

Ekotoxikologie

Základy toxikologie

Toxikologie

- **věda o účincích jedů**
- **vztahy mezi**
 - **strukturou a účinkem**
 - **vstřebáváním**
 - **distribucí v organismu**
 - **biotransformací**
 - **exkrecí**

JED

- **otázka dávky – každá látka působí na organismus toxicky**

Legislativa – „jedová vyhláška“

**ZÁKON 157/1998 Sb. O chemických látkách, chemických
přípravcích a o změně některých dalších zákonů,**

Novelizován : 352/199 Sb, 132/2000 Sb, 258/2000 Sb, 458/2000 Sb,

.....

VYHLÁŠKA Ministerstva zdravotnictví 251/1998 Sb.

**ze dne 16. října 1998, kterou se stanoví metody pro zjišťování
toxicity chemických látek a přípravků**

noxa – „škodlivina“

TOXICITA

- **akutní (jednorázová dávka, vysoké koncentrace)**
- **chronická (opakované dávky, nízké koncentrace, expozice, doba expozice, pozdní účinky)**

TOXIKOLOGIE

- **chemická** (syntéza, preparace, analýza)
- **farmakologická** (účinky, LD₅₀ ,.....)
- **biochemická** (mech.účinků na molekulární úrovni)
- **klinická** (diagnostika a terapie otrav)
- **průmyslová** (detekce, analýza, C_{max}, exp.testy)
- **potravinářská** (přírodní toxiny, rezidua, technologie)
- **veterinární** (toxické látky pro zvířata, krmiva)
- **zemědělská** (toxické látky v zemědělských produktech)
- **ekotoxikologie** (toxikologie ž.p.)

ZÁKLADNÍ TOXIKOLOGICKÉ POJMY

- **LD₅₀** – dávka látky, která způsobí smrt 50% jedinců ve zkoumaném souboru
(LC₅₀, LD_{50/30})
- **dávka, koncentrace, účinek**
 $U = f(c \cdot t^n)$, $U = f(c)$ u org.rozpouštěděl
(reverzibilní vazba)
- **komplexní tox.účinek pro přípustnou průměrnou denní dávku**
 $PPD = K_1D_o + K_2D_v + K_3D_p$

- **absolutní smrtelná dávka** – nejmenší dávka látky, která způsobí smrt 100% jedinců zkoumaného souboru
- **minimální smrtelná dávka** – nejmenší dávka, která způsobí smrt aspoň jednoho jedince ze zkoumaného souboru
- **maximální snesitelná dávka** – maximální dávka látky, kterou ještě přežijí všichni jedinci
- **rychlost vylučování**
$$C_t = C_0 \cdot e^{-kt}$$
- **poločas vylučování**
$$T = \ln 2 / k = 0,693 / k$$
- **NPK** – nejvyšší přípustné koncentrace

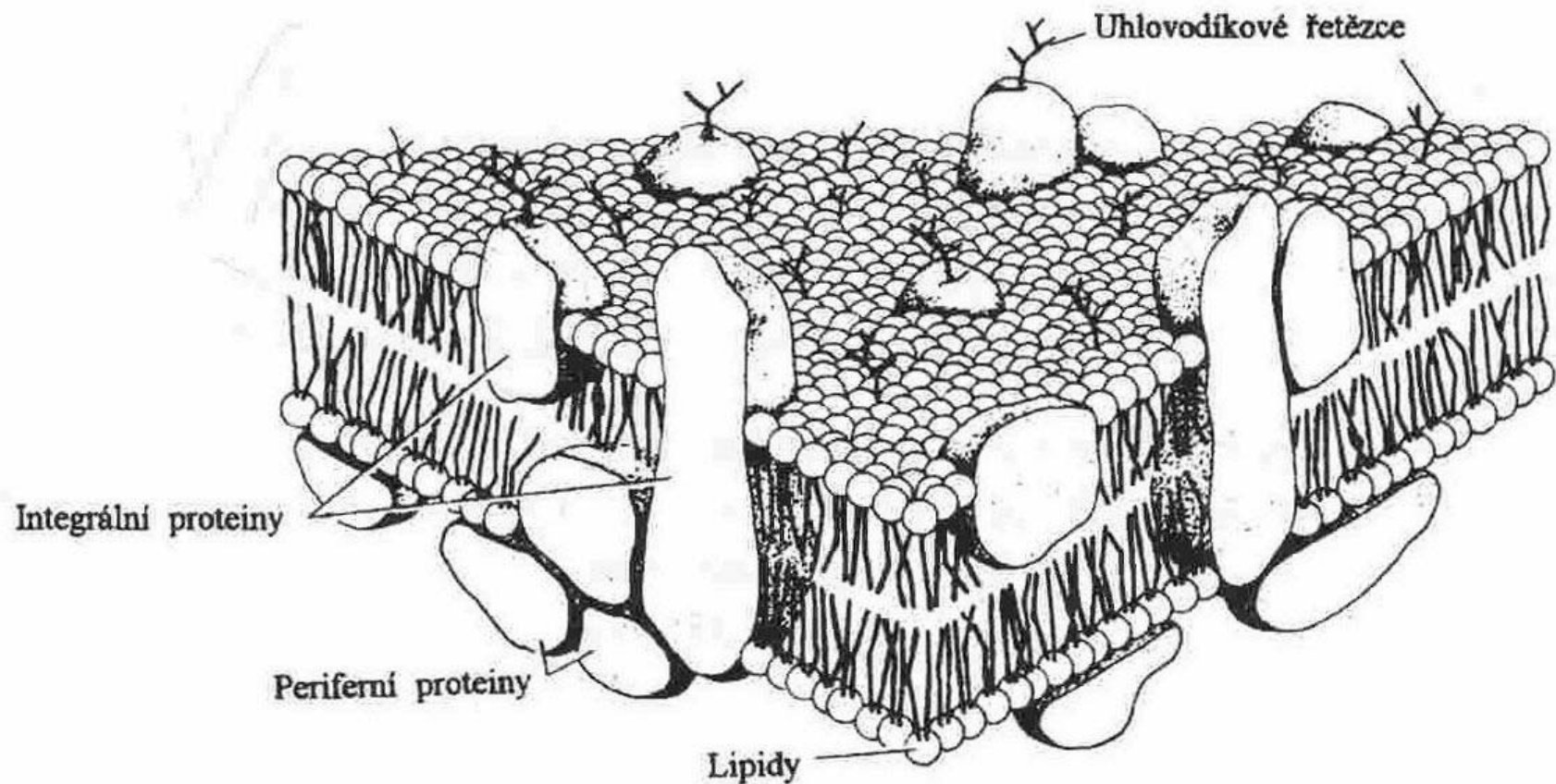
INTERAKCE TOXICKÉ LÁTKY S ORGANISMEM NA MOLEKULÁRNÍ A BUNĚČNÉ ÚROVNI

Stupeň poškození buňky

- **cytopatický efekt** – narušení některých procesů probíhajících v buňce, ale vlastní životaschopnost buňky je zachována
- **cytostatický efekt** – základní funkce buňky nepoškozeny, ale nemůže se dělit
- **cytotoxický efekt** – usmrcení buňky
- **nekrobiosa buněk** – postupné odumírání jednotlivých buněk

- **regenerace tkáně** – postupné odstranění poškození
- **diferenciace buněk** – rozdílná citlivost různých tkání stejného organismu
- **individuální citlivost buněk** – různé fáze buněčného cyklu, genetické odchylky
- **adaptační mechanismy** – syntéza enzymů – detoxikace; selekce rezistentních buněk – často mutantní

BUNĚČNÁ MEMBRÁNA



MECHANISMY PRŮNIKU TOXICKÉ LÁTKY BUNĚČNOU MEMBRÁNOU

- **filtrace** – póry naplněnými vodou – ve vodě rozpustné, nízkomolekulární (m.h.200) látky
- **prostá difuze** – pouze F-CH faktory
$$R_T = P(c_I - c_{II})$$
- **elektrodifuze iontů** – vliv el.potenciálu iontových látek
$$R_T = (G_T) z_T F (E_T - E)$$
$$E_T = RT/z_T F \cdot \ln c_{II}/c_I$$
- **transport iontovými kanálky**
K kanály (K^+ , Rb^+ , HN^4+)
Na kanály (Na^+)

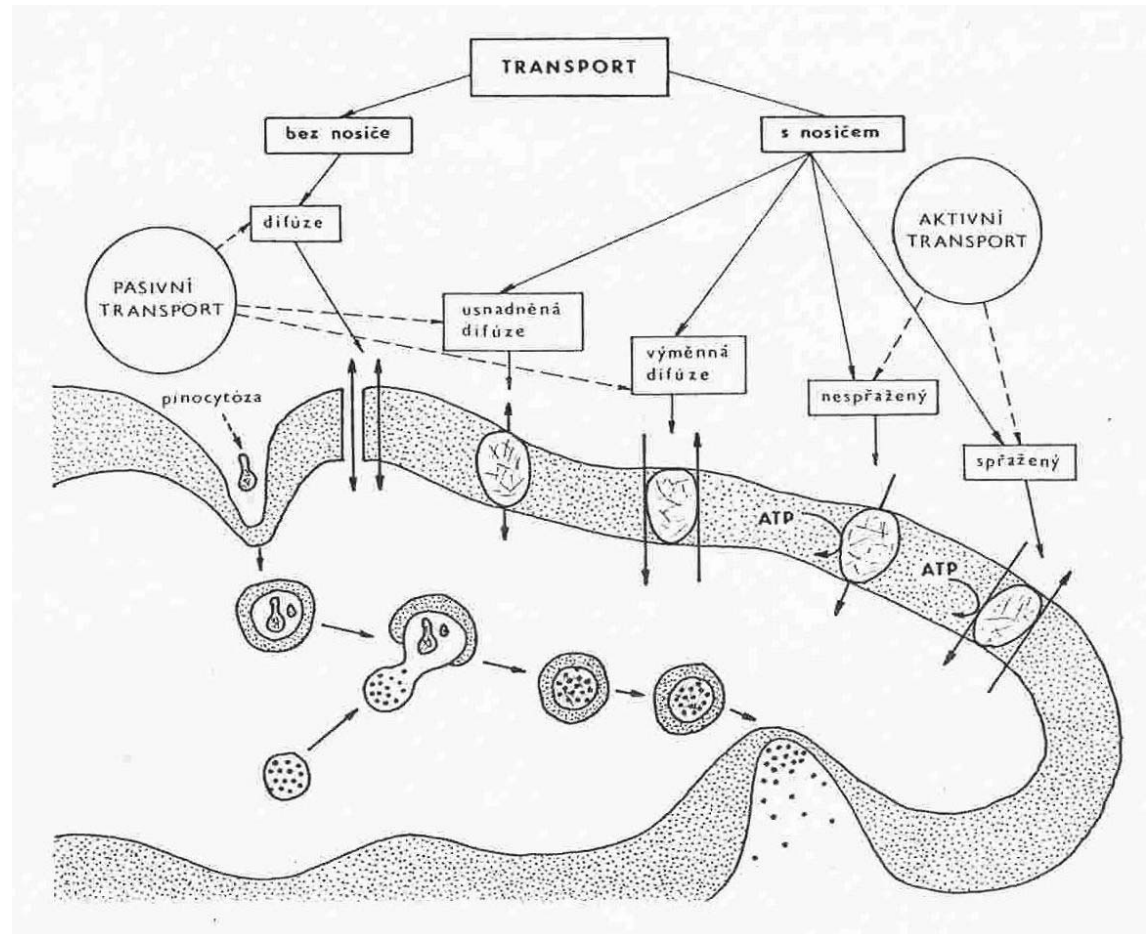
- **pasivní přenašečový transport**
pomocí nosičů procházející membránou, ve směru potenciálového spádu
vstup látky regulován
 - množstvím molekul přenašeče
 - rychlosti pohybu přes membránu
 - afinitou přenašeče k toxické látce
- **aktivní přenašečový transport**
 - proti směru potenciálového spádu
 - nutný přísun energie
 - oxidačně redukční mechanismy
 - makroenergetické fosfátové vazby (ADP, ATP)
 - elektrochemický gradient jiné přenášené látky

- **skupinová translokace**

- transport spojený s chemickou změnou přenášené látky

- **endocytosa, exocytosa**

- přenos celých částic vychlípáním membrány do váčku (endosom)



POSTIŽENÍ TOXICKOU LÁTKOU

- **syntézy makromolekulárních látek**
- **buněčné permeability a transportních mechanismů**
- **buněčného energetického metabolismu**
- **buněčného cyklu**
- **genetické informace**

