

Základy Toxikologie

KBB/ZTOX



doc. Ing. Radim Vrzał, Ph.D.



Úvod do toxikologie



- ✘ **Základní pojmy** – **abychom si rozuměli**
- ✘ **Historie toxikologie** – **co bylo a co je**
- ✘ **Metody hodnocení toxicit** – **jak poznám, co je toxické ?**





Co to je Toxikologie?

- nauka o studiu nepříznivých účinků jedů na lidi, zvířata a prostředí



Co znamená slovo „toxický“ ?

- nežádoucí, nepříznivý



Co to je Toxicita?

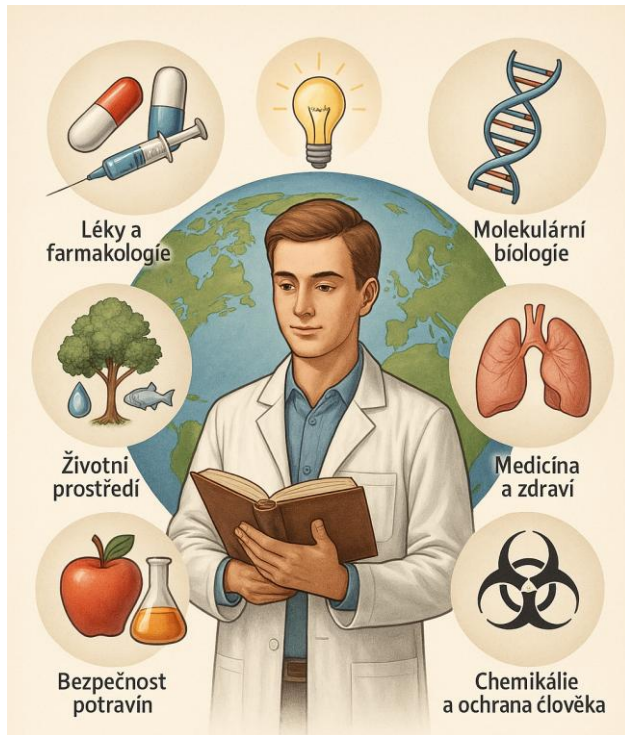
- sekvence událostí (expozice, distribuce, metabolismus, interakce s intracelulárními molekulami)

(Toxikolog)



Studium
toxicit..

....
PROČ?



..protože
TOXIKOLOGIE
je věda, která
chrání život



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)



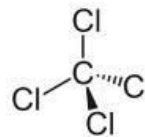
Klinicky užívaná léčiva: Prospěšnost vs. Toxicita

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

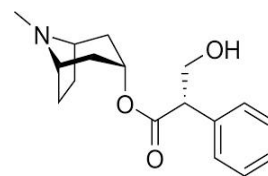
Kovy, vitamíny: - *Cu* – součástí enzymů, inhibitor ve vysoké koncentraci
- *vitamin A* – vidění, zvracení, bolesti hlavy etc.

Jed – kvalitativní aspekt

(mezidruhová toxicita)
- CCl_4 – netoxické pro drůbež,
většinou hepatotoxikant



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



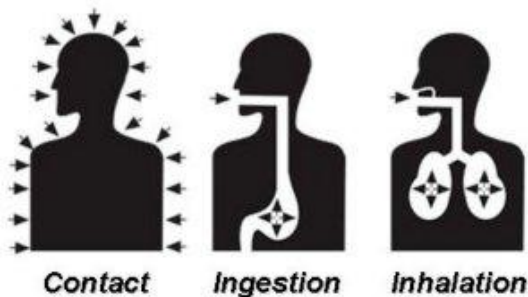


Toxicita - akutní

- chronická
- orgánově specifická
- závislá na pohlaví, věku, složení stravy, genetické variabilitě

(LD₅₀ – závislá na rozsahu s jakou je výše uvedené kontrolováno; - výrazná mezilaboratorní variabilita)

