



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie
a Ochrany a tvorby životního prostředí “**

Reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/28.0032

EKOTOXIKOLOGIE

EKO/ETXE

Petr Hekera

Katedra ekologie a ŽP

PřF UP Olomouc

Obsah předmětu

1. **Toxikologie**, základní pojmy, obecná toxikologie, jed, toxicita.
2. **Molekulární a buněčná toxikologie**, buněčná membrána, mechanismy průniku tox. látky, postižení tox.látkou.
3. **Interakce toxické látky s organismem**, vniknutí do organismu, pohyb v organismu, distribuce.
4. **Biotransformace tox. látky v organismu**, účinek na toxicitu, lokalizace, vliv enzymatického systému.
5. **Chemické karcinogeneze**, molekulární mechanismus působení, alkylace, interkalace, mutogeneze, karcinogeneze.
6. **Experimentální toxikologie**, laboratorní zvířata, testy na akutní, subakutní, subchronickou a chronickou - orální, inhalační a dermální toxicitu, testy na neurotoxicitu. Alternativní testy toxicity.
7. **Toxikologie anorganických látek**, prvky I-VIII skupiny a jejich sloučeniny.
8. **Toxikologie organických látek**, alifatické a aromatické uhlovodíky, jejich deriváty.
9. **Ekotoxikologie**
10. **Znečištění ŽP**, ovzduší, pohyb a odstraňování látek z atmosféry, aerosolové částice, vliv na půdu, vliv na rostlinstvo, vliv na volně žijící zvěř, znečištění vod, příčiny poškození a úhynu vodních živočichů,
11. **Hodnocení rizik. Toxikologicky významné havárie**

Studijní literatura

- Přednášky
- RUSTEK, V. *Základy toxikologie*. Univerzita Pardubice 2001 (pdf.forma na www.upce.cz)
- PROKEŠ, J. A KOL. *Základy toxikologie*. Karolinum UK Praha, 165 s., 1997, 2005
- MATRKA, M., RUSTEK, V. *Průmyslová toxikologie*. VŠCHT Pardubice, 157 s., 1991.
- PICKA, K., MATOUŠEK, J. *Základy obecné a speciální toxikologie*. MŽPČR Praha, 103 s., 1996.
- TICHÝ, M. *Toxikologie pro chemiky*,. Karolinum UK Praha, 90 s., 1998.
- Zákon 356/2003 Sb., Zákon o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů, ve znění zákona č. 186/2004 Sb.
- Databáze toxických látek dostupné na internetu (TOXLINE, IRIS, Plumbum...)

Témata seminárních prací

Toxikologicky významné*

- prvky a jejich sloučeniny

- organické látky

Téma
Be
Ba
Al
Sn
Pb
N
P
As
S
F
Cl
Br
Zn
Cd
Hg
Cr
Ni
Alkoholy
Fenoly
Aldehydy
Chlorované uhlovodíky

Základy toxikologie

Toxikologie

Věda o účincích jedů

- vztahy mezi strukturou a účinkem
- vstřebávání
- distribuce v organismu
- biotransformace
- exkrece

JED



- otázka dávky – každá látka může působit na organismus toxicky

- látka působící na organismus toxicky již malých dávkách

Legislativa – „jedová vyhláška“

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

Novelizován : 352/1999 Sb, 132/2000 Sb, 258/2000 Sb, 458/2000 Sb,

Zákon 356/2003 Sb., Zákon o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů, ve znění zákona č. 186/2004 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“ – chemický, fyzikální nebo smíšený charakter

TOXIKOLOGIE

- **chemická** (syntéza, preparace, analýza)
- **farmakologická** (účinky, LD_{50} ,
- **biochemická** (mech. účinků na molekul. úrovni)
- **klinická** (diagnostika a terapie otrav)
- **průmyslová** (detekce, analýza, C_{max} , exp. testy)
- **potravinářská** (přír. toxiny, rezidua, technologie)
- **veterinární** (tox. látky pro zvířata, krmiva)
- **zemědělská** (tox. látky v zeměděl. produktech)
- **ekotoxikologie** (toxikologie ž.p.)