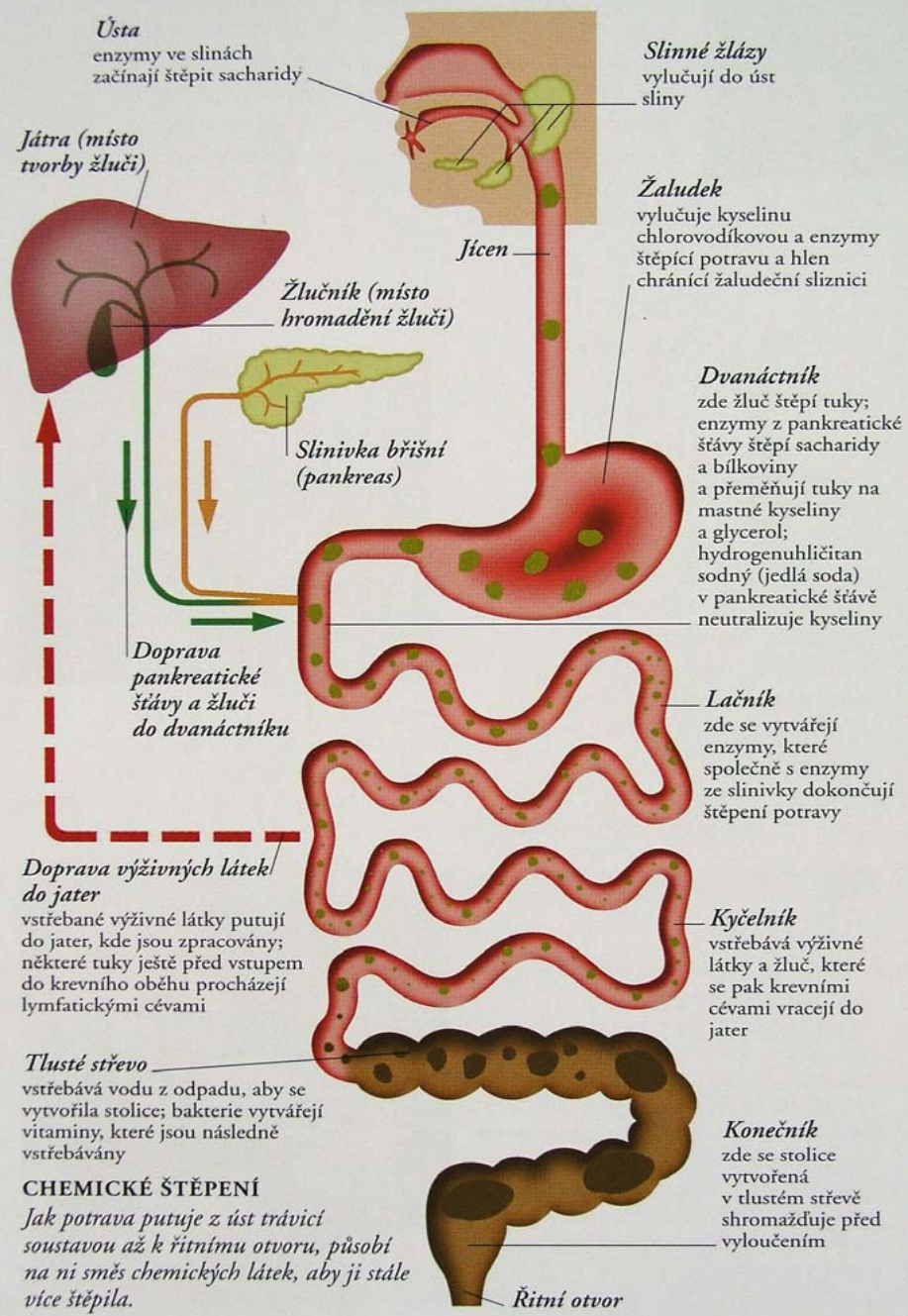
INTRAKCE TOXICKÉ LÁTKY S ORGANISMEM

- **vniknutí do organismu**
 - inhalací dýchacím ústrojím
 - resorpcí přes pokožku
 - orálně
 - jiné cesty (injekcí, ...)
- **pohyb v organismu**
 - penetrace
 - resorpce
 - distribuce a transport k receptoru
 - interakce s receptorem (někdy až po metabolizaci)
 - metabolizace (biotransformace)
 - exkrece a eliminace

Resorpce toxické látky trávicím ústrojím

Faktory ovlivňující způsob a rozsah vstřebávání

- 1) F-CH vlast.látky (hl.rozpustnost)**
- 2) Forma látky (a její vlastnosti)**
- 3) Složení a vlast. trávicích št'áv**
- 4) Vlastnosti povrchu trávicího ústrojí**
- 5) Přítomnost konzumované potravy, složení**
- 6) Rychlost vyprazdňování žaludku, peristaltika střev**
- 7) Nemoci**
- 8) Možná interakce s jiným xenobiotikem**



CHEMICKÉ ŠTĚPENÍ

Jak potrava putuje z úst trávicí soustavou až k řítnímu otvoru, působí na ni směs chemických látek, aby ji stále více štěpila.



VYSTELKA JÍCNU

Drobné záhyby ve výstelce jícnu umožňují této svalnaté trubici, aby se roztáhla a při průchodu potravy z úst do žaludku byla zvlhčena. Tyto záhyby ji také chrání před poškozením.

Jícen

svalová trubice, která spojuje hltan a žaludek; potravu trubicí posunují rytmické stahy

Žlučník

bruskovitý váček; ukládá žluč a pak ji uvolňuje do tenkého střeva

Tenké střevo

pětimetrová trubice skládající se z dvanáctníku, lačnicku a kyslíčniku; spojuje žaludek s tlustým střevem



SPOJENÍ STREV

Tenké střevo (modře, vlevo) má vystelku plnou záhybů, aby se co nejvíce zvýšilo vstřebávání výživných látek, zatímco vystelka tlustého střeva (žlutě) je plošitá.

Slepé střevo

krátká široká část tvořící první část tlustého střeva

Cervovitý přívesek (apendix)

výběžek vycházející ze slepého střeva bez žádné známé funkce

TRÁVICÍ SOUSTAVA

Tato složitá soustava se skládá z trávicího traktu a příslušných orgánů. Trávicí trakt tvoří ústa, jícen, žaludek, tenké a tlusté střevo a řiť. K příslušným orgánům patří játra, slinivka a žlučník.

Jazyk

Zuby

Ústa
rde začíná
trávicí
soustava

Průdušnice
při polykání se uzavírá

Hltan
spojuje ústa
s jícnem
a hrtanem

Slinné žlázy
každý den do úst
vylučují 1,5 litru slin

pH žaludeční kyseliny

Kyselina chlorovodíková vylučovaná žaludečními žlázami (jedna z nich je na snímku) má hodnotu pH 1,5–2. Je tedy dost silná na to, aby rozpustila tenkou kovovou destičku. V žaludku má kyselina hlavní roli při štěpení potravy na tráveninu (polotekutou hmotu). Aby kyselina žaludek nepoškodila, je sliznice chráněna hlenem, který také vylučují žaludeční žlázy.



Játra

největší vnitřní orgán; každý den tvoří až litr trávicí šťávy (žluči)

Žaludek

vak ve tvaru písmene J; každý den vylučuje tři litry trávicích šťáv; které pomáhají se štěpením potravy; vede do tenkého střeva

Slinivka

každý den vylučuje 1,5 litru trávicí šťávy do tenkého střeva; šťáva se skládá z enzymů štěpících sacharidy, bílkoviny a tuky

Tlusté střevo

metr a půl dlouhá trubice připojená k tenkému střevu, skládá se ze slepého střeva, tračnicku a konečníku

Kyčelník

poslední část tenkého střeva

Konečník

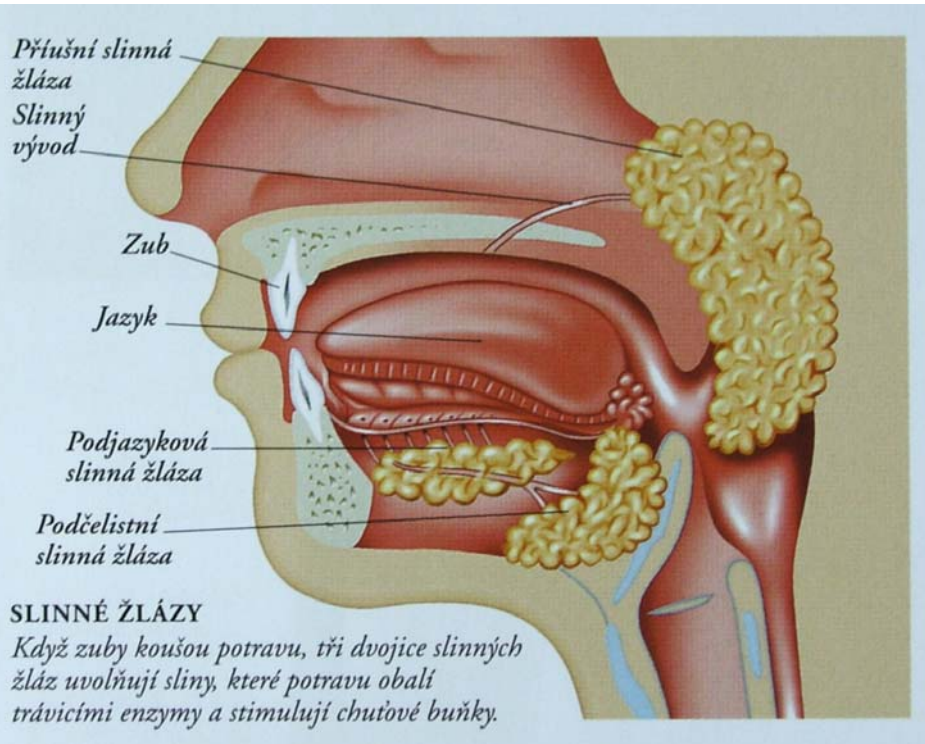
poslední část tlustého střeva (měří asi 12 cm), kde se před vyloučením ukládá stolice

Dutina ústní

- pH~7
- sliznice – biomembrána propustná pro lipofilní a neionizované látky
- vstřebávání – rychlé, přímo do krevního oběhu (mimo játra- není biotransformace)

Žaludek

- pH~1-3
- sliznice – biomembrána mezi kyselým a slabě alklickým prostředím(krevní plazma) – lepší propustnost pro lipofilní látky slabě kyselé povahy
- doba zdržení v žaludku – podle charakteru obsahu – 3-5 hod. – chemické změny látek



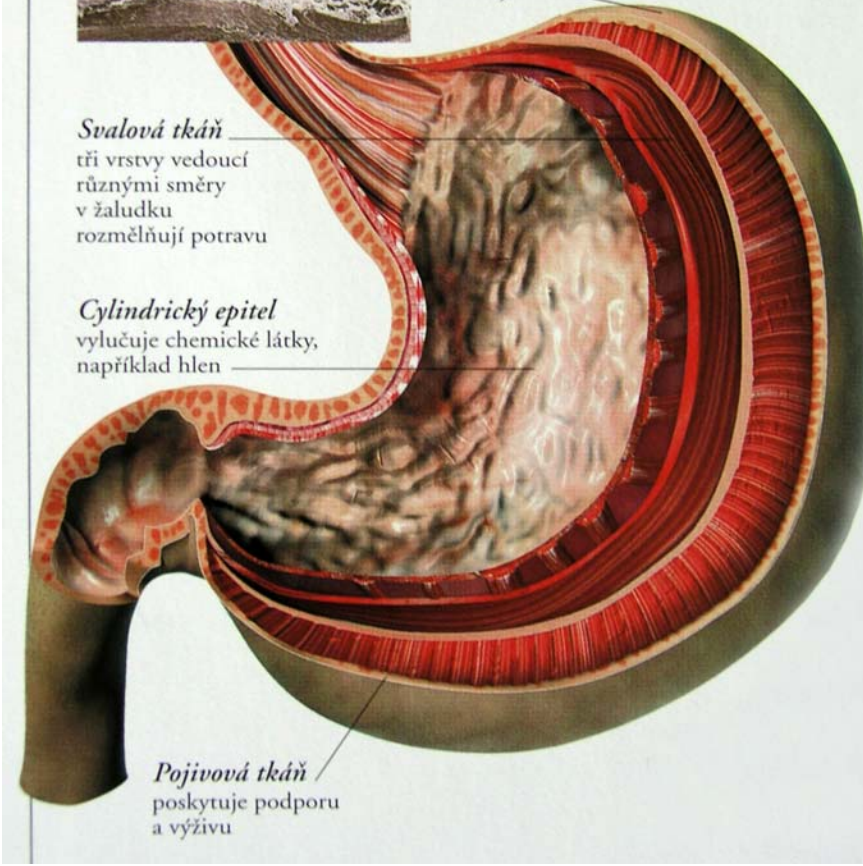
ŽALUDEČNÍ SLIZNICE
 Tento průřez záhybem žaludeční sliznice ukazuje svalovou tkáň (dole), pojivovou tkáň (kužel uprostřed) a epitelovou tkáň (obklopující kužel).

Ploché epitel
 poskytuje ochranu a snižuje tření

Svalová tkáň
 tři vrstvy vedoucí různými směry v žaludku rozmělnují potravu

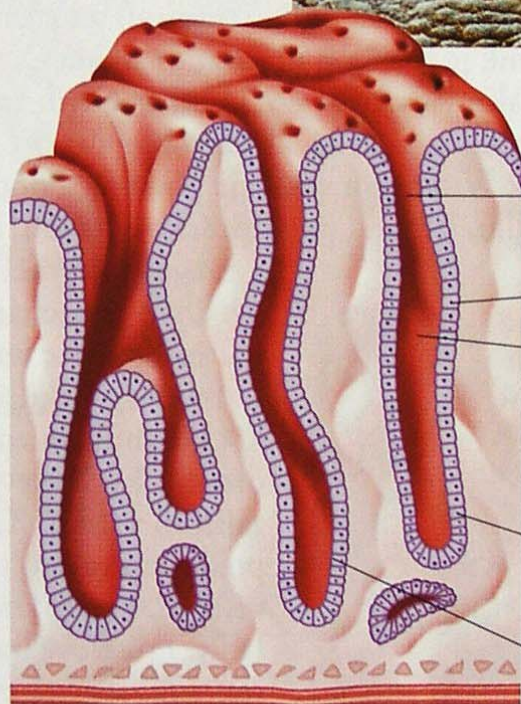
Cylindrický epitel
 vylučuje chemické látky, například hlen

Pojivová tkáň
 poskytuje podporu a výživu



SLIZNICE

Na tomto snímku je povrch sliznice (mukózy), vrstvy žaludku vytvářející hlen. Tmavé dirky jsou žaludeční jamky, kterými se na povrch dostávají kyselé šťávy.



Žaludeční jamka
ve spodní části těchto jamek jsou žaludeční žlázy

Buňka vytvářející hlen

Žaludeční žláza
vylučuje kyselinu chlorovodíkovou a enzymy tvořící žaludeční šťávy

Buňka vytvářející enzymy

Buňka vytvářející kyselinu

ŽALUDEČNÍ SLIZNICE

Vnitřní sliznice žaludku je uspořádána do velkých záhybů. Tato sliznice obsahuje buňky vylučující ochranný hlen, aby žaludek náhodou nenatrávil i sám sebe. Je tam také mnoho buněk a žláz, které vylučují trávicí šťávy a enzymy.

Tenké střevo

- velká plocha členitého aktivního povrchu - cca 10 m²
- sliznice – biomembrána s malým počtem pórů, propustná pro lipofilní a neionizované látky, lépe slabé báze
- doba zdržení – podle charakteru obsahu – 3-5 hod.
- nejintenzívnější vstřebávání

Tlusté střevo

- plocha aktivního povrchu - cca 0,5 - 1 m²
- sliznice – biomembrána s velmi malým počtem pórů, propustná pro lipofilní látky
- doba zdržení – podle charakteru obsahu – 8-14 hod.
- minimální podíl resorpce

Tenké střevo

STŘEVNÍ KLIČKY

Kontrastní látka baryum zvýrazňuje kličky tenkého střeva, které propojují žaludek a horní část tlustého střeva. Tenké střevo je dlouhé zhruba 5 m.