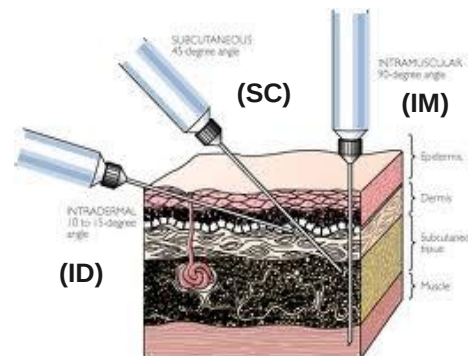
- **odlišnost dle cesty vstupu** - perorální (PO)



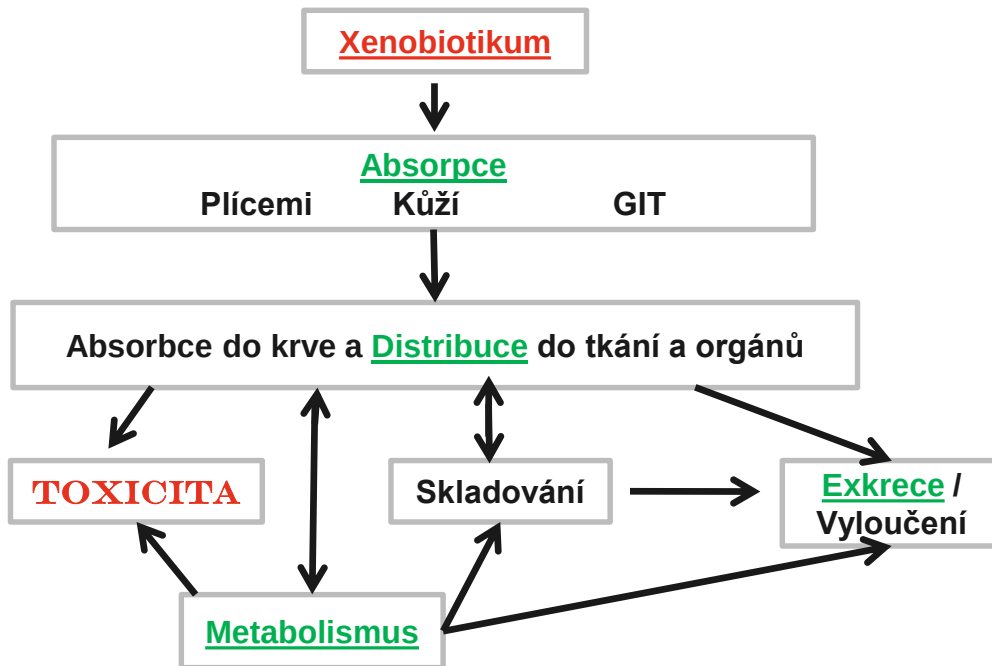
intravenosní (IV)



intraperitoneální (IP)



Cesty účinku škodliviny / jedu / noxy/ xenobiotika



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)
- Forezní toxikologie (lékařsko-právní aspekty otrav) / Environmentální toxikologie (pohyb škodlivin v prostředí a v potravním řetězci)

Třídy chemikálií :

- Potravní aditiva / Průmyslové chemikálie / Produkty spalování / Návykové látky

Regulační toxikologie : Legální aspekty (FDA, EPA) / Odhad rizika



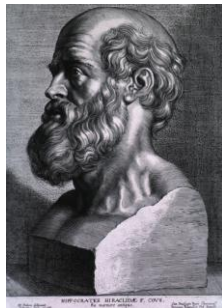
Historie toxikologie

Egyptský papyrus

Ebers, 1500 BC



Hippokrates
(460-370 př.n.l),
Aristoteles –
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.st. – **Bernardino Ramazzini** (1633-1714) – Nemoci pracujících (Diseases of workers) – „Otec nemocí z povolání“

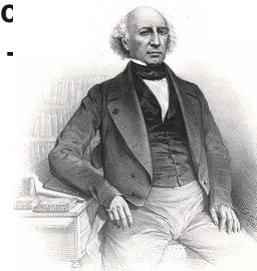


Percival Pott (1714-1788) - Korelace mezi povoláním kominíka a rakovinou šourku – 1775



PERCIVAL POTT

Orfila (1787-1853) - „Otec moderní toxikologie“, 1815 - první publikace věnovaná exklusivně toxikologii



Claude Bernard (1813-1878) – mechanismus působení kurare



1962 – The Silent Spring – **Rachel Carson** (1907-1964) – iniciace éry environmentální toxikologie, katalyzátor ke vzniku US EPA



...až doposud – vývoj z deskriptivní formy na formu s rozpoznáním mechanismu účinku



Historicky známé otravy

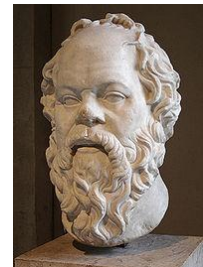
Král Mithridates Eupator (1.st. př.n.l.)