- Toxikologie je v naší republice uznaným vědním oborem až od roku 1988. Patří mezi lékařské vědy. Hlavním cílem toxikologie je zjištění škodlivých a nežádoucích biologických vlastností chemických sloučenin i jejich směsí, hledání preventivních opatření a účinné léčby, pokud k otravě dojde. K tomu je třeba pochopit podstatu škodlivého účinku látek.
- **Obecná toxikologie**
- Obecná toxikologie zkoumá teorii a obecné zákonitosti, týkající se interakce chemických látek a živých organismů. Zajímá se o to, jak se látka do organismu dostává, jak se dále mění, jak interaguje s důležitými orgány a jak se vylučuje. Popisuje různé faktory, které tyto děje ovlivňují. Značnou měrou zde pomáhají poznatky z xenobiochemie - biochemie cizorodých látek. Obecná toxikologie se též stará o definici základních pojmů, užívaných v toxikologii.
- **Analytická toxikologie**
- Analytická toxikologie využívá metod analytické chemie pro zjištění obsahu toxických látek v biologickém materiálu, ve vodě, v půdě i v živých organismech. Stanovuje postup práce od odebírání vzorku po vyhodnocení naměřených dat.
- **Ekotoxikologie**
- Viz Toxikologie životního prostředí
- **Experimentální toxikologie**
- Experimentální toxikologie zkoumá účinky chemických látek na pokusných zvířatech, tkáních, buňkách či izolovaných orgánech. Má za úkol stanovit toxické dávky nebo koncentrace látek, tzv. toxikologické indexy (např. LD50). Pokusně též zjišťuje metabolismus chemických látek a pozoruje konkrétní projevy otrav.
- **Farmaceutická toxikologie**
- Farmaceutická toxikologie se zabývá toxickými vedlejšími účinky léčiv.
- **Klinická toxikologie**
- Klinická toxikologie studuje účinky jedů na člověka. Popisuje příznaky otrav, pomáhá při jejich diagnóze a léčení. Hraje důležitou roli též při prevenci otrav.

- **Predikční toxikologie**
- Predikční toxikologie umožňuje určit toxické vlastnosti látek bez použití pokusných zvířat. Využívá k tomu jednak nahromaděné pokusné informace, ale též chemické struktury. Pomocí zobecňování a použití různých modelů odhaduje toxicitu neznámé látky. Využívá znalosti chemie, fyziky, biologie, matematiky, kybernetiky a molekulové grafiky.
- **Průmyslová toxikologie**
- Průmyslová toxikologie se zabývá toxickými účinky látek, objevujících se v průmyslu, tedy surovin, meziproduktů, produktů i odpadů. Zjišťuje bezpečnostní limity pro práci s chemikáliemi a určuje pravidla, jak s nebezpečnými chemikáliemi správně zacházet. Průmyslová toxikologie úzce souvisí s problematikou chorob z povolání.
- **Soudní toxikologie**
- Soudní, neboli kriminalistická toxikologie hledá způsoby průkazu otravy.
- **Speciální toxikologie**
- Speciální toxikologie se zaměřuje na konkrétní chemické látky. Popisuje mechanismus jejich účinku, průběh otravy, shromažďuje informace o toxických vlastnostech...
- **Toxikologie životního prostředí**
- Toxikologie životního prostředí se soustřeďuje na chemické znečištění životního prostředí (vody, potravin, ovzduší atd.) a to ve vztahu k jeho působení nejen na člověka, ale i na zvířata. Hledá možnosti odstraňování chemických látek ze životního prostředí a pomáhá při odstraňování nežádoucích účinků těchto látek. Součástí této toxikologie je i **ekotoxikologie**, zaměřená specificky na vliv toxických látek na dynamiku populace uvnitř ekosystému
- **Veterinární toxikologie**
- Veterinární toxikologie popisuje účinky jedů na zvířata. Zabývá se, podobně jako klinická toxikologie u člověka, též diagnostikou a léčením otrav.
- **Vojenská toxikologie**
- Vojenská toxikologie se zabývá zejména problematikou chemických zbraní a předcházení jejich účinku.

Vliv na rozvoj toxikologie:

Světová výroba chemikálií

1955 - 7 mil. tun

1990 - 280 mil. tun

Nové organické sloučeniny

1977 - 4 mil. sloučenin

1990 - 9 mil. sloučenin

Emise látek do životního prostředí v ČR

1980 - 1 g cizorodých látek na 1 m³ za rok

1990 - cca 5 g cizorodých látek na 1 m³ za rok

2000 - cca 7 g cizorodých látek na 1 m³ za rok

Stav životního prostředí v ČR.