STAVBA TENKÉHO STŘEVA

Stěna tenkého střeva má čtyři vrstvy: vnější serózu, svalovou vrstvu, podslizniční vrstvu a sliznici.

Seróza
vnější ochranná vrstva

Podslizniční vrstva
obsahující krevní cévy a nervy

Svalová vrstva
s vnějšími podélnými a vnitřními kruhovými svalovými vlákny

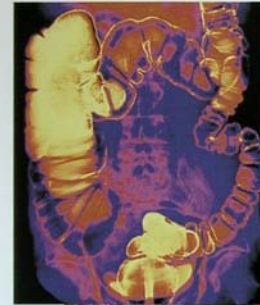
Klk
zvětšuje povrch sliznice

Sliznice
vnitřní vrstva, která vstřebává živiny výběžky zvanými klky

Tlusté střevo

ZÁKRUTY TLUSTÉHO STŘEVA

Slepé střevo a první část tračnicku jsou na tomto snímku jasně žluté (vlevo); tlusté střevo potom obloukem po směru hodinových ručiček směřuje do konečníku (dole).



STAVBA TLUSTÉHO STŘEVA

Tlusté střevo má větší průměr než střevo tenké, také má méně vyvinutou svalovou vrstvu.

Seróza
Tenká vnější ochranná vrstva

Svalová vrstva
Pevná vrstva, která stolici promíchává a posouvá kupředu.

Sliznice
Vylučuje hlen a vstřebává minerální látky.

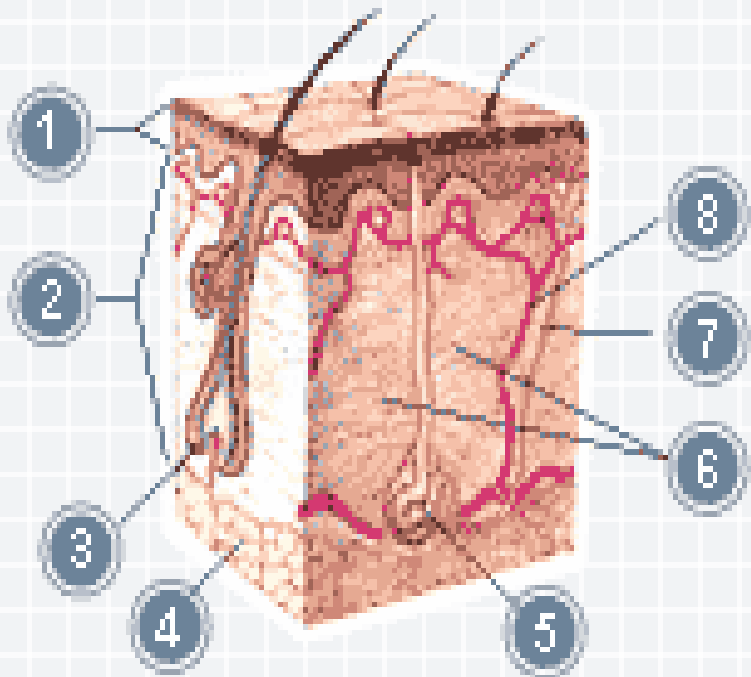
Podslizniční vrstva
Obsahuje krevní cévy a nervy.

ŘASY V TRAČNÍKU

Trojúhelníkové řasy v tračnicku (hlavní části tlustého střeva) se stahují, aby trávěnou potravu posunovaly dále.

Resorpce toxické látky přes pokožku (dermální penetrace)

- **Povrchový tukový film**
- **Epidermis – zevní zrohovatělá vrstva**
 - **vnitřní nezrohovatělá vrstva buněk**
 - **biomembrány**
- **Škára – porézní, krevní a lymfatické vlasečnice**
 - **jednoduchá difuze**
 - **průnik přes mazové žlázy (lipofil.l.)**
 - **průnik přes potní žlázy (hydrofil.l.)**
 - **poškození kůže – ovlivnění průchodnosti**
 - **poleptání, protržení – usnadnění penetr.**
 - **seškvaření, zuhelnatění – znesnadnění penetr.**

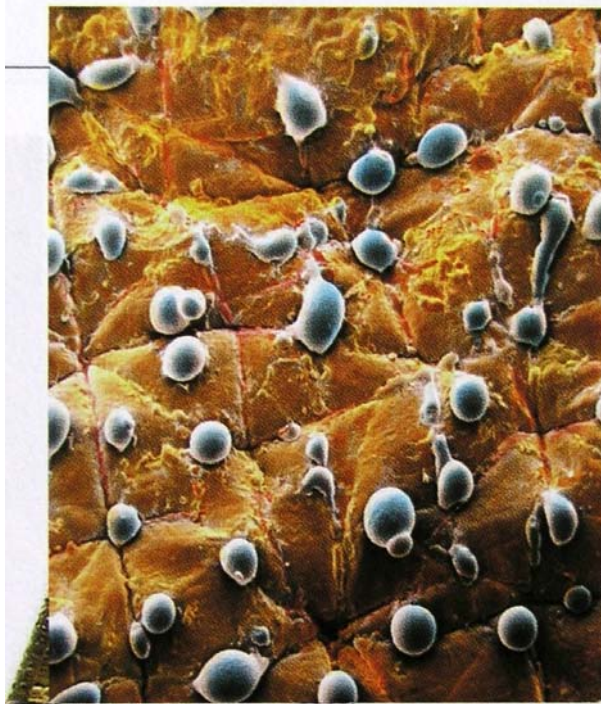


1. **Epiderma**
2. **Derma**
3. **Vlasový folikul
s mazovou žlázou**
4. **Podkožní tuková tkáň**
5. **Potní žláza**
6. **Vazivo**
7. **Senzitivní nervy**
8. **Cévní zásobení**



ODLUPUJÍCÍ SE KŮŽE

Tyto vrstvy buněk na vnějším povrchu kůže se opotřebovávají a postupně odlupují. Na jejich místo se přesunou nové buňky vznikající v nižších vrstvách.



KAPKY POTU

Když je tělu moc horko, žlázy vylučují pot na povrch kůže. (Na obrázku jsou kapičky potu modře.) Když se pot vypařuje, teplo je odčerpáváno a tím se tělo ochlazuje.

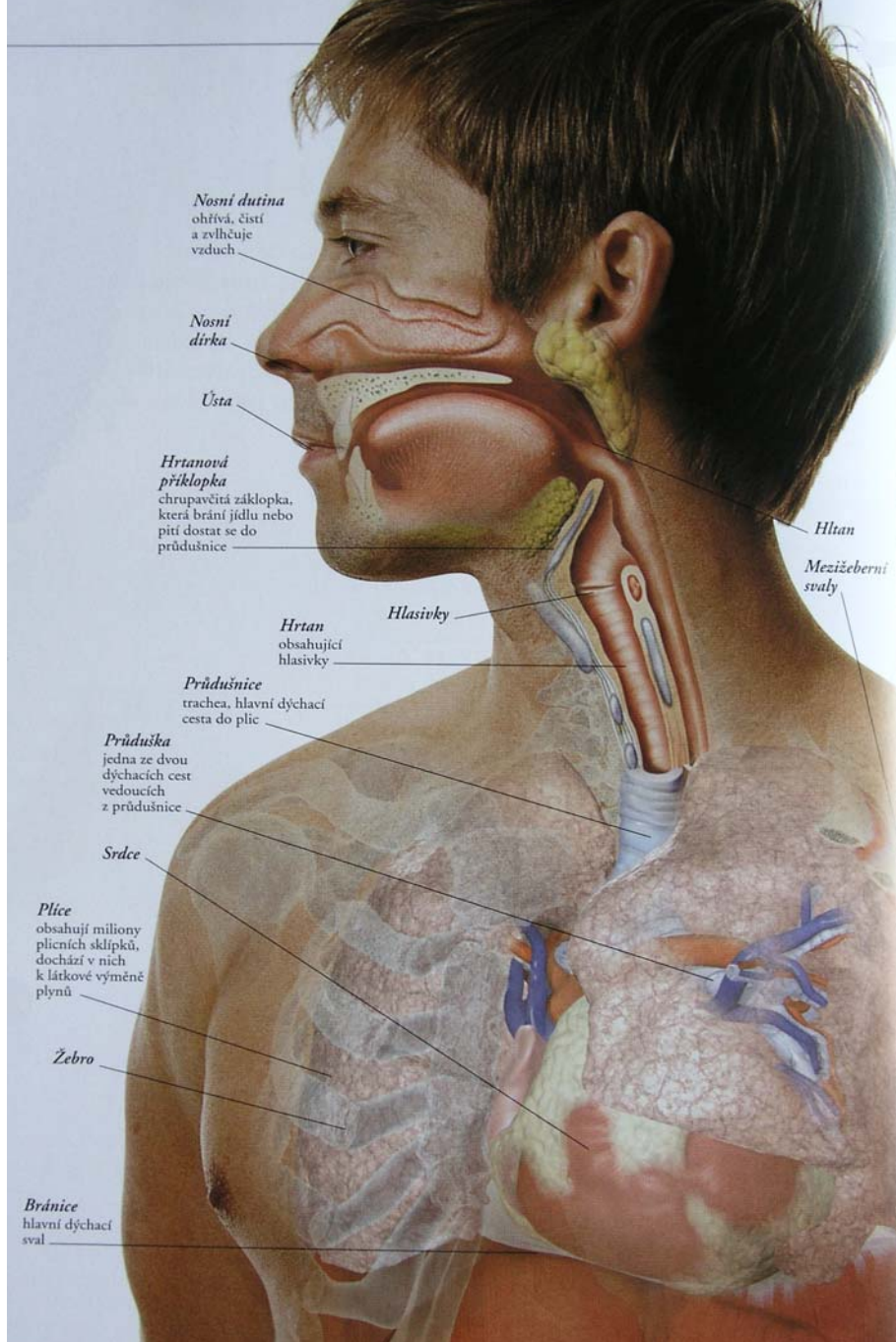
Resorpce toxické látky respiračním ústrojím (inhalační penetrace)

Resorpce nosní sliznicí

- lipofilní membrána s póry – difuze - lipofil.l,
 - prostup póry – hydrofil.l.
- možnost zachycení na sliznici – lokální působení (záněty zduření...)

Resorpce v průduškách a plicích

- hloubka průniku ~ velikosti částic
 - plyny a páry – až do plic.sklípků
 - aerosoly < 2 μ m – do plic.sklípků
 - > 2 μ m – do průdušek (záchyt sliznicí)



Nosní dutina
ohřívá, čistí
a zvlhčuje
vzduch

**Nosní
dírká**

Ústa

**Hrtanová
přiklopka**
chrupavčitá zátkolpka,
která brání jídlu nebo
pití dostat se do
průdušnice

Hrtan
obsahující
hlasivky

Průdušnice
trachea, hlavní dýchací
cesta do plic

Průduška
jedna ze dvou
dýchacích cest
vedoucích
z průdušnice

Srdce

Plice
obsahují miliony
plicních sklípků,
dochází v nich
k látkové výměně
plynů

Žebro

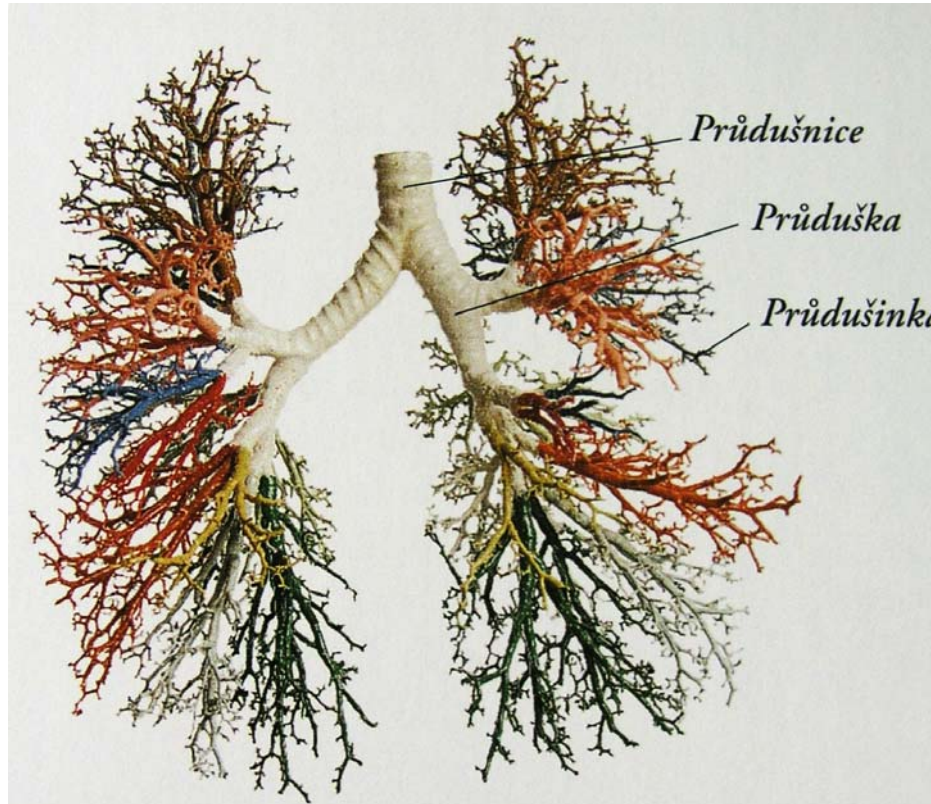
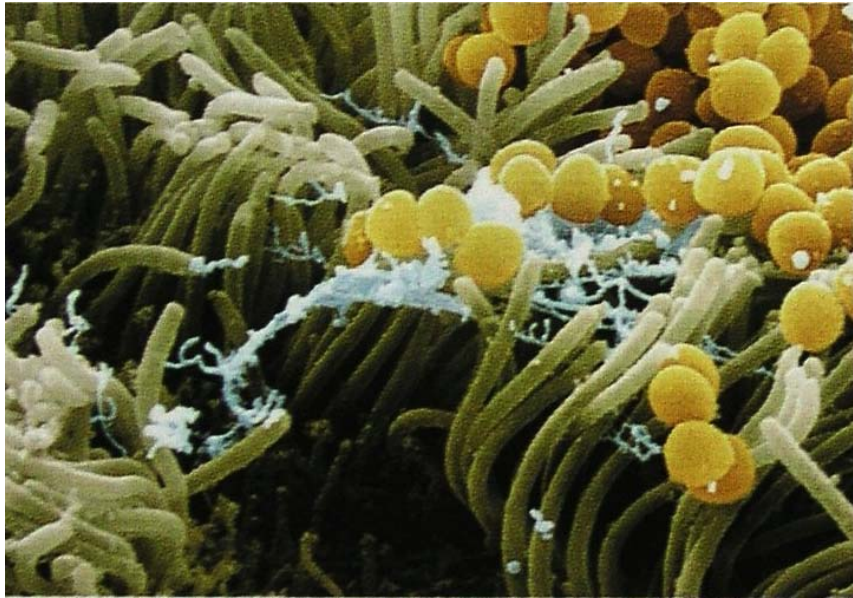
Bránice
hlavní dýchací
sval