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



Sokrates

- Donucen k sebevraždě
- Bolehav plamatý (*Conium maculatum*) → obrna svalstva a smrt zadušením



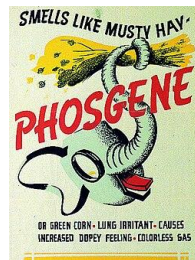
Středověk - **traviči**

- 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

První světová válka – použití bojových plynů (chlor, fosgen)

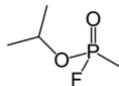
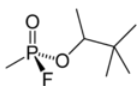


Druhá světová válka - nacističtí důstojníci – kyanid

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

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

Teroristické útoky (Japonsko, Sarin - 1994)

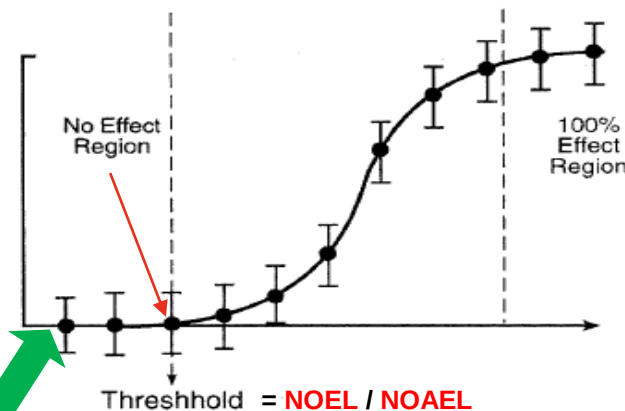


Základní pojmy v toxikologii:

Vztah dávka – odpověď (dose-response relationship) existuje, pokud změny v dávce produkují konsistentní nenáhodné změny v účinku

→ **prahová dávka** (NOEL, NOAEL – no observed (adverse) effect level) – pod ní není pozorovatelný účinek → pro účely bezpečnosti potravních aditiv, pesticidů, apod.

!!! Neplatí pro karcinogeny !!!

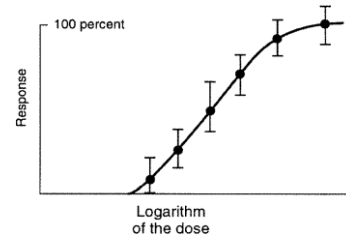
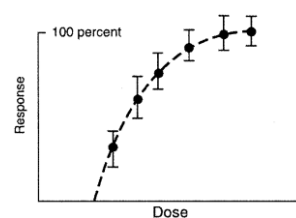
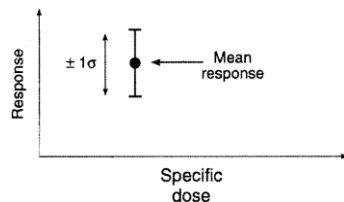
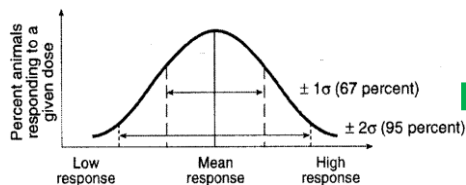


Bezpečná oblast (DNEL)

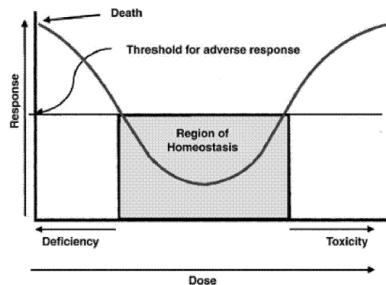


Základní pojmy v toxikologii:

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



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



U-tvar typický pro vitaminy,
esenciální prvky.