1984 - 49 % obyvatel v silně zamořeném prostředí

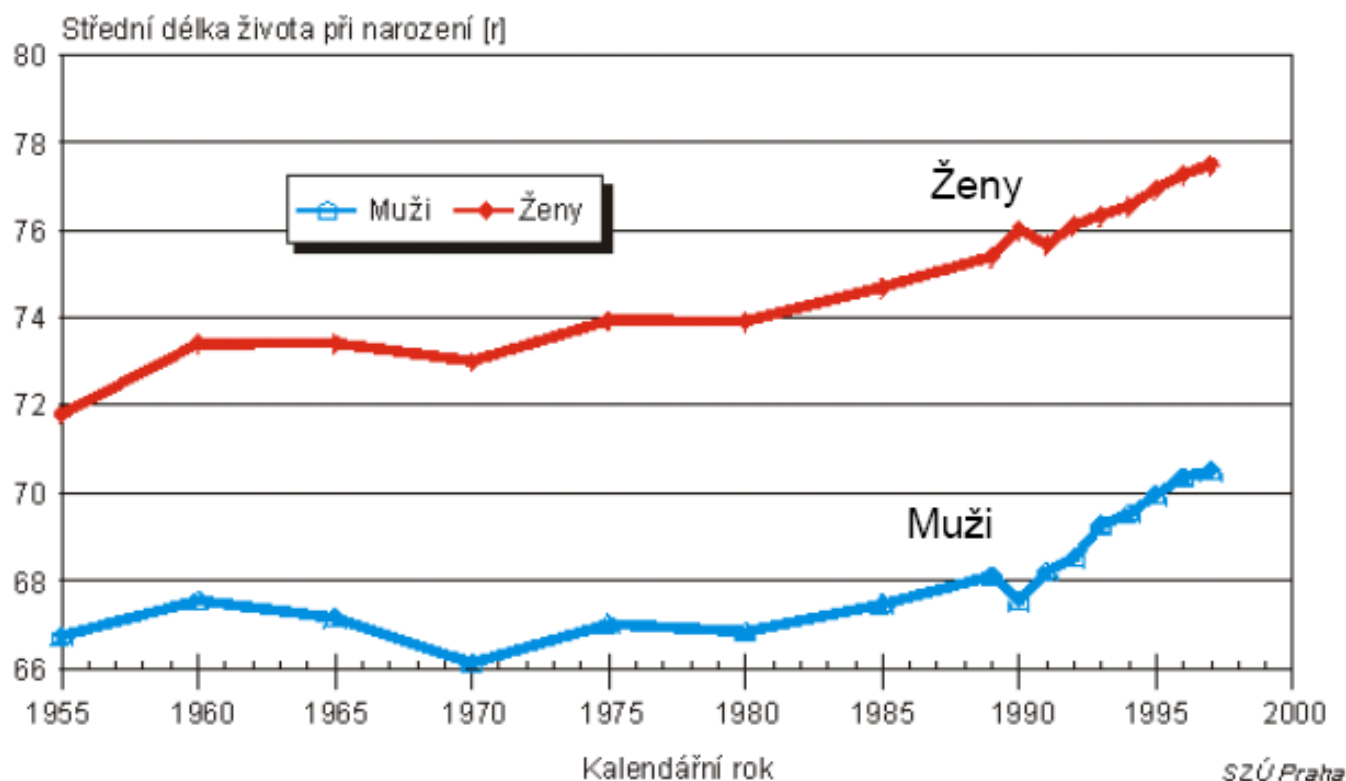
1987 - 77 % vody v exponovaných oblastech vykazovalo
mutagenní aktivitu

1990 - 50 % pitné vody nevyhovuje ČSN

Zemřelí dle příčin úmrtí (v roce 1996)

- 56 % - nemoci oběhové soustavy (kardiovaskulární choroby)
- 23 % - novotvary (rakovina, v současnosti nárůst na cca 26 %)
- 7,7 % - otravu a poranění (i sebevraždy)

Střední délka života v ČR



TOXICITA

míra jedovatosti látky vůči cílovému organismu nebo tkáni, závisí na :

- chemické stavbě toxinu
 - cestě vstupu do organismu
 - vnímavosti (citlivosti) cílového organismu (tkáně)
 - délce působení (expozici)
 - denní době v níž působí
 - kondici, pohlaví, stáří, hmotnosti
-
- *akutní* (jednorázová dávka, vysoké koncentrace)
 - *chronická* (opakované dávky, nízké koncentrace, ... expozice, pozdní účinky)

ZÁKLADNÍ TOXIKOLOGICKÉ POJMY

- **Dávka** – množství látky (záření), které působí na organismus po stanovenou dobu
- **Smrtná dávka** (dosis letalis)
- **střední smrtná dávka LD_{50}** – dávka látky, která způsobí smrt 50% jedinců ve zkoumaném souboru (LC₅₀, LD_{50/30})
- **Maximální (absolutní) smrtná dávka** – nejmenší dávka látky, která způsobí smrt 100% jedinců zkoumaného souboru
- **Minimální smrtná 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**

$$T = \ln 2/k = 0,693/k$$

- **dávka, koncentrace, účinek**

$$U = f(c \cdot t^n), \quad U = f(c) \quad \dots \text{ u org. rozpouštěděl} \\ \text{(reverzibilní vazba)}$$

vztah mezi dávkou a účinkem je často logaritmický

- **NPK (MAC)** – nejvyšší přípustné koncentrace

- **komplexní tox. účinek pro přípustnou průměrnou denní dávku**

$$PPD = K_1 D_o + K_2 D_v + K_3 D_p$$

Přijatelný denní příjem - PDP (ADI = Acceptable Daily Intake) (TDI = Tolerable Daily Intake)

- množství látky, které se po celoživotním denním příjmu neprojeví toxicky.