Hltan

**Mezižebemí
svaly**

Hlasivky

Nosní sliznice

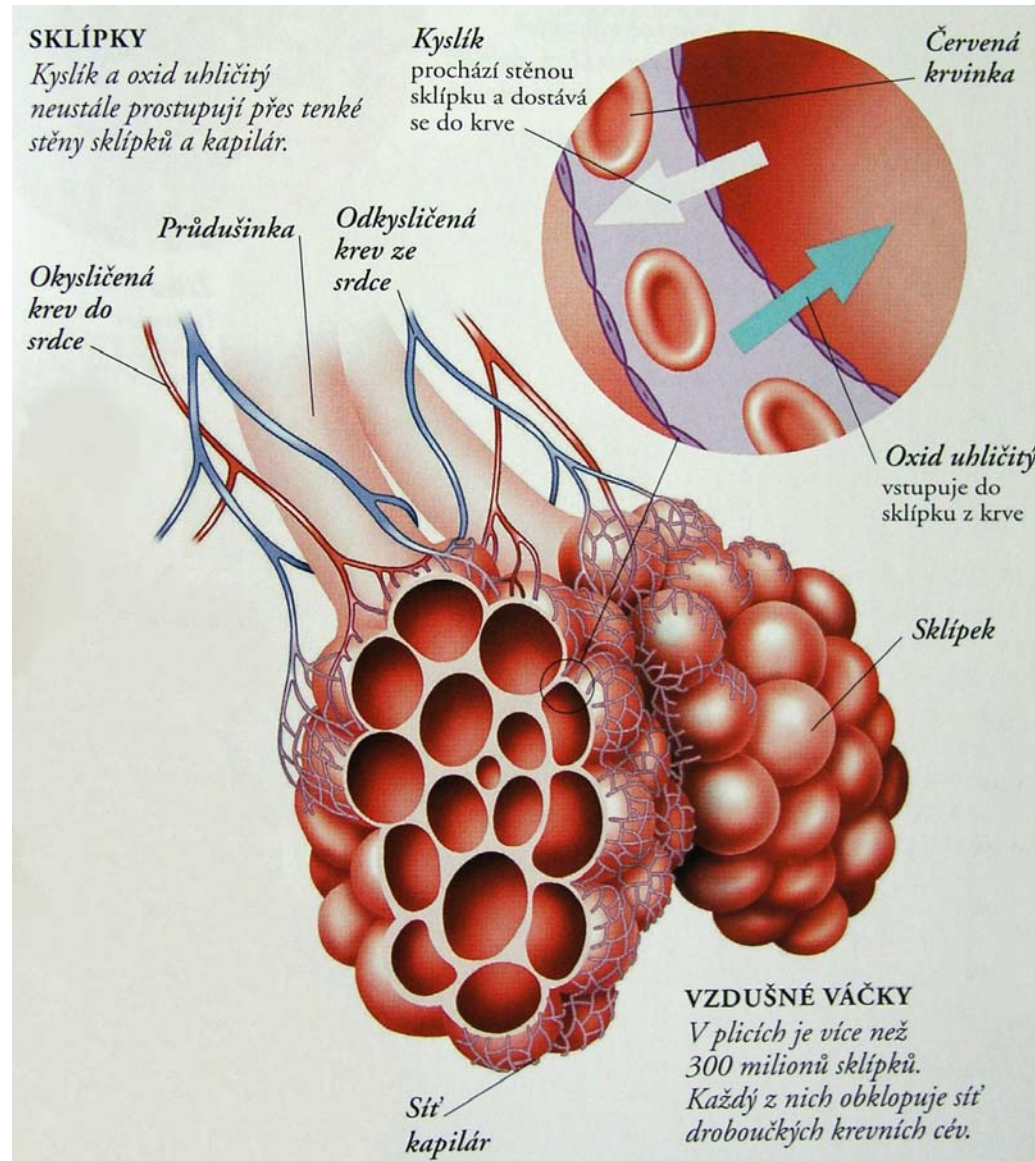


DÝCHACÍ CESTY V PLICÍCH

Největší dýchací cestou je průdušnice, ta se větví na dvě menší průdušky, které opakovaným dělením postupně přecházejí v průdušinky.

Plícní sklípky

- velký aktivní povrch - cca 90 m²
- biomembrána s velkým množstvím pórů
- prostupují lipofilní i hydrofilní látky
- difuze – přímo do krve



Distribuce toxické látky v organismu

- **rychlost krevního proudu**
- **rychlost přestupu tox.látky z krevního řečiště do tkáňových tekutin**
- **rychlost průniku z tkáňových tekutin do tkáňových buněk**

Proudění krve

Cervená krvinka může celé tělo oběhnout za méně než 20 sekund. Za den celkem urazí až 19 000 km, což je čtyřnásobek vzdálenosti z východního na západní pobřeží USA. Na tomto řezu aortou (největší tepnou v těle) vidíme pružnou několikavrstvou stěnu tepny (bíle), která rytmickými stahy usnadňuje rychlé proudění krve.



TEPNY DO MOZKU

Mozek zásobují větve krkavice (dolní část obrátka, ve tvaru písmene ypsilon) a obrátlové tepny. Mozek spotřebovává asi pětinu kyslíku přijímaného tělem.

Horní dutá žíla

dopravuje odkysličenou krev z horní části těla do srdce

Plicní žíla

přivádí
okysličenou krev
z plic do srdce;
jedná žíla
dopravující
okysličenou krev

Srdce

čerpá krev
do celého těla

Dolní dutá žíla

dopravuje odkysličenou
krev ze spodní části těla
do srdce

Stehenní tepna

Stehenní
žíla

Spánková tepna

Spánková žíla

Jugulární žíla

Krkavice (karotida)

Aorta

hlavní tepna vycházející
ze srdce; rozvádí
okysličenou krev
do všech částí těla

Podpažní tepna

Podpažní žíla

Plicní tepna

přivádí odkysličenou
krev do plic; jediná
tepna v těle, která
přenáší odkysličenou
krev

Sestupná aorta

část aorty; která
rozvádí okysličenou
krev do dolní části těla

Ledvinná žíla

odvádí
přefiltrovanou
krev z ledvin
do dolní duté
žíly

Ledvinná tepna

přivádí krev
do ledvin
z aorty

Kyčelní tepna

Vřetenní tepna

Kyčelní žíla

Povrchový
dlaňový oblouk

TEPNY V RUCE

Tento rentgenový
snímek ukazuje
síť tepen v ruce,
která je
zřetelná
kontrastní látkou.

Dynamika distribuce

- po vstupu látky do krev.oběhu – rozvod v celém těle
- difuze, filtrace – do tkání, mix. s krevní plazmou (závisí na intenzitě prokrvení)
 - max. – ledviny, játra, mozek, srdce, slezina, žaludek, střeva
 - min. – tukové a pojivové tkáně
- v krvi rozdělení mezi :
 - leukocyty, erythrocyty
 - plazmatic. bílkoviny (reverzibilní vazba)
 - plazmatic. voda (rozpuštění)

Ustálení dynamické rovnováhy

Mechanizmy vazby na plazmatické bílkoviny

- Iontová vazba
- Vodíkový můstek
- Dipólová vazba
- Hydrofóbní vazba
- Kovalentní vazba

závislost na : pH

**koncentračních změnách
složení plazmat.bílkoviny
přítomnost dalších látek**

Vznik komplexů – velká hm., menší lipofilita

- neprostupují membránou (blokace tox. látky)
- neprostupují do intracelulárních prostorů (nedochází k enzymatické detoxikaci)
- možný deponovaný účinek

Přeměny toxických látek v organismu (biotransformace xenobiotik)

Pomocí membránově vázaných nespecifických enzymů v hladkém endoplazmatickém retikulu buněk – přeměna na látky hydrofilní, polárnější, rozpustné ve vodě.

Účinek na toxicitu

- inaktivace (detoxikace)**
- aktivace (hl. u genotoxických látek)**

Lokalizace

- játra**
- plíce, svaly, ledviny**
- žaludek, střevní stěna**

Ovlivnění

- **pohlaví, věk, výživa, stres, teplota, denní rytmus, fyzická zátěž, přítomnost jiných látek**

Indukce enzymatického systému

- **stimulace syntézy enzymů (opakované dávky – vyšší koncentrace – toxikokinetická tolerance)**

Inhibice enzymatického systému

- **snížení aktivity enzymů (nižší detoxikace)**

Vylučování toxických látek z organismu

- **ledviny**
- **játra**
- **plíce**
- **žlázy**

Biotransformace toxických látek v organismu

- I. Fáze – asyntetická – enzymatická katalýza (vznik látek hydrofilních)**
 - oxidace**
 - redukce**
 - hydrolýza**

- II. Fáze – syntetická (konjugační) – konjugace s glycinem nebo kys.glukuronovou (acetylace, sulfonace....) vylučování z organismu**

Příjem:

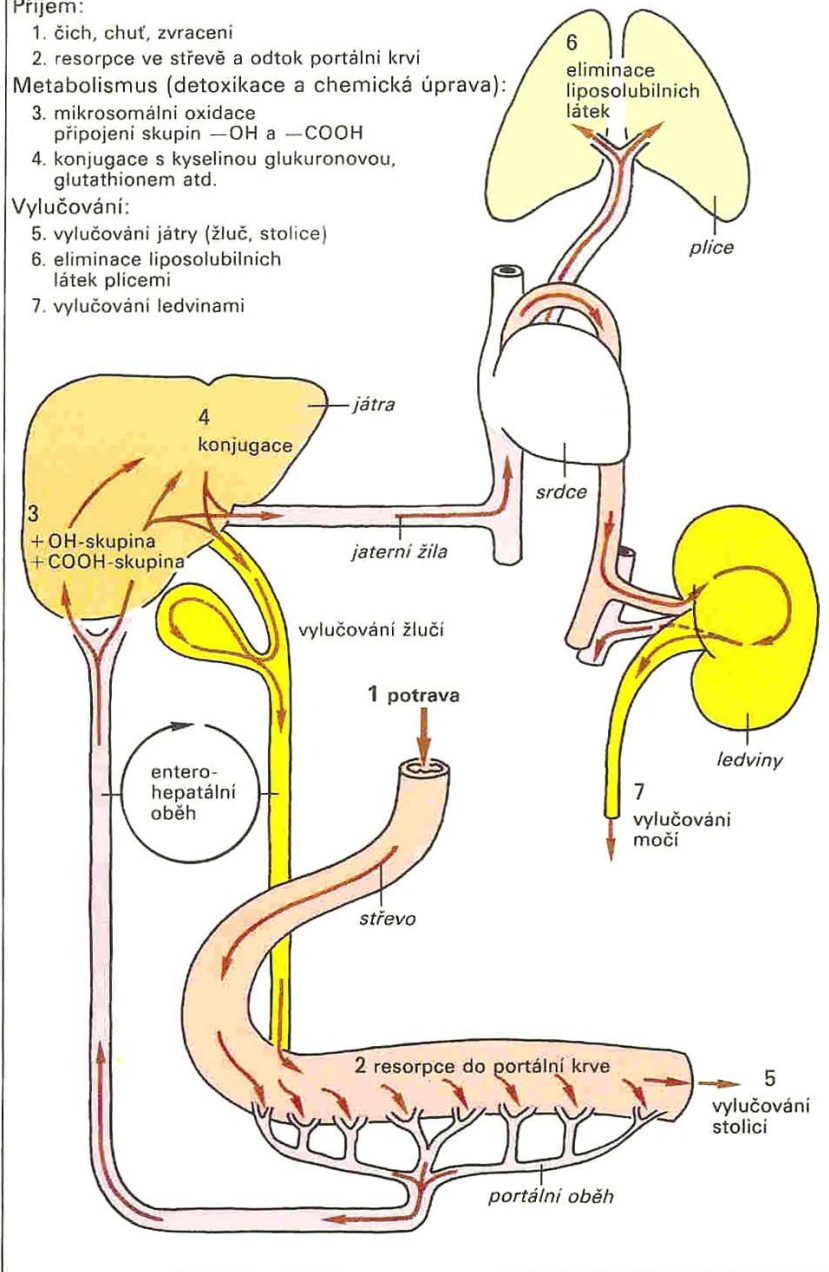
1. čich, chuť, zvracení
2. resorpce ve střevě a odtok portální krvi

Metabolismus (detoxikace a chemická úprava):