Základní pojmy v toxikologii:

Smrtelné / letální dávky – LD, měřenou veličinou je úmrtnost

Toxické dávky – TD, vážný nežádoucí účinek jiný než smrt

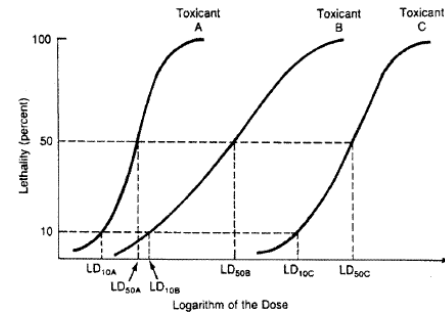
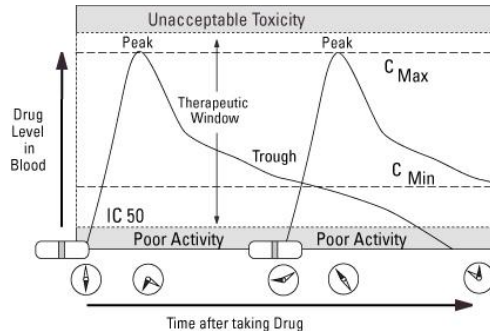
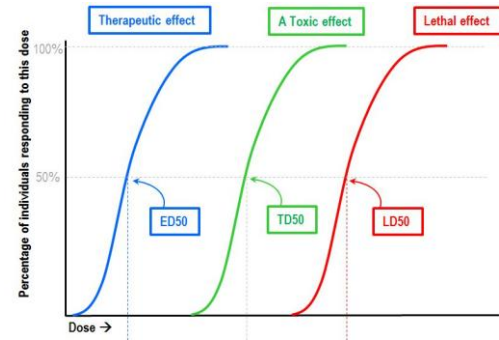
Příznakové (sentinel) dávky – SD, žádný či minimální nepříznivý účinek (bolesti hlavy, rozespalost) slouží jako varování

Srovnání toxického potenciálu látek:

- *Mezi sebou* (Neznámá látka vykazuje podobnost s alespoň jednou ze studovaných → relativní riziko)

Therapeutic Index / Margin of safety
= TD_{50}/SD_{50} (čím větší, tím bezpečnější)

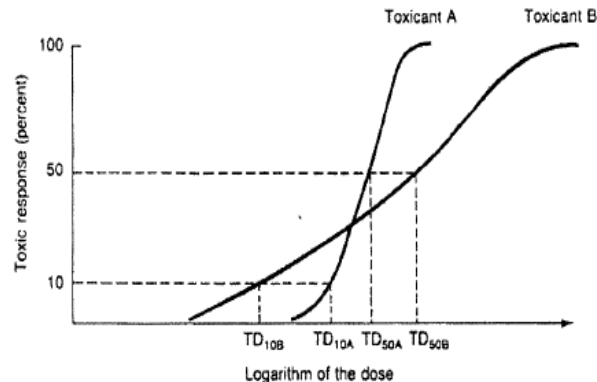
- *Mezi druhy* (Předpoklad, že lidé jsou tak citliví jako testovaný druh)



Základní pojmy v toxikologii:

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 – útlum CNS vs. karcinogenita)



**Která zvířecí data nejlépe
vyhovují pro srovnání s
člověkem ?**

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

Oral LD₅₀ Data for Chloroform



Základní pojmy v toxikologii:

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 !!!!!)



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



- 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

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, potencie, 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	Toluene + benzene or caffeine + alcohol or BAL + mercury
	$5 + (-5) = 0$ or	
	$10 + 0 = 2$	

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, kosmetika



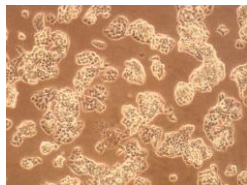
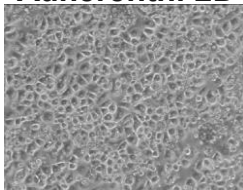


Metody hodnocení toxicit

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



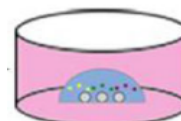
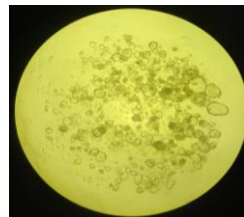
Adherentní 2D



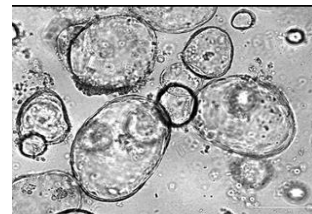
Suspenzní



Adherentní (?) 3D



3D culture



Co je potřeba k hodnocení toxicit ?