Př. Průměrný člověk za 50 let života přijme

10 tun sušiny, 40 tun vody

280 tun vzduch přefiltruje skrz plíce

Vše obsahuje toxické látky, většina je eliminována

Látky nebezpečné lidskému zdraví

látka	ADI [na 60 kg osobu]	plněno [%]	poznámky
tuky	60 g	120	
NaCl	8 g	120	
NO ₃ ⁻	300 mg	90	
As	3 mg	40	
Pb	0,5 mg	90	
Cd	0,06 mg	90	spermicidní prvek
Hg	0,04 mg	65	dimethylrtuť - silný karcinogen
PCB	0,06 mg	90	kokarcinogen
PAU	0,002 mg	115	nebezpečný benz[a]pyren

Benz[a]pyren



- vzniká při spalovacích procesech i při smažení
- sám o sobě je neškodný
- v organismu vzniká epoxid

Př. Vybrané látky z 10 cigaret

látka	množství	látka	množství
As	0,2 mg	NO_3^-	1 - 6 mg
Pb	0,007 mg	Nikotin	12 - 230 mg
Cd	10 - 20 μg	PAU	0,2 - 0,4 μg
Hg	9 - 45 μg	HCN	4 - 5 mg

Rtuť - roční příjem Hg z poživatin celkem 7,49 mg.

Pro kuřáky (20 cigaret/den) + 6,6 mg = 14,09 mg/rok

Poškození organismu již při 15 mg/rok.

