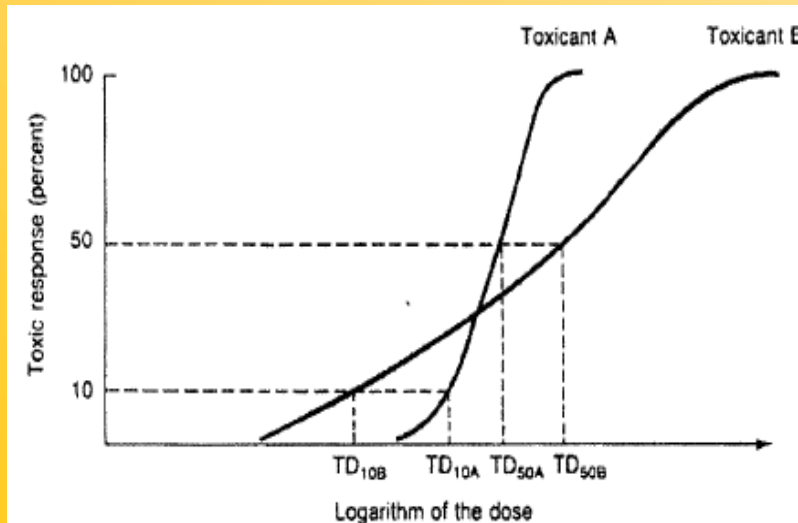
Investice do rozvoje vzdělávání

# 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 LD<sub>50</sub> Data for Chloroform

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

# 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. 100ppm poškozují 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

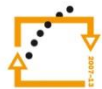
- **Cesta vstupu** = rychlost a rozsah absorpce, rozpustnost ve vodě, tucích; může změnit orgánovou toxicitu dle podání – Intravenosně vs. Perorálně –(first-pass effect)
- **Pohlaví** – více tuku u žen než u mužů, vyšší metabolická kapacita samců potkanů než samic (strychnin je méně toxický pro samce, 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

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.

# Klasifikace jedů

- 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, léčiva, rozpouštědla, kosmetiku



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.*



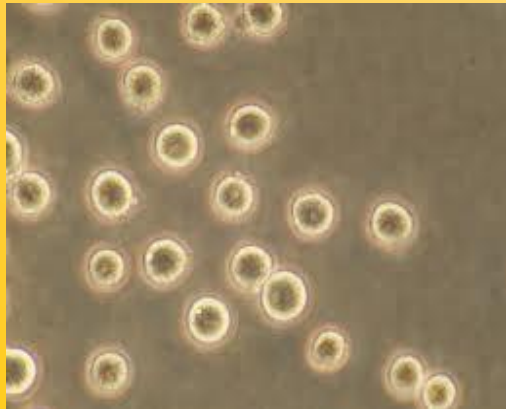
# Metody hodnocení toxicit

## Buněčné kultury

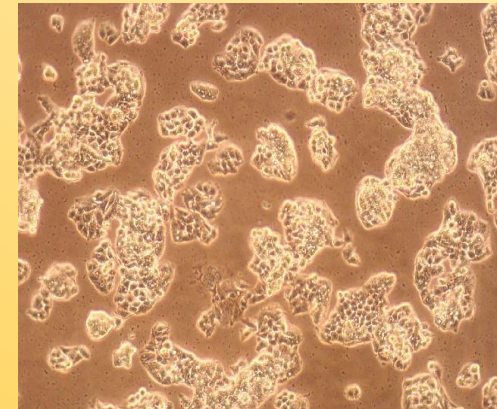
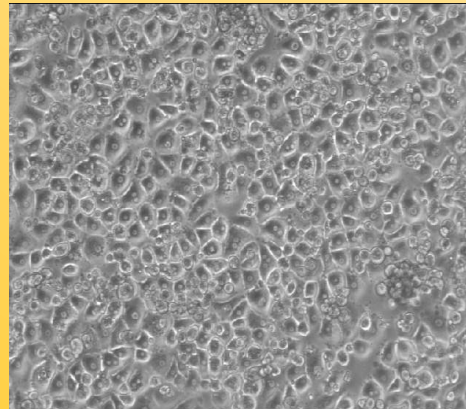
- živý systém pro sledování toxicity
- zjednodušený oproti celému organismu
- náhrada za testování na zvířatech
- ne všechny buňky těla „in vitro“
- ztráta diferenciacce
- problematická extrapolace na zvířata
- použití nedefinovaných medií (serum)