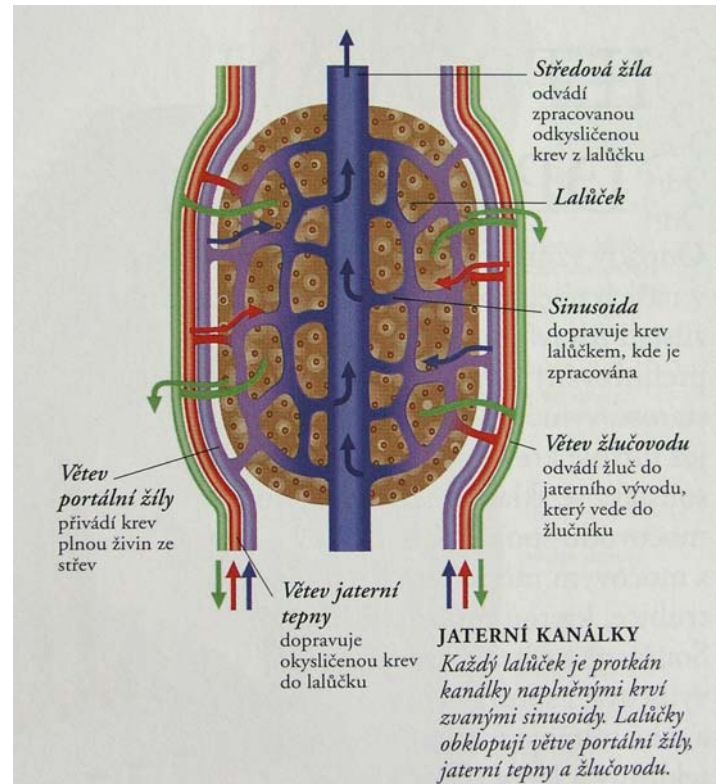
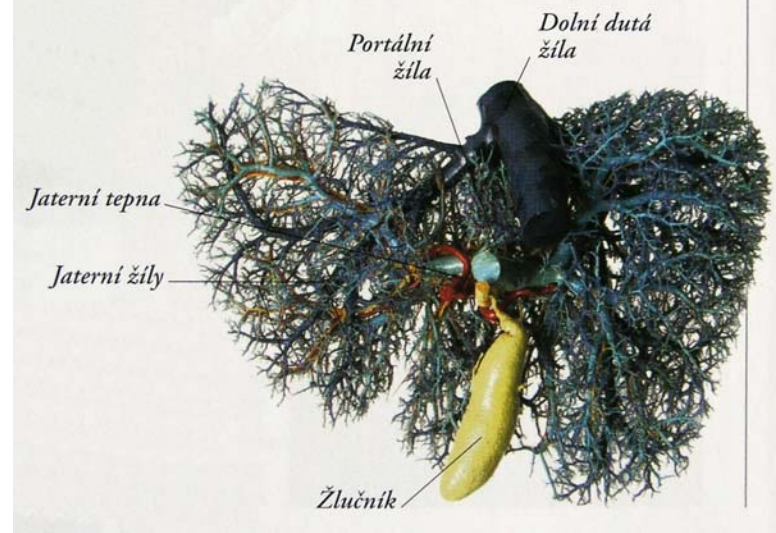
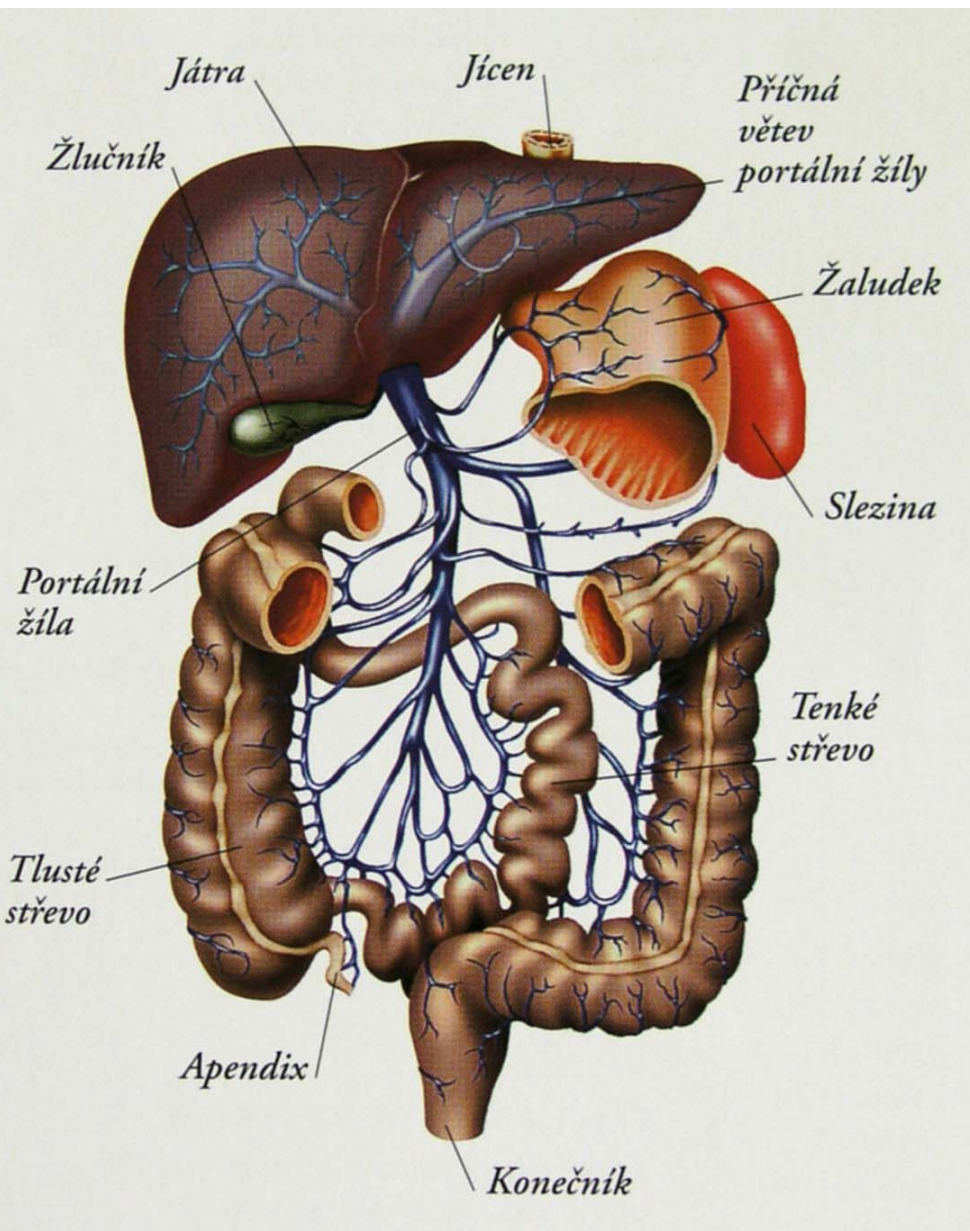
3. mikrosomální oxidace
připojení skupin —OH a —COOH
4. konjugace s kyselinou glukuronovou,
glutathionem atd.

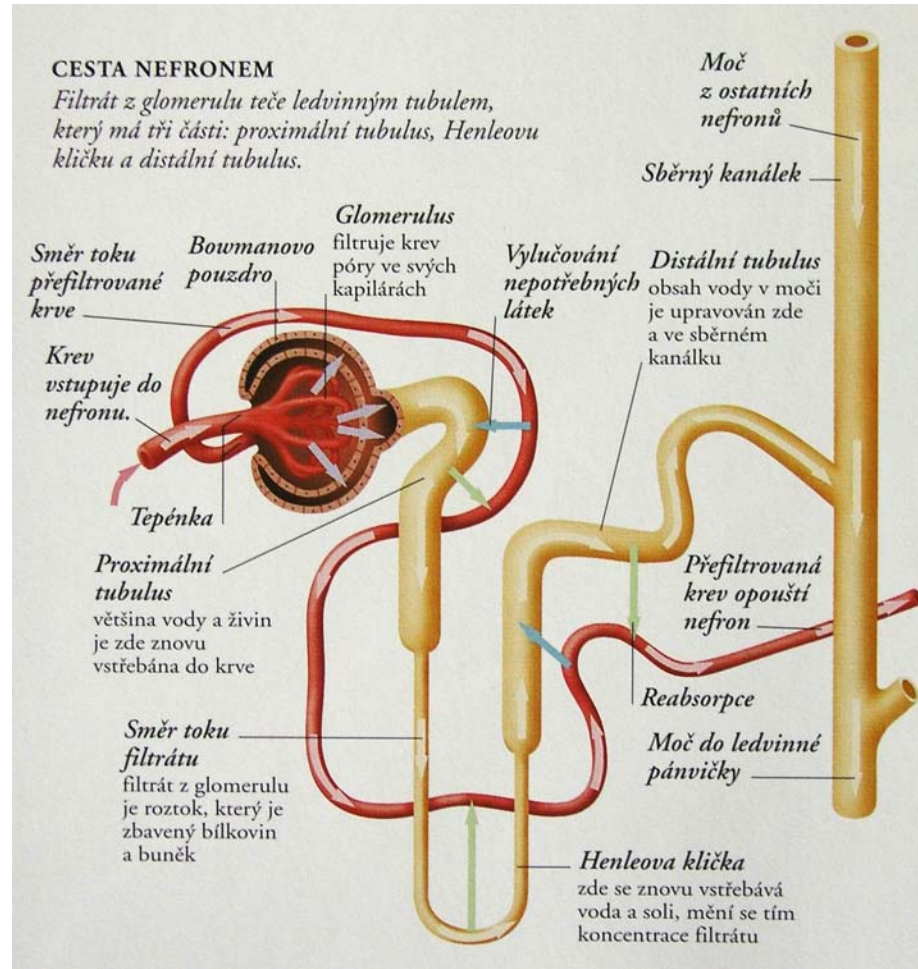
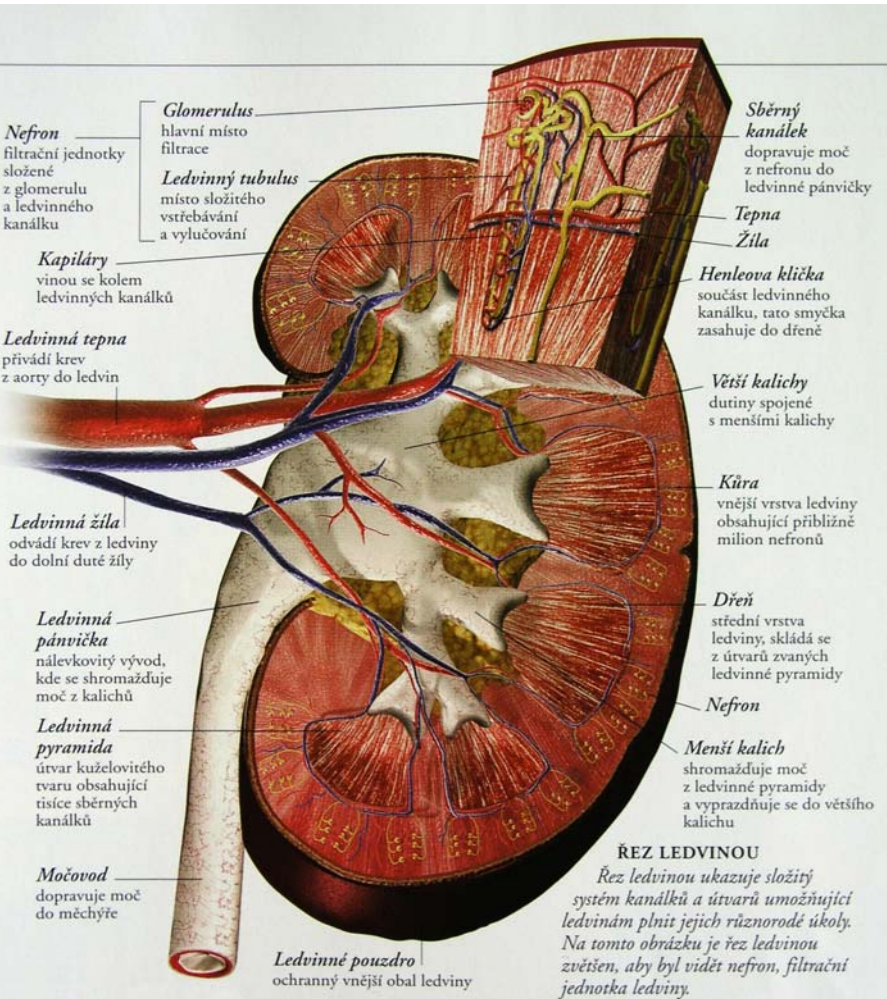
Vylučování:

5. vylučování játry (žluč, stolice)
6. eliminace liposolubilních
látek plicemi
7. vylučování ledvinami



A. Mechanismy selekce, detoxikace a vylučování





CHEMICKÁ KARCINOGENEZE

r.1775 – *Percivall Pott* – rakovina kominíků

(expozice kouři a zplodinám hoření)

20.stol.- *Yamagiva a Ichikava* - exp.potvrdili

(dermální aplikace dehtu – myši, králíci)

- *Kinosita* (experimentální karcinogen „máslová žlut“ N,N-dimethyl-4-aminoazobenzen)

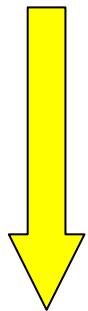
Důkazy karcinogenity

- pokusná laboratorní zvířata (dlouhodobé pokusy, identifikace histopatologicky, hematologicky)
- epidemiologické studie (skupiny obyvatel, pracovníků)
- rychlometody „in vitro“

Dělení podle molekulárního mechanismu působení

látky působící bez metabolické aktivace (alkylační a arylační činidla)

látky působící až po metabolické aktivaci (mění se na I.elektrofilní – napadají nukleofilní receptor – DNA, RNA, proteiny... kovalentní vazbou vznikají „alterované molekuly“)



chemický karcinogen (prekarcinogen)

aktivní chem.karcinogen (elektrofilní)

kritická biomakromolekula

neoplastie (maligní buňka) (*reverzibilní děj*)

reverze - *absolutní* – buňka v původní podobě

Alkylační činidla – kovalentní vazba mezi elektrofilem a DNA; pouze vymezená místa receptorů