INTERAKCE TOXICKÉ LÁTKY S ORGANISMEM NA MOLEKULÁRNÍ A BUNĚČNÉ ÚROVNI

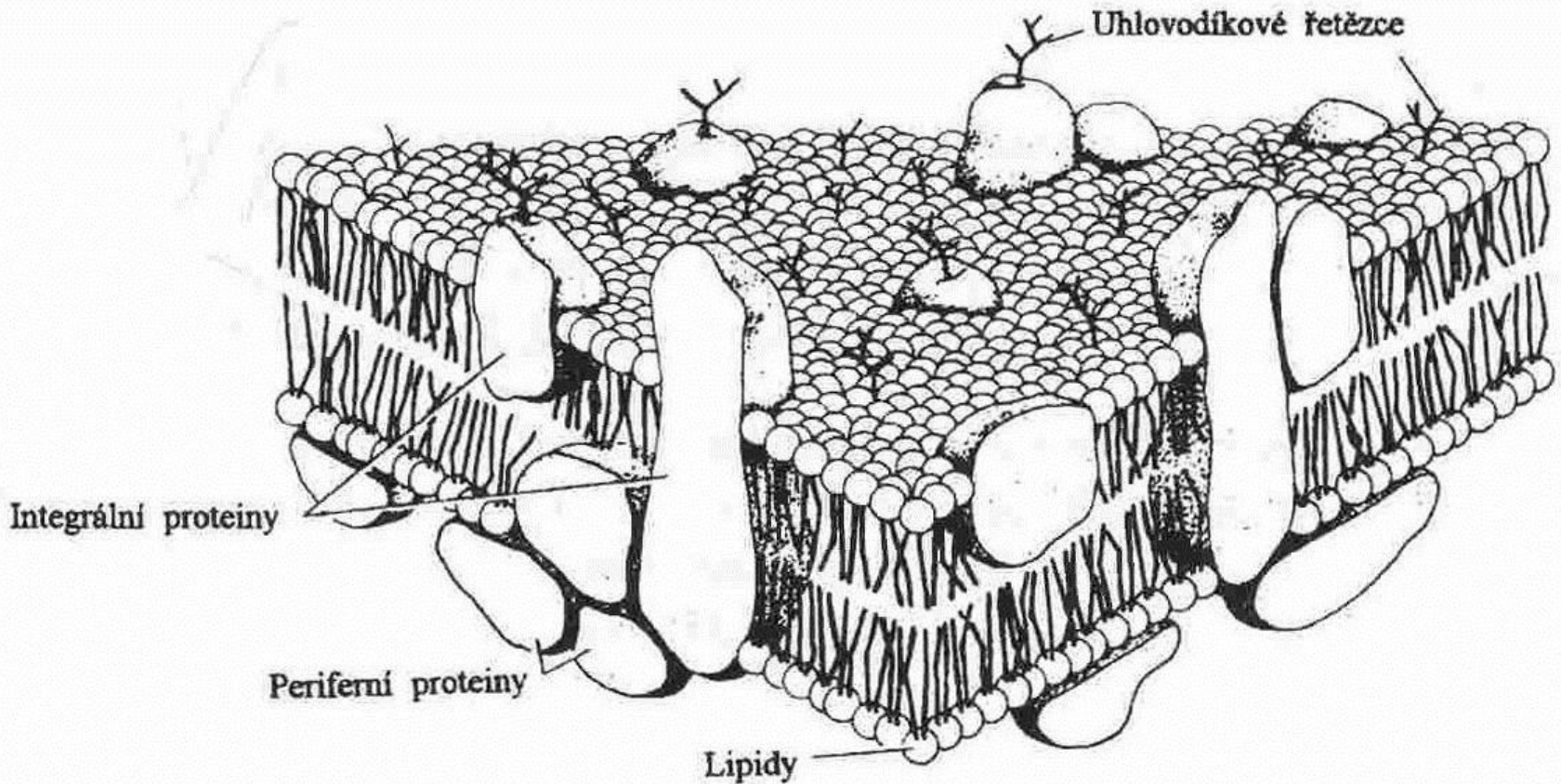
Stupeň poškození buňky

- **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 (degenerace 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**
 - regulační – syntéza enzymů – detoxikace
 - genetické - selekce rezistentních buněk – často mutantní (opakovanou selekcí vznikají rezistentní buněčné klony)

BUNĚČNÁ MEMBRÁNA

Membránová bariéra pro vstup toxické látky ke „kritickým místům“ působení



MECHANISMY PRŮNIKU TOXICKÉ LÁTKY BUNĚČNOU MEMBRÁNOU

- **filtrace** – póry naplněnými vodou – ve vodě rozpustné, nízkomolekulární látky (do M.H.cca 200, rozdílem hydrostatických tlaků na obou stranách membrány)
- **prostá difuze** - pouze F-CH faktory (rozp.v tucích, konc.gradient (rozděl.koef.oktanol-voda))

$$R_T = P (C_{II}/C_I) \quad (\text{do M.H.cca 500})$$

R_T je rychlost přenosu nebo rychlost toku,

P - konstanta permeability,

C_I koncentrace toxické látky na povrchu buňky,

C_{II} - koncentrace toxické látky na druhé straně membrány buňky.

MECHANISMY PRŮNIKU TOXICKÉ LÁTKY BUNĚČNOU MEMBRÁNOU

- **elektrodifuze iontů** – vliv el.potenciálu iontových látek

$$R_T = (G_T) z_T F (E_T - E)$$

$$E_T = RT/z_T F \cdot \ln c_{II}/c_I$$

G_T je vodivost iontové formy toxické látky přes membránu,

$z_T F$ je náboj iontu,

E je aktuální membránový potenciál

E_T je rovnovážný Nernstův-Donnanův potenciál.

- **transport iontovými kanálky**

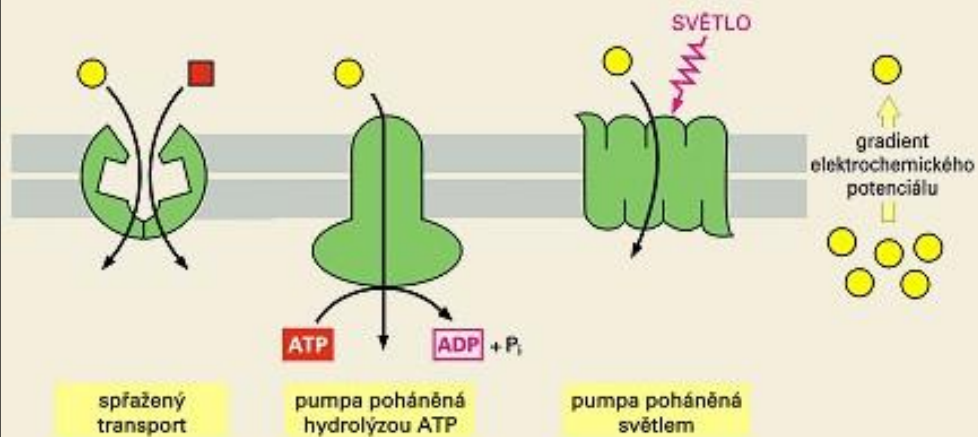
K - kanály (K^+ , Rb^+ , HN^{4+}) (široké ústí se záklopkou, zúžení)

Na - kanály (Na^+)

Podle mechanismu jejich řízení je lze rozdělit do pěti základních skupin: iontové kanály stále otevřené, iontové kanály napětově řízené, iontové kanály řízené chemicky (receptory), iontové kanály řízené napětím i chemicky a iontové kanály řízené mechanicky