## nevýhody

### Suspenzní



### Adherentní



# Komerční živná média + suplementy



## Inkubátor na CO<sub>2</sub> + 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**

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



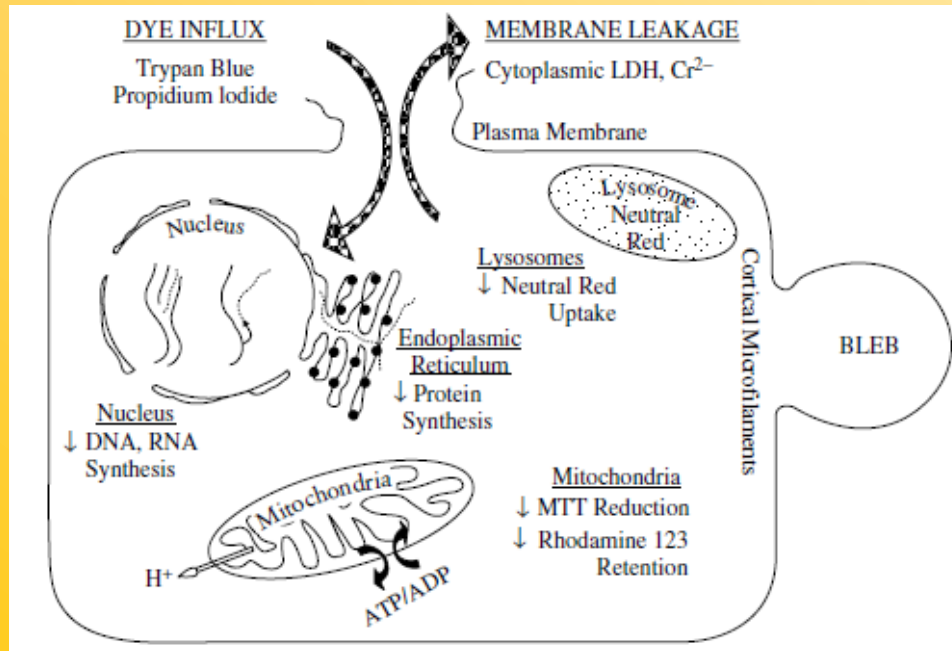
OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Indikace hodnocení toxicit