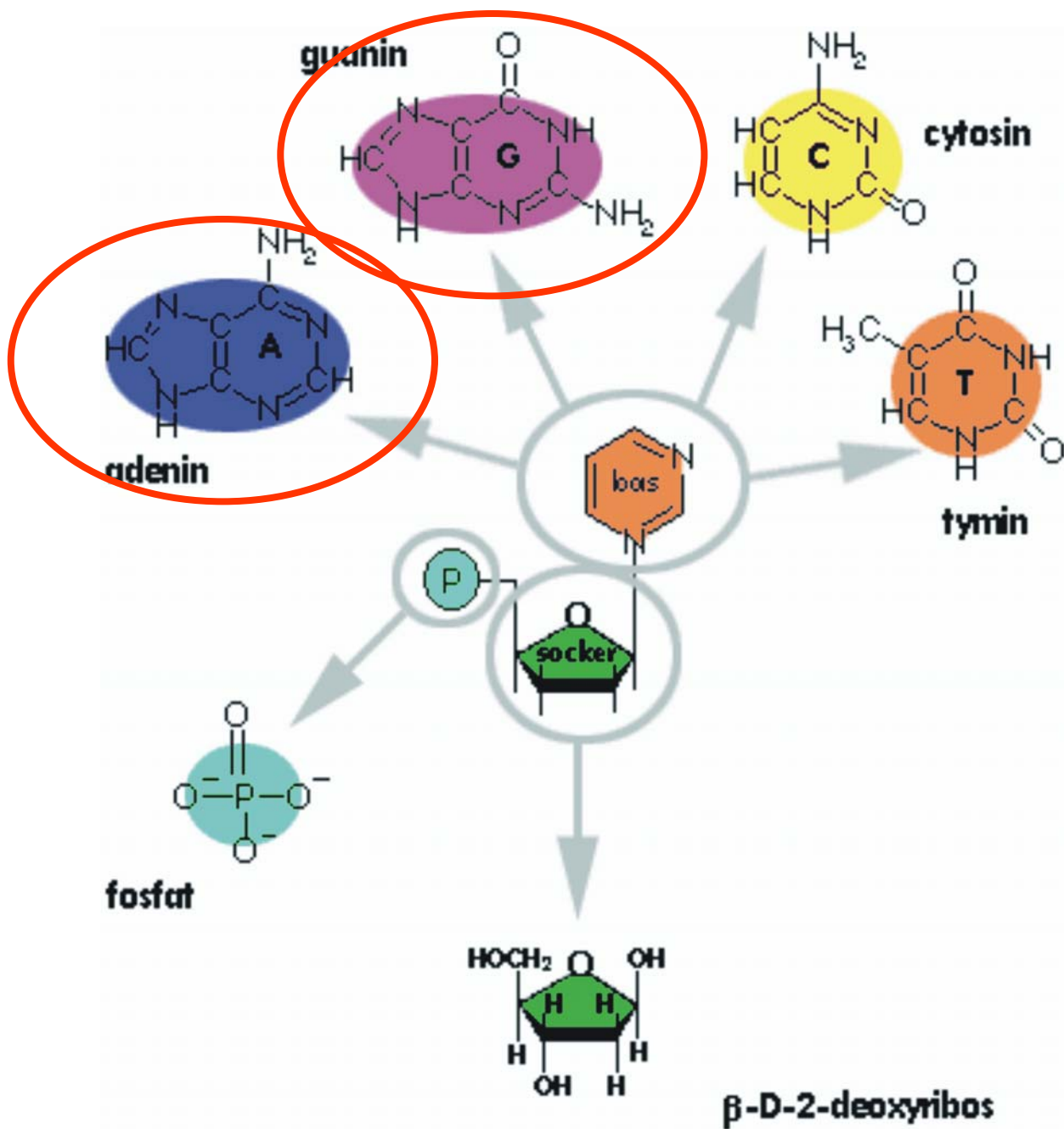
-CH₃ (malý) – proniká snadno do struktury DNA, častý receptor – **atom N** v bázi

-CH₂CH₃ (větší) – proniká hůře, receptor – **atom O**

Alkylace – nukleofilní receptory

Adenin „N³“ – eliminace z mol.DNA - mezery
– možné jednovláknové zlomy

Guanin „O⁶“ – biologicky inertní, nemění konformaci DNA, replikace probíhá, ale vypadnutí báze z DNA (oslabením glykosidické vazby)



Bifunkční alkylační činidla - R -

- obsadí *dva nukleofilní receptory na jiných vláknech DNA* (koval.vazbou) most – „křížová vazba“ (blokáda, denaturace komplementárních vláken DNA (Yperit, triethylmelamin))
- obsadí *dva nukleofilní receptory na stejném vlákně DNA* (koval.vazbou)
- obsadí *jeden nukleofilní receptor na vlákně DNA a druhý např. na chromozomálním proteinu*

Nejčastější alkylační receptory – heteroatomy O, N, S

Interkalace – zvl. stérické uspořádání molekuly karcinogenu – *zasunutí do závitů DNA*

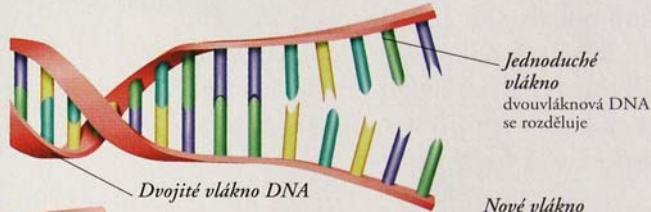
vazba – vodíkovým můstkem (deriváty antrachinonu)

REPLIKACE DNA

Buňky v těle se neustále dělí – jednak v obdobích růstu, ale i kvůli nahrazení poškozených buněk. Než se buňka rozdělí, aby vznikly nové somatické buňky (proces zvaný mitóza *upravo*) nebo vajíčka a spermie (proces zvaný meióza, *viz str. 138*), DNA obsažená v buňce se musí replikovat, zdvojit. Tento proces je umožněn díky schopnosti vláken DNA podélně se rozpojit a oddělit. Obě vlákna původní DNA působí jako šablona, podle které se sestavují nová vlákna.

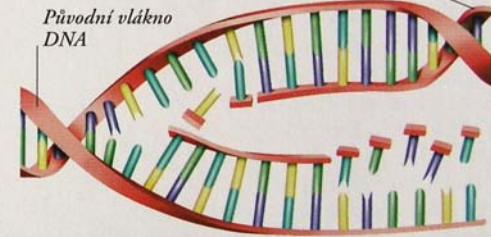
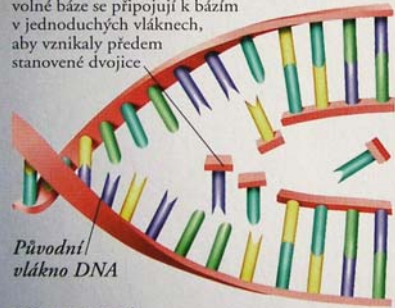
FÁZE PRVNÍ

Původní dvojitá šroubovice DNA se v několika bodech podélně rozděluje. Při tomto procesu vznikají části, kde jsou dvě samostatná jednoduchá vlákna.



Volná báze

volné báze se připojují k bázím v jednoduchých vláknech, aby vznikaly předem stanovené dvojice

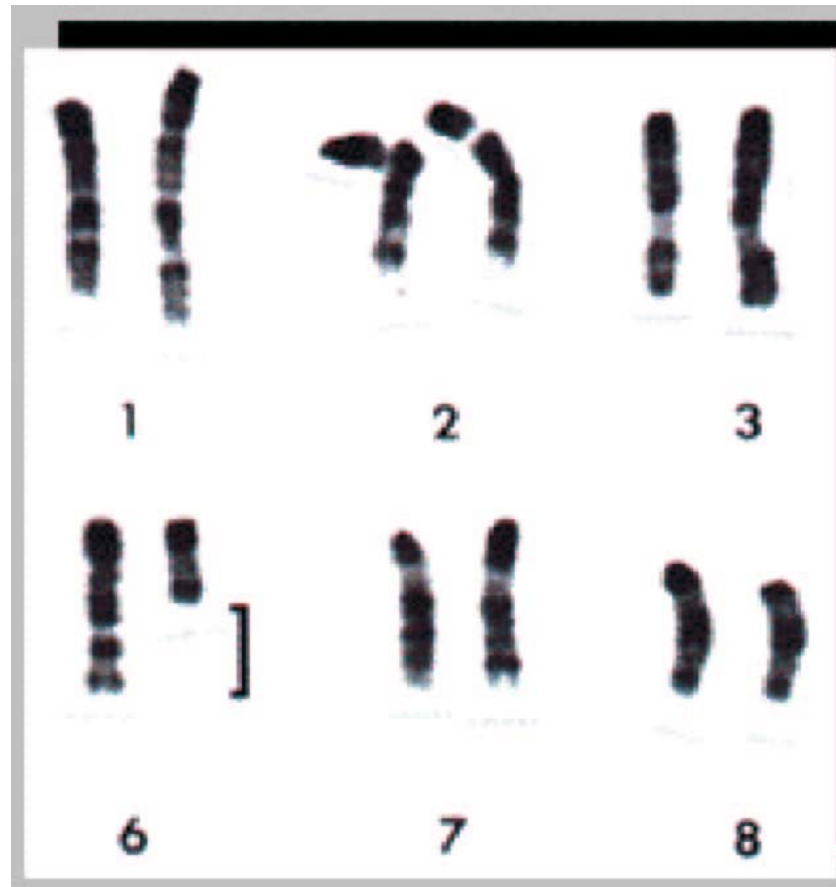


FÁZE DRUHÁ

Volné báze se spojují s oběma jednoduchými vlákny DNA. Pořadí, ve kterém se volné báze k jednoduchému vláknu DNA připojují, je určeno bázemi DNA, které už na jednoduchém vláknu jsou.

FÁZE TŘETÍ

Zatímco se k vláknu připojují báze, začínají se obě nově vzniklá dvojitá vlákna stáčet. Tento proces pokračuje po celé délce DNA, až se nakonec vytvoří dva naprosto stejné dvojitě řetězce DNA.



Doba latence – doba za kterou dojde po expozici ke vzniku prvních souborů nádorových buněk.

Transformace normální buňky na maligní není jednorázovým zásahem do struktury DNA, ale opakovaným působením.

Z hlediska molekulární úrovně karcinogeneze a mutagenese se jedná prakticky o stejnou příčinu, ale různý následek.

Mutagenese – účinky se projeví až v následných generacích

Karcinogeneze – účinky se projevují v původním organismu – změna geneze souborů buněk určité tkáně

Ne všechny chemické karcinogeny jsou mutagenní!

10 : 8

.... Testování pomocí screeningových rychlometod většinou založených na průkazu mutagenity – nemusí být dostatečným důkazem karcinogenních účinků testované látky !

Experimentální toxikologie

„Klasická“ laboratorní zvířata v toxikologické praxi

Myš, potkan, morče, křeček, králík, pes, kočka,
miniprase, slepice, primáti

Nejčastěji používané :

myši	54%
potkani	39%
morčata	2%
králíci	2%
ostatní (psi, kočky, žáby, primáti...)	3%

Charakteristiky používaných laboratorních zvířat

Laboratorní myš (*Mus musculus*, var. *alba*)

- Vyšlechtěny z divokého typu
- hmotnost 30-40g, všežravec
- pohlavní dospělost v 6-ti týdnech
- délka březosti 17-21 dní
- počet mláďat ve vrhu cca 12
- počet vrhu za rok 8-12



Laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*, var. *alba*)

- **Vyšlechtěn z divokého typu křížením s krysou**
- **hmotnost 250-400 g, všežravec**
- **pohlavní dospělost v 12-ti týdnech**
- **délka březosti 19-22 dní**
- **počet mlád'at ve vrhu 8-16**
- **průměrná délka života 3r.**



Morče domácí (*Cavia aperea*)

- m.anglické,
m.habešské,
m.peruviánské
- hmotnost 700-750 g,
- délka březosti 19-22
dní
- počet mlád'at ve
vrhu 1-13



Křeček zlatý-syrský (*Mesocricetus auratus*)

- barevně odlišné
varianty**
- hmotnost 90-100 g,**



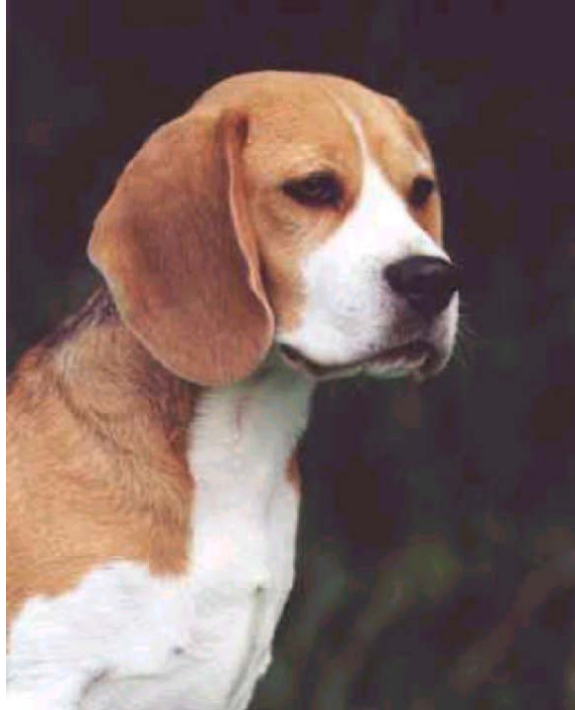
Králík domácí (*Oryctolagus cuniculus*)

- hmotnost 3,5-5 kg
- délka březosti 29-30 dní
- počet mláďat ve vrhu 1-13



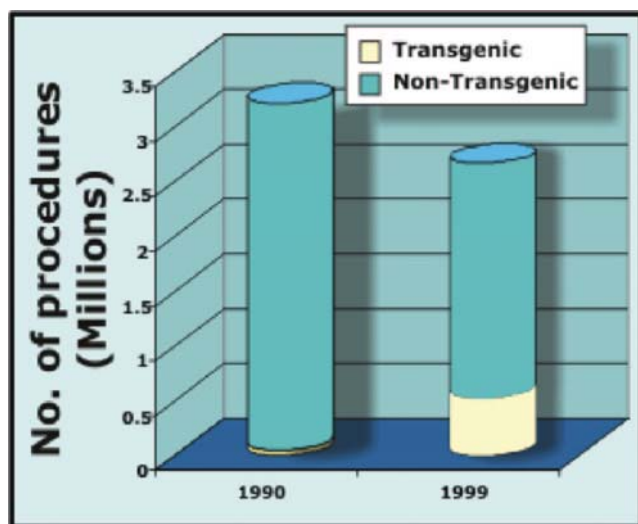
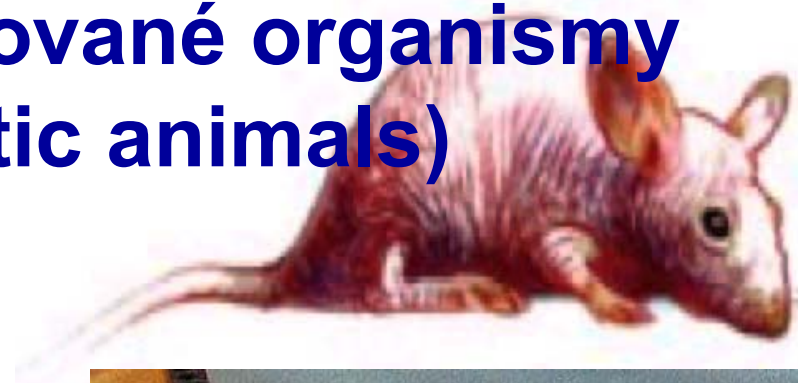
Pes domácí (Canis familiaris)

- nejčastěji plemeno beagle, (v ČR lab.pes Horákův do 80tých let)
- hmotnost 10-15 kg,
- délka březosti 64 dní



Geneticky upravované organismy (transgenetic animals)

- V toxikologii se používají organismy s upravenou citlivostí na studovanou látku – rychlejší průběh pokusu, nižší „spotřeba“ zvířat
- 96% používaných geneticky modifikovaných zvířat jsou myši



Experimentální ekotoxikologie využívá další zvířata a organizmy



Charakteristika laboratorních zvířat

- **Konvenční LZ**

Otevřený chov ve zvěřincích bez bariéry, dodržovaná hygienická pravidla chovu

- **Bariérová LZ (Specific Pathogen Free)**

Chov za přísnou hygienickou „bariérou“ sterilizace pitné vody, potravy i podestýlky

- **Kontrolovaná LZ**

Neúplný bariérový systém (bez patogenních mikroorg.)