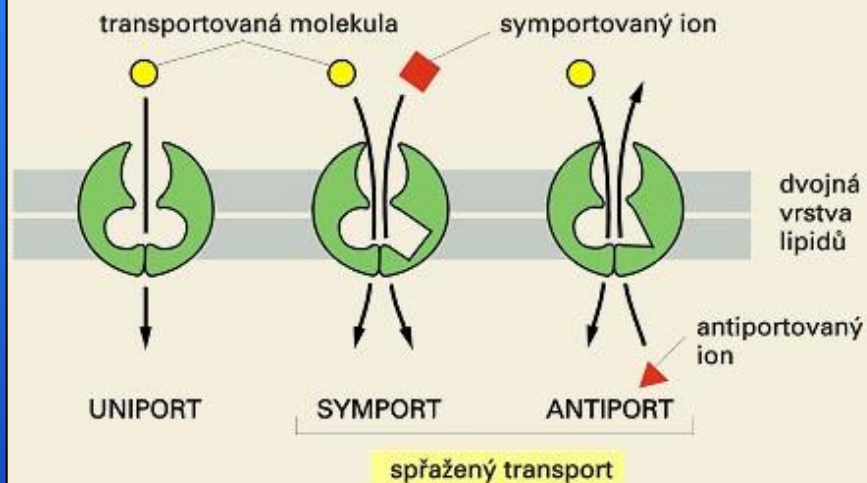
- **pasivní přenašečový transport**
transport velkých molekul pomocí nosičů procházející membránou (řízen buňkou),
ve směru spádu chemického potenciálu
vstup látky regulován
 - množstvím dostupných molekul přenašeče
 - rychlosti pohybu přes membránu
 - afinitou přenašeče k toxické látce
- **aktivní přenašečový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

Tři cesty řízení aktivního transportu



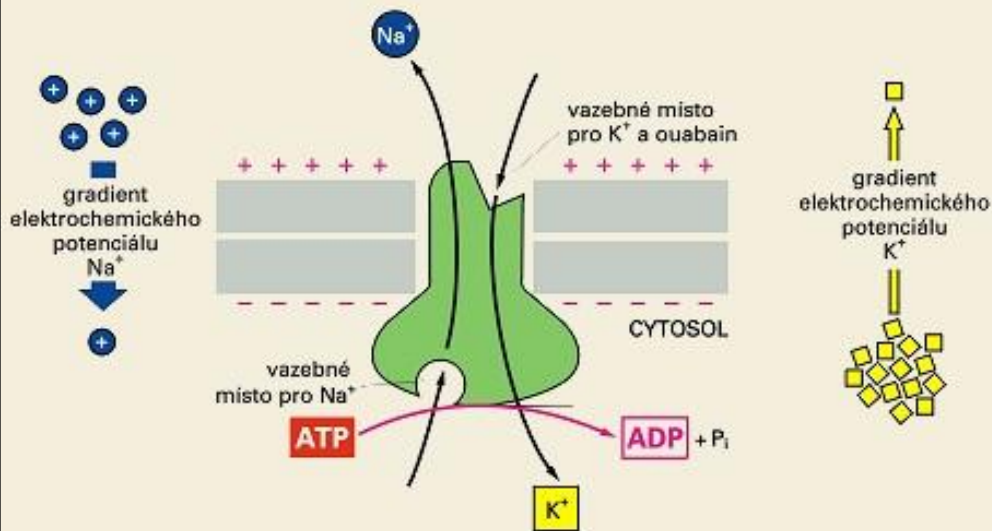
© E. yano Publishing s.r.o.