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



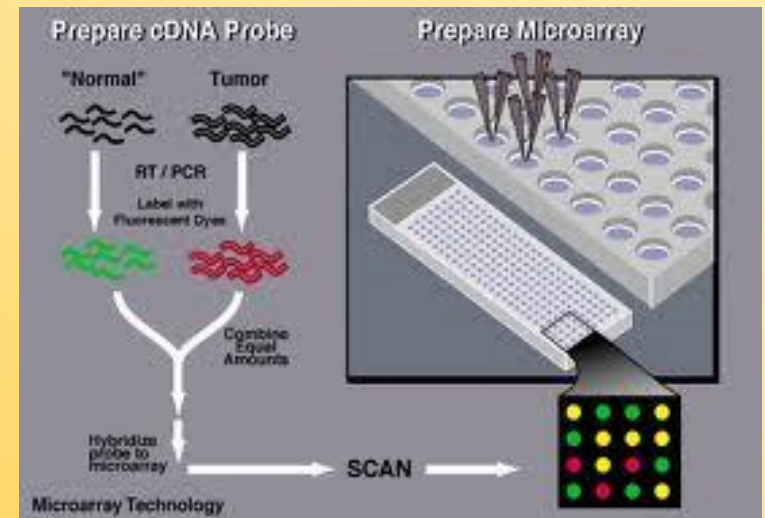
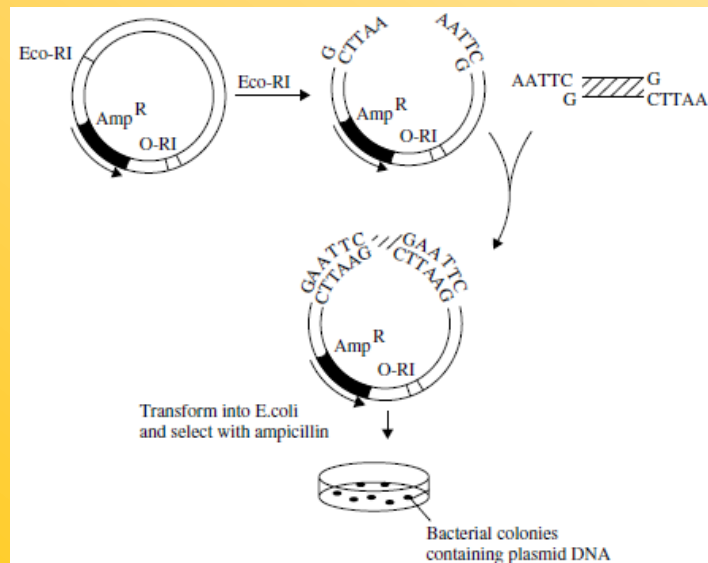
- 1) Výtok intracelulárních složek do media (LDH)
- 2) Inkorporace barviv (trypanová modř, neutrální červeň)
- 3) Redukce barviv (MTT)
- 4) Syntéza klíčových složek (mRNA, protein)
- 5) Specifické testy (apoptosa, nekrosa, prodloužení doby pro otevření napět'ověřezaného kanálu, atd.)

# Molekulární techniky I.

## Sledování:

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

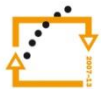
## Klonování



Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



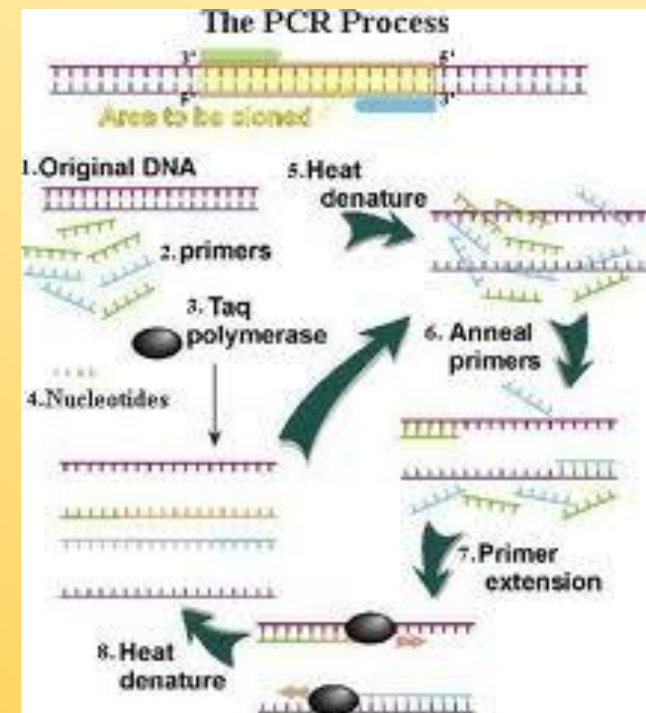
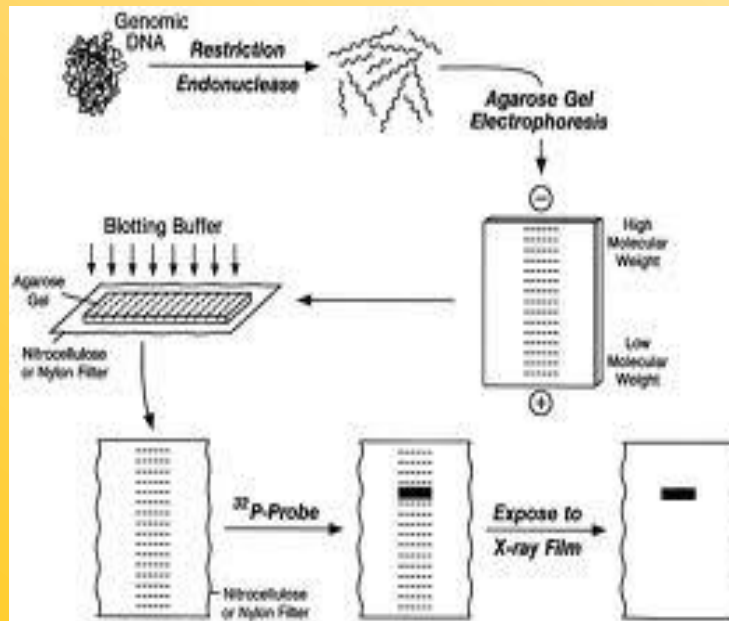
OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Molekulární techniky II.