- **Gnotobiotická LZ**

Chov v bezmikrobních izolátorech, přesně definovaná mikroflóra

Izolátor – chovné zařízení, vhodné pro sterilizaci, průhledné, oddělený sterilní vstup a výstup, zásobování sterilní potravou, vodou i vzduchem, možnost manipulace



- **Inbrední chov –
úzká příbuzenská
plemenitba**
- **Outbrední (neřízený)
a rhandobrední
(řízený) chov –
nepříbuzenská
plemenitba**



Práce s laboratorními zvířaty

Péče o laboratorní zvířata

- Způsob ustájení**
- Pravidelná kontrola zdravotního stavu**
- Kontrola jakosti krmiva pitné vody a podestýlky**
- Čistota**
- Režim pokusů**

Volba druhu a kmene zvířat

- minimálně 2 druhy, podle charakteru testu
- poměr pohlaví 1:1
- stejný věk jedinců

Velikost pokusných skupin

- podle potřeb statistického zpracování dat
- podle délky testu

Hladina dávek a frekvence expozice

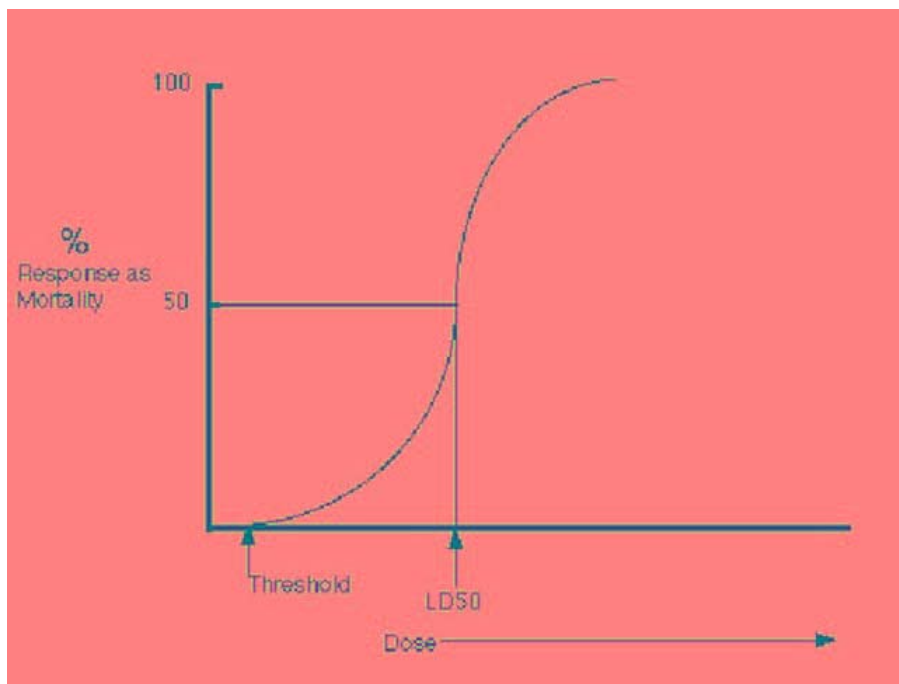
- Nejčastěji tři hladiny dávek
 - nejnižší – detekce intoxikace, ale zachování života
 - střední – odpovídá 1/10 max. dávky
 - maximální – trochu nižší než LD₅₀
- Frekvence – normálně 1x denně

Testy na akutní toxicitu

informace o způsobu toxického působení, zjištění LD₅₀

Akutní orální toxicita (úvodní zkouška)

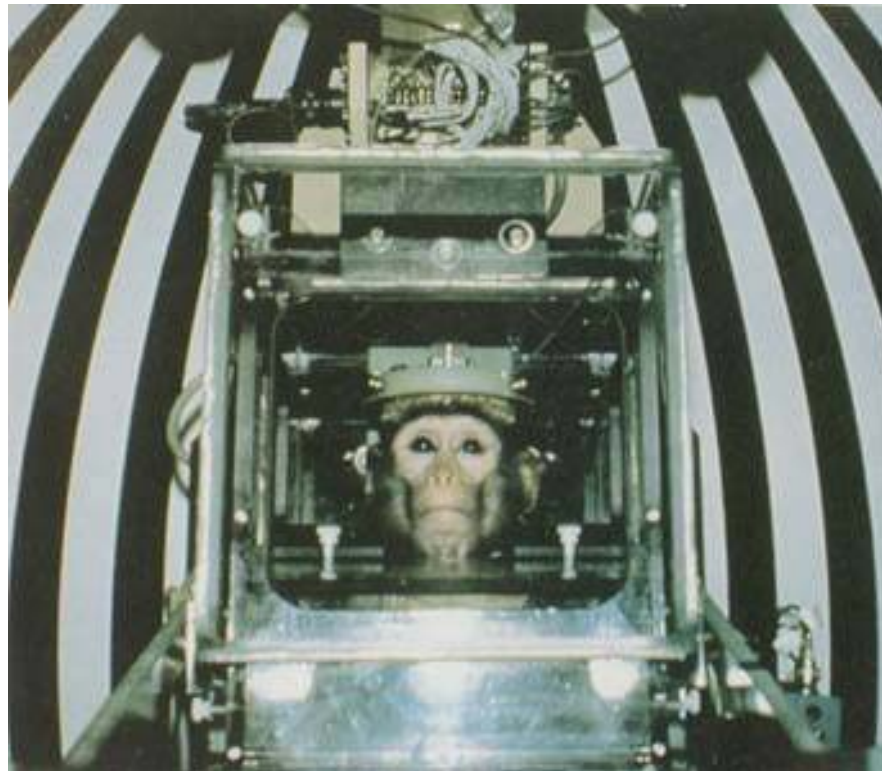
- Škodlivý účinek látky po krátkodobé expozici, nebo po několika dávkách během 24 h
- Dávka – hmotnost aplikované látky / jednotku tělesné hmotnosti lab.zvířete
- Reakce na dávku – vztah mezi tox.účinkem a dávkou
- Střední smrtelná dávka LD₅₀
- Nosič tox.látky – voda, olivový olej...
- Nejvyšší aplikovaný objem 1ml/100g hm (hlodavci)
- Počet dávek – křivka závislosti dávka – účinek
- Doba pozorování – min.14 dnů
- Nejvhodnější zvíře – potkan
- Sledování změn.....(změny chování, vzhledu, hmotnosti



Akutní inhalační toxicita

u plynných látek, par a aerosolů

- Stanovení škodlivých účinků látky v dýchaném vzduchu po jednom nepřerušovaném pokusu expozice**
- LC₅₀ (mg/l)**
- Odstupňované dávky**
- Min. 3 koncentrace**
- Doba expozice ~ 4h v inhalační komoře**
- Znehybnění zvířat**
- Sledování a popis účinků**



Akutní dermální toxicita

- **Škodlivý účinek po krátkodobé dermální aplikaci (mg/kg)**
- **Odstupňované dávky (koncentrace)**
- **Aplikace - na hřbet po depilaci**
 - **plocha cca 10% povrchu těla**
 - **roztok, suspenze, kaše**
 - **zvíře fixováno**
- **Králík, potkan, morče**
- **Sledování a popis účinků**

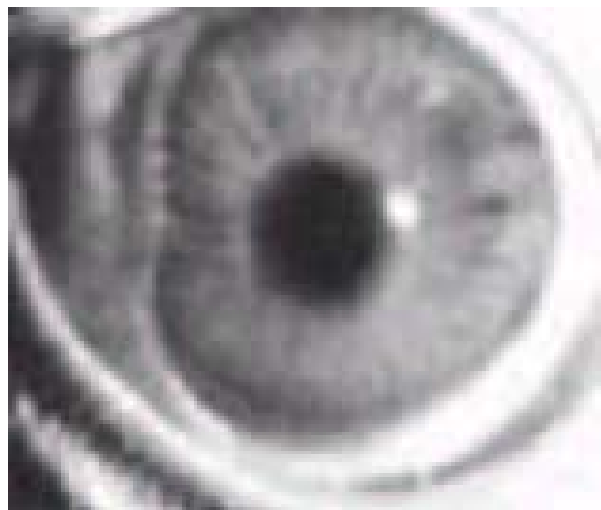
Akutní dermální dráždivost

- **Vznik reverzibilních zánětlivých změn na pokožce (irreverzibilní – poleptání)**
- **Aplikace – na hřbet po depilaci**
 - **plocha cca 6 cm²**
 - **0,5 ml kapaliny, 0,5 g pevné látky**
- **Min. 3 zvířata**
- **Doba expozice 4h, pak omytí a pozorování změn po 30-60 min, 24, 48, 72 hod., až 14 dnů**
- **Stupeň podráždění 1 - 4**



Akutní podráždění oka

- **Škodlivý účinek po aplikaci látky na vnější povrch oka**
 - reverzibilní změny – podráždění
 - irreverzibilní změny - poleptání
- **Informace o působení látky na oči a přilehlé sliznice**
- **Min. 3 zvířata (alb.králíci)**
- **Dávka 0,1ml (kapaliny), 0,1g (pevné l.) aplikace do spojivkového vaku 1 oka, druhé oko – kontrolní, užití lokálních anestetik**
- **Po 24 h omytí vodou, pozorování změn po 1, 24, 48, 72 h (lupa, mikroskop)**



Testy na subakutní toxicitu

28 denní test

Subakutní orální toxicita

- Aplikace látky v potravě, ve vodě, sondou přímo do žaludku**
- Min.10 zvířat (nejčastěji potkani)**
- Min. 3 hladiny dávek**
- Průběžné sledování, vážení**
- Patobiochemické vyšetření, pitevní nálezy, statistické vyhodnocení**

Subakutní inhalační toxicita

- Testované zvíře v atmosféře zkoumané látky
14 nebo 28 dnů
- Náročné technické zabezpečení
 - plynulý denní tok zkoumané látky
 - v atmosféře 19% kyslíku
 - zabránění resorpce přes kůži
- Min.20 zvířat (nejčastěji potkani)
- 3 skupiny pro 3 koncentrační hladiny
- Pozorování změn
- Pathobiochemické vyšetření

Subakutní dermální toxicita

- Škodlivý účinek látky po opakované denní aplikaci
- Stanovení hladiny „nulového účinku“ (max. dávka bez škodlivého účinku – mg/kg)
- Sledování „kumulační toxicity“ škodlivý účinek opakované dávky
- Test. zvíře – morče, králík
- Depilace 10% povrchu těla
- Aplikace – kapalina, kaše, prášek
- Denní pozorování změn na pokožce, srsti, očích, sliznici; pohybové ústrojí, váha, příjem potravy.....