Tři typy transportu přenašečovými proteiny

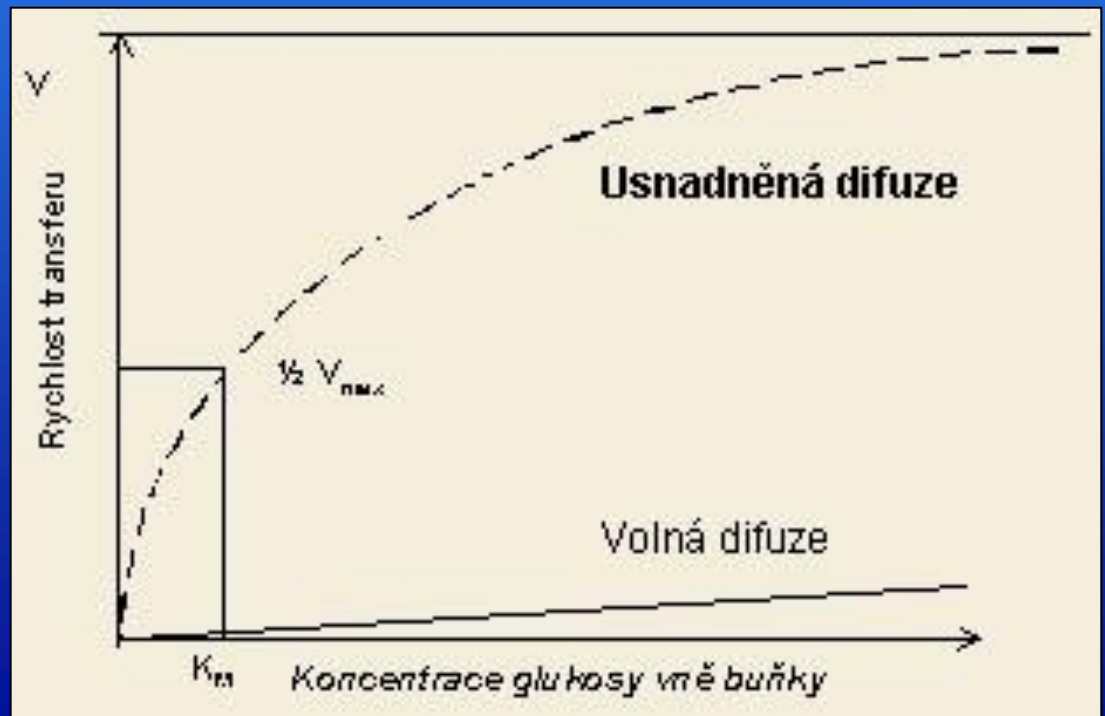
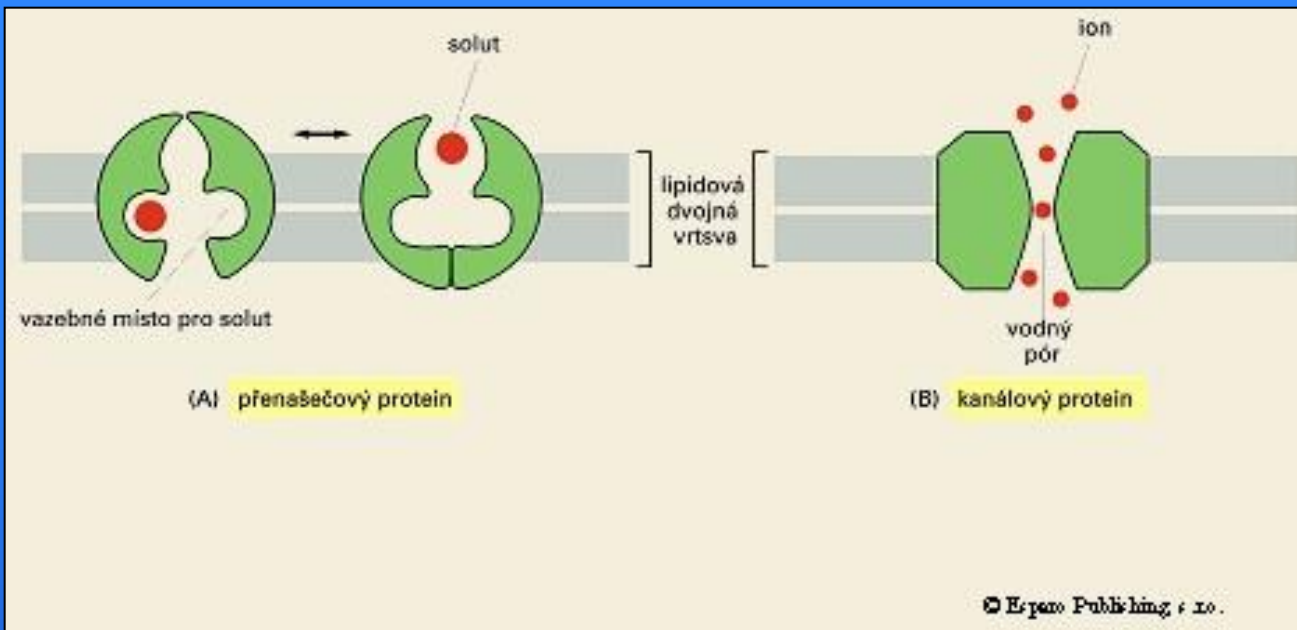


© E. yano Publishing s.r.o.