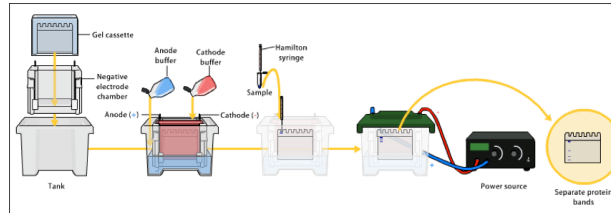
Komerční živná média + suplementy



Inkubátor na CO₂ + flowbox



Analytické nástroje

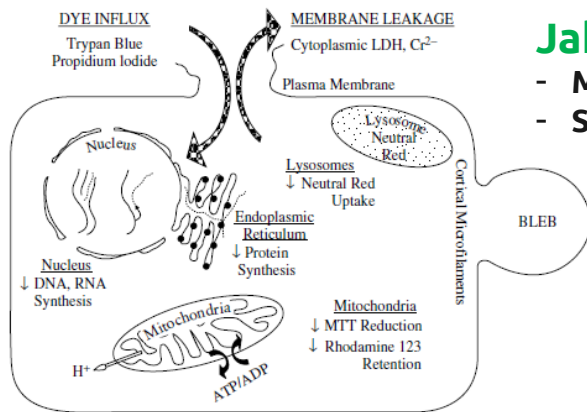


Co musí test toxicity splňovat ?

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



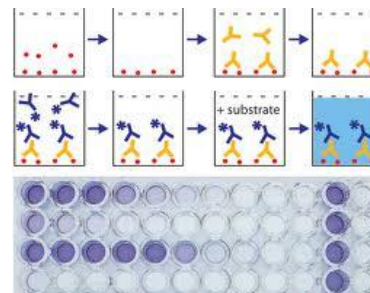
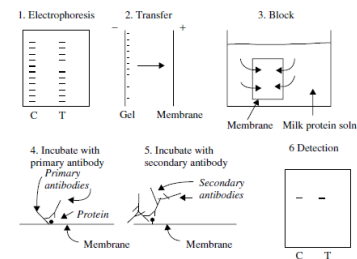
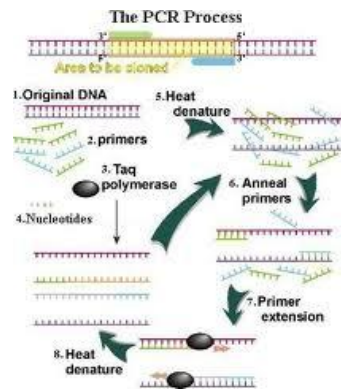
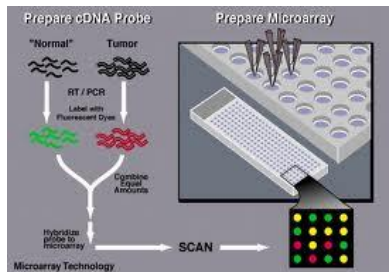
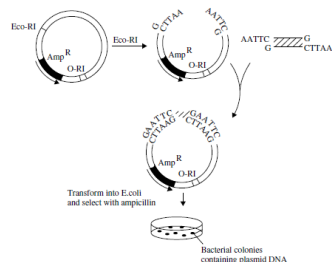
Jak hodnotit toxicitu ?

- 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 (apoptóza, nekróza, prodloužení doby pro otevření napětově-řízeného kanálu, atd.)