Testy na teratogenitu

- **Trvalé změny(strukturální, funkční) na embryu v období vývoje**
- **Aplikace zkoumané látky v odstupňovaných dávkách po určitou dobu část gravidity pokusných zvířat (organogeneze)**
- **3 skupiny po 20 zvířatech (potkan, myš králík)**
- **5.-15. den po krytí**

Testy na subchronickou toxicitu

90 denní test

- V ČR – spolu s akutní toxicitou - požadovány pro většinu nových chemických výrobků
- Velká vypovídací schopnost
 - poznání cílových orgánů
 - možnost kumulace
 - určení hladiny „nulového účinku“
 - ... bezpečnostní kritéria pro manipulaci s látkami
- 3 hladiny dávek, 20 zvířat
- Pozorování analogické subakutním testům

Test na subchronickou neurotoxicitu

(90 dní)

- **Modelové standardní látky – organofosfáty**
- **Zkoumaná látka – do krmiva, sondou do žaludku**
- **3 skupiny test.zvířat (slepice) po 10ks**
- **3 dávky**
 - **množství, které nevyvolá žádnou reakci**
 - **množství vyvolávající prahový efekt**
 - **množství vyvolávající výraznou neurotoxicitu**
- **Pozorování (abnormality v chování, lokomotorická ataxie, paralýza)**
- **Histopatologické vyšetření**

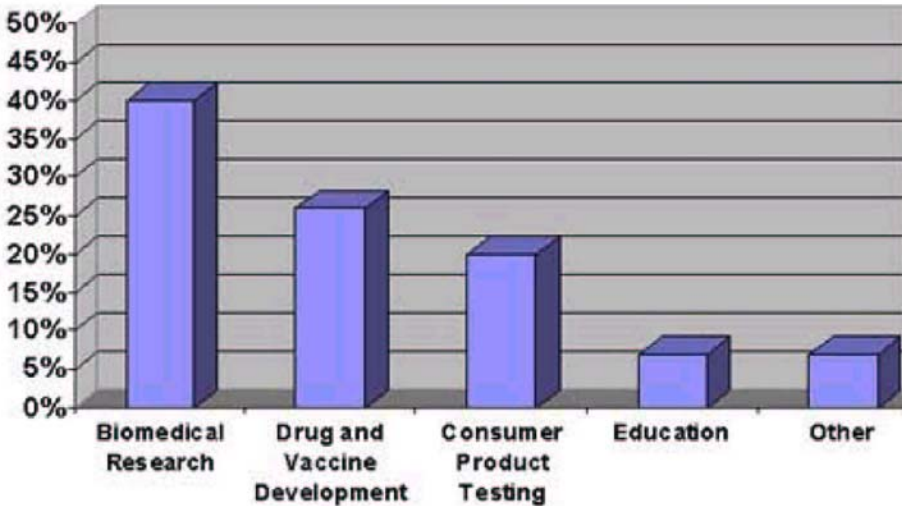
Testy na chronickou toxicitu








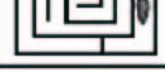
- Metodologie testů – mezinárodní organizace WHO, IARC
- Zjištění kumulačních, mutagenních, karcinogenních a teratogenních vlastností látek,
- Experimentálně náročné, dlouhodobé testy
- Aplikovaná látka – dobře prostudovaná, v dostatečném množství na celou dobu testu (stejná šarže, stejná kvalita)
- Mimořádně dobrá péče o lab. zvířata (sterilizace podestýlky, konstantní klima, pravidelné střídání period den-noc, kvalitní (analyzované) krmivo)
- Minimálně 2 druhy zvířat, 50♂ + 50♀ + kontrolní skupina 50 zvířat (25♂ + 25♀)
- 3 hladiny dávek
 - nízká, na prahu „nulového účinku“
 - střední
 - vysoká, na hranici intoxikace
- Aplikace – orálně, dermálně, inhalačně
- Modelování pracovního prostředí – 5x v týdnu + („volný víkend“)
- Doba testu - potkani 24 měsíců
 - myši, křečci 18 měsíců
- Pozorování, pathobiochemické vyšetření

Nejčastější využívání laboratorních zvířat



Uses of Animals in US Laboratories
(Including rats, mice and birds)



	<p>Acute, Subchronic and Chronic Toxicity Tests</p> <p>Determine the effect of a chemical on health and mortality during various lengths of exposure</p>
	<p>Reproductive Toxicity Tests</p> <p>Assess the effect of a chemical on fertility and fecundity</p>
	<p>Developmental Toxicity Tests</p> <p>Evaluate the capacity of a chemical to cause abnormalities in an embryo, fetus or newborn</p>
	<p>Ocular- and Skin-Irritation Tests</p> <p>Measure the ability of a chemical to inflame or irritate the skin or eyes</p>
	<p>Hypersensitivity Tests</p> <p>Assess the tendency of a chemical to elicit rashes and other allergic responses</p>
	<p>Phototoxicity Tests</p> <p>Determine the extent to which a chemical is activated by sunlight, thereby enhancing its toxicity</p>
	<p>Toxicokinetic Studies</p> <p>Explore the absorption, distribution, metabolism, storage and excretion of a chemical</p>
	<p>Behavioral Tests</p> <p>Monitor the effects of a chemical on cognitive function during development and in the adult</p>

Ministerstvo životního prostředí

Dne: 7. ledna 2002

Čj: 199/OER/02

Ministerstvo životního prostředí na základě kontroly dodržování zásad správné laboratorní praxe vydává podle zákona č. 157/1998 Sb., v platném znění, pro

BioTest, s.r.o.
Výzkumná 421
533 51 Pardubice - Rosice

IČO: 25926713

Vedoucí testovacího zařízení: Ing. Lukáš Jebavý, CSc.

OSVĚDČENÍ

O DODRŽOVÁNÍ ZÁSAD SPRÁVNÉ LABORATORNÍ PRAXE



Razítko:

Podpis zodpovědného pracovníka MŽP:

STÁTŇÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV

Šrobárova 48, 100 41 PRAHA 10
tel. 272 185 111, fax 271 732 377, e-mail: sukl@sukl.cz

CERTIFIKÁT SPRÁVNÉ LABORATORNÍ PRAXE
CERTIFICATE OF GOOD LABORATORY PRACTICE

CERTIFIKÁT

Tímto je potvrzeno, že v testovacím zařízení

CERTIFICATE

It is hereby certified that the test facility

BioTest s.r.o.
Head Office: Výzkumná 421, 533 51 Pardubice
Test Facility: Pod Zámekem 279, 281 25 Konárovice u Kolína

IČO: 25 92 67 13

ve dnech 27.5. až 29.5. 2003

on 27.5. till 29.5.2003

byla provedena inspektoři Státního ústavu pro kontrolu léčiv kontrola podmínek dodržování Zásad správné laboratorní praxe

was inspected by inspectors of the State Institute for Drug Control regarding compliance with Principles of Good Laboratory Practice

Tímto je potvrzeno, že laboratorní studie na tomto pracovišti jsou prováděny podle Zásad správné laboratorní praxe OECD [C(97)186/Final].

It is hereby certified that studies in this test facility are conducted in compliance with the Good Laboratory Practice OECD [C(97)186/Final].

Poř. č. C/SLP/ 71

Rozsah činnosti:

Toxikologické studie

Scope of activities:

Toxicological studies

Osvědčení vydáno dne: 27.6.2003

Date of issue: 27.6.2003



Doc. RNDr. Martin Valchář,
Chief of the Inspection Division

Ochrana zvířat a etika práce se zvířaty na pracovištích

- **K zajištění etiky práce na laboratorních zvířatech je plně respektován zákon 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání v platném znění, vyhláška MZe 311/1997 Sb. o chovu a využití pokusných zvířat a Evropská direktiva 86/609/EEC.**
- **Na pracovišti je zřízena nezávislá odborná komise podle citovaného zákona, která posuzuje a schvaluje všechny projekty pokusů podle předpisů České republiky i podle Animal Scientific Procedures Act, 1986. Všichni pracovníci provádějící experimenty na zvířatech jsou držiteli osvědčení odborné způsobilosti pro práci s pokusnými zvířaty podle § 17 zákona 246/1992 Sb.**
- **Pracoviště splňuje podmínky zákona 167/1993 Sb. o Státním veterinárním dozoru a dle zákona 246/1992 Sb. v platném znění je držitelem akreditace uživatelského zařízení a osvědčení pro chovné a dodavatelské zařízení.**

Alternativy „klasických“ testů toxicity

„Zjemnění“ testů – nepoužívat extrémní koncentrace (dermální testy)

Snížení „spotřeby“ laboratorních zvířat – nahrazení „skupinových testů“ individuálními

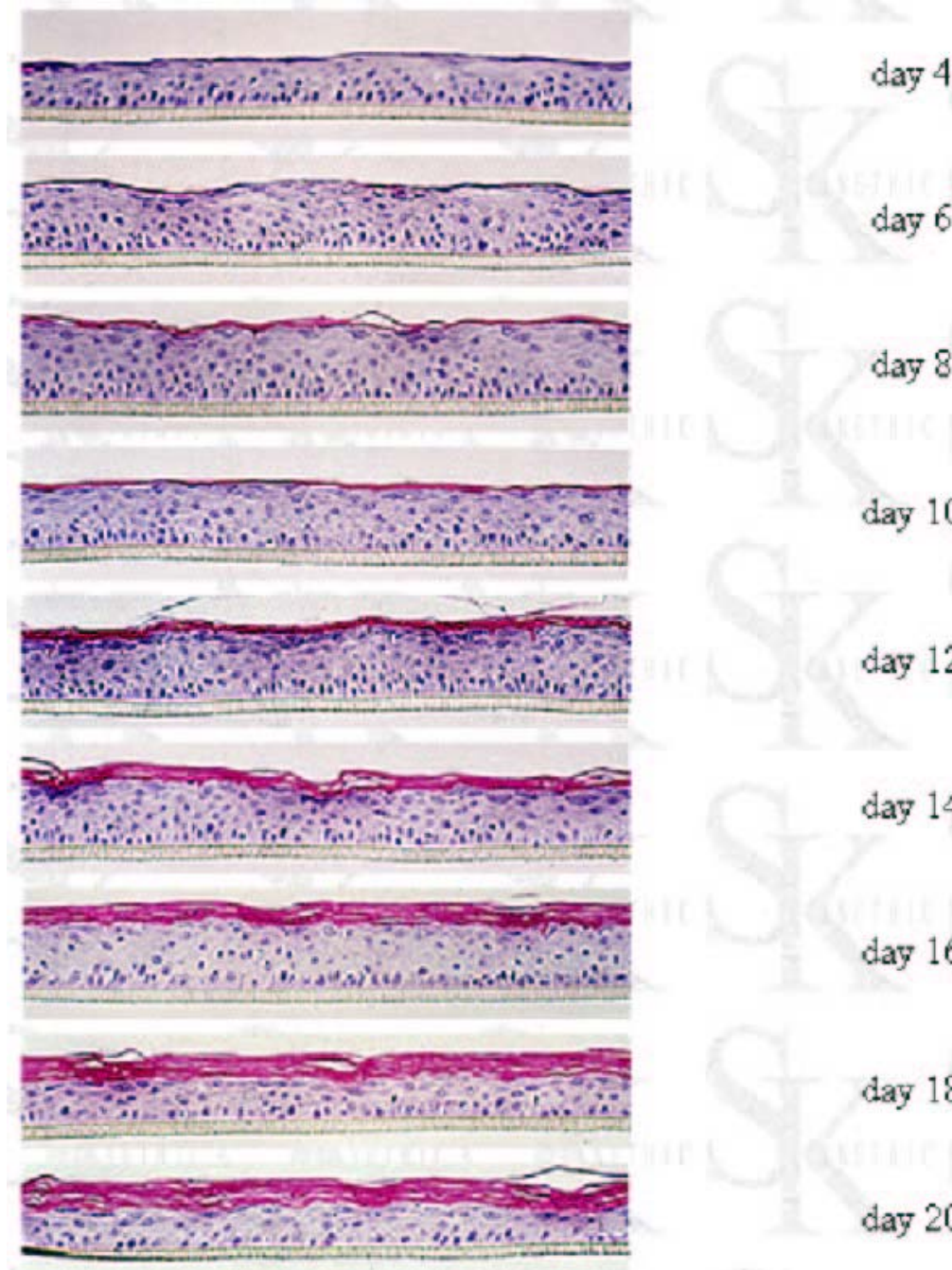
Náhrady klasických testů

- testy in vitro (tkáňové explantáty, bílé krvinky, jaterní buňky)**
- testy na nižších organizmech (bakterie, prvoci, bičíkovci, červi, hmyz, řasy, houby, kvasinky, semena rostlin)**

In vitro test na modelu lidské kůže

Komerčně dodávaný preparát

Testy dráždivosti, poleptání, ale i citotoxicity, genotoxicity a fototoxicity



Klasifikace akutně účinkujících chemických škodlivin

Klasifikační stupnice podle Marholda, potkan, orálně

- Látka krajně jedovatá, LD_{50} 5 mg/kg
- Látka velmi jedovatá, LD_{50} 5-15 mg/kg
- Látka jedovatá, LD_{50} 50-500 mg/kg
- Látka málo jedovatá, LD_{50} 0,5-5 g/kg
- Látka prakticky nejedovatá, LD_{50} 5-15 g/kg
- Látka prakticky neškodná, LD_{50} 15 g/kg

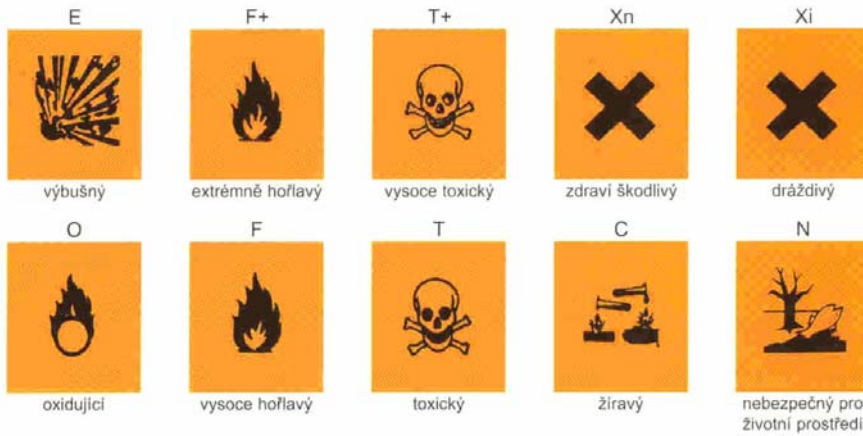
Klasifikační stupnice podle Marholda pro plynné látky – potkan, doba expozice 4 h

- Látka krajně jedovatá, LC_{50} 10 ppm
- Látka velmi jedovatá, LC_{50} 10-100ppm
- Látka jedovatá, LC_{50} 100-1000ppm
- Látka málo jedovatá, LC_{50} 1000-10000ppm
- Látka prakticky nejedovatá, LC_{50} 1-10%
- Látka prakticky neškodná, LC_{50} 10%

Identifikace nebezpečných látek vychází z legislativy ČR (EU)

GRAFICKÉ SYMBOLY NEBEZPEČNOSTI

Grafické symboly nebezpečnosti jsou stanoveny přílohou č.4 nařízení vlády č. 25/1999 Sb., kterým se stanoví postup hodnocení nebezpečnosti chemických látek a chemických přípravků, způsob jejich klasifikace a označování a vydává Seznam dosud klasifikovaných nebezpečných látek.



R-věty - standardní věty označující specifickou rizikovost

S-věty - standardní pokyny pro nakládání s nebezpečnými přípravky

PÍSEMNE SYMBOLY NEBEZPEČNOSTI

Písemné symboly nebezpečnosti uvedené u grafických symbolů v předchozí části nejsou jejich součástí a mají následující význam:

Jednoduché R a S věty

Kombinace R-vět

Kombinace S-vět

E	výbušný
O	oxidující
F+	extrémně hořlavý
F	vysoce hořlavý
T+	vysoce toxický
T	toxický
Xn	zdraví škodlivý
C	žiravý
Xi	dráždivý
N	nebezpečný pro životní prostředí