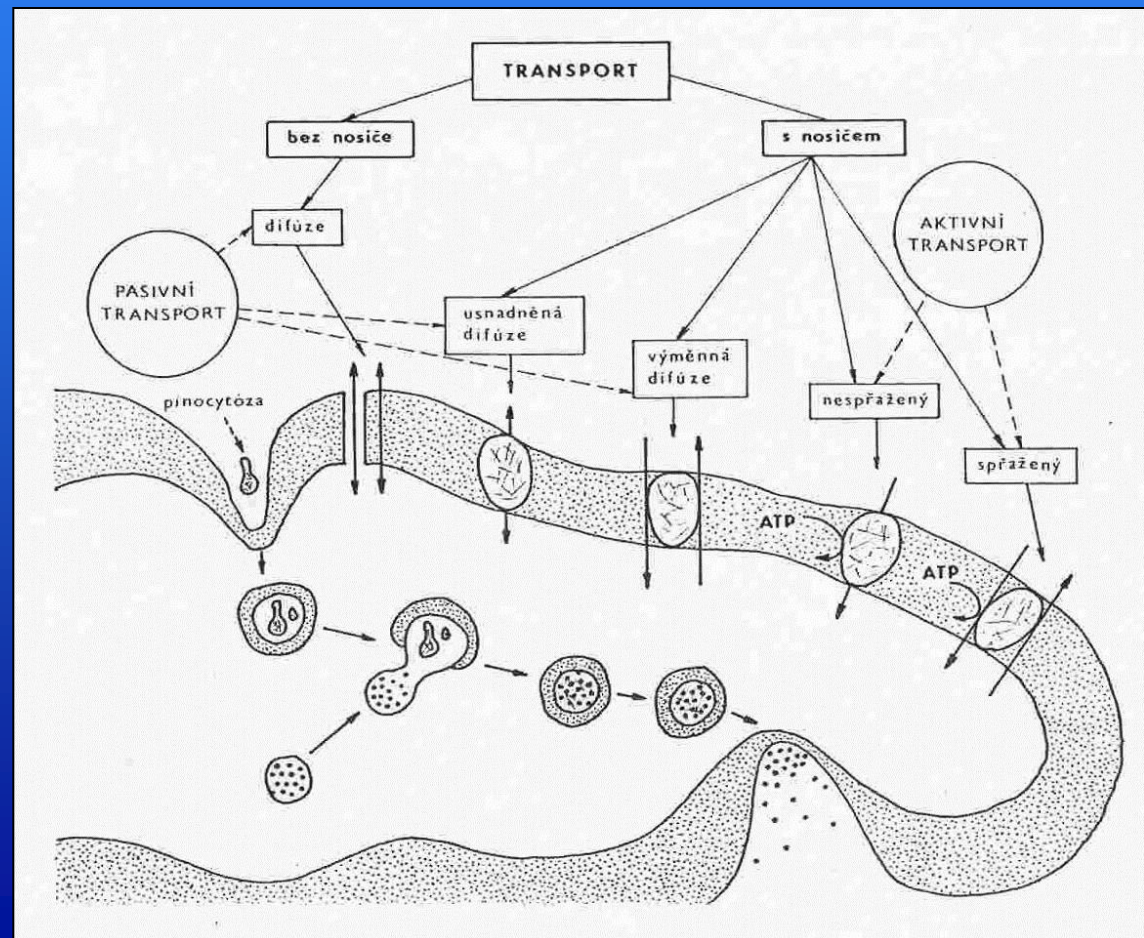
Sodno-draselná pumpa



© E. yano Publishing s.r.o.



- skupinová translokace
 - transport spojený s chemickou změnou přenášené látky (často hydrolýza)
- endocytosa, exocytosa
 - přenos celých částic vychlípáním membrány do vaku (endosom)



POSTIŽENÍ TOXICKOU LÁTKOU

- **syntézy makromolekulárních látek** (DNA, proteiny)
- **buněčné permeability a transportních mechanismů** (porušení bariéry, zhroucení koncentračních rozdílů, změny v řízení výměny látek)
- **buněčného energetického metabolismu** (porušení syntézy ATP v buňce)
- **buněčného cyklu** (závisí na délce působení toxické látky)
- **genetické informace** (genové mutace – změna sekvencí nukleotidů-zásah do struktury DNA; ovlivnění počtu a pořadí genu)

INTRAKCE TOXICKÉ LÁTKY S ORGANISMEM

- **vniknutí do organismu**
 - inhalací dýchacím ústrojím
 - resorpcí přes pokožku, sliznice
 - perorálně, zažívacím traktem
 - jiné cesty (injekcí, ...)
- **pohyb toxické látky v organismu**
 - penetrace (vstup do organismu)
 - resorpce (vstřebávání)
 - 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, stupeň disociace)
- 2) **Forma látky** (a její vlastnosti)
- 3) **Složení a vlastnosti trávicích šťáv** (pH, povrchově akt.látky, komplexotvorné látky, enzymy...)
- 4) **Vlastnosti povrchu trávicího ústrojí** (velikost, prokrvení, stárnutí, poškození)
- 5) **Přítomnost konzumované potravy, složení**
- 6) **Rychlost vyprazdňování žaludku, peristaltika střev**
- 7) **Nemoci, stres**
- 8) **Možná interakce s jiným xenobiotikem**

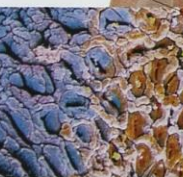


VYSTELKA JICNU
Drobné záhyby ve vstředce jícnu umožňují této svalnaté trubici, aby se vzestřela a při průchodu potravy z úst do žaludku byla zvlhčena. Tyto záhyby jí také chrání před poškozením.

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

Žlučník
hrasikovitý váček; skládá žluč a pak ji uvolňuje do tenkého střeva

Tenké střevo
pětinametrová trubice skládající se z dvanáctníku, lačnicku a kyčelníku; spojuje žaludek s tlustým střevem