Molekulární techniky studia toxicit

Sledování: - genové exprese – mikroarray, PCR, western blotting, ELISA
 - polymorfismu XMEs
 - transgenních zvířat (knockout)

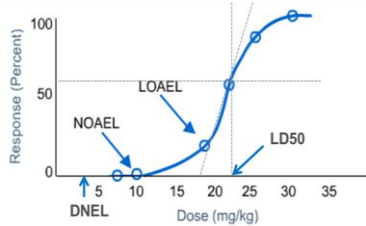
Klonování



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

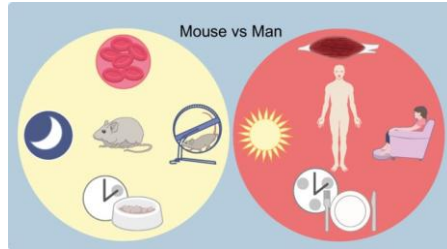
Take home message 1

- 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 mezidruhové rozdíly v toxicitě



- Toxicita sloučeniny je závislá na cestě vstupu





Take home message 2

- Toxické látky jsou všudypřítomné



"THE DOSE MAKES THE POISON"

APPLE SEEDS



CONTAIN AMYGDALIN
~0.6g/kg of seeds

PEARS



CONTAIN FORMALDEHYDE
~0.06g/kg

POTATOES

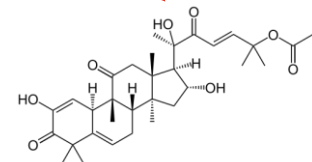
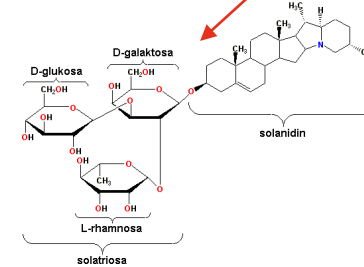
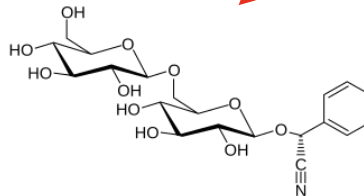


CONTAIN SOLANIN
~0.2g/kg
(higher in green potatoes)

COURGETTES

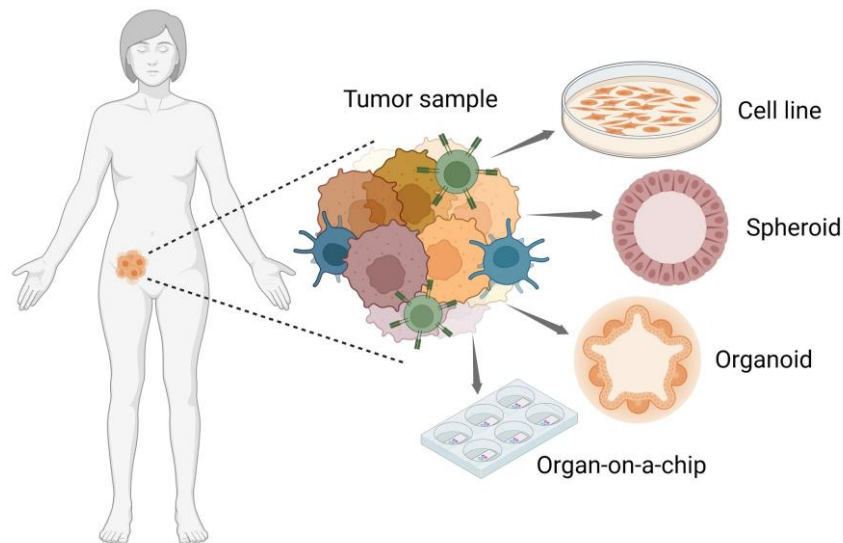


CONTAIN CUCURBITACIN E
Variable
(higher in bitter courgettes)



Take home message 4

Sledování toxicit na molekulární úrovni vyžaduje zjednodušené buněčné modely !



Slovo závěrem.....



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





THANKS!

Do you have any questions?

youremail@freepik.com

+34 654 321 432

yourwebsite.com



CREDITS: This presentation template was created by [Slidesgo](#), and includes icons by [Flaticon](#), and infographics & images by [Freepik](#)

Please keep this slide for attribution