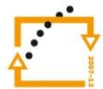
## Northern, Southern blotting, PCR



Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

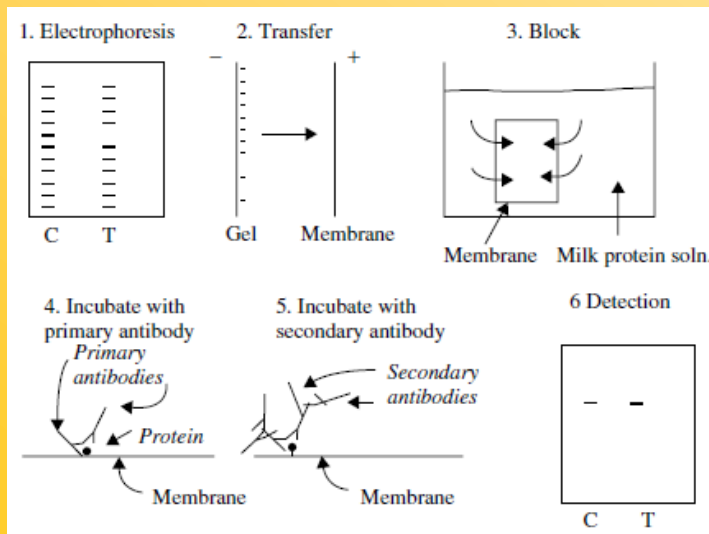
INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

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

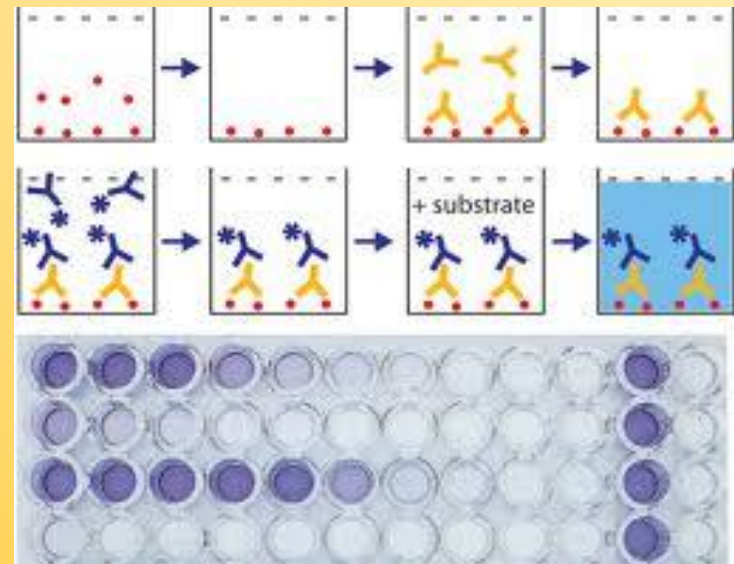
# Imunochemické techniky

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

## Western blotting



## RIA, ELISA



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.

# Slovo závěrem.....

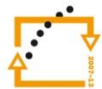


One man's meal is another  
man's poison.

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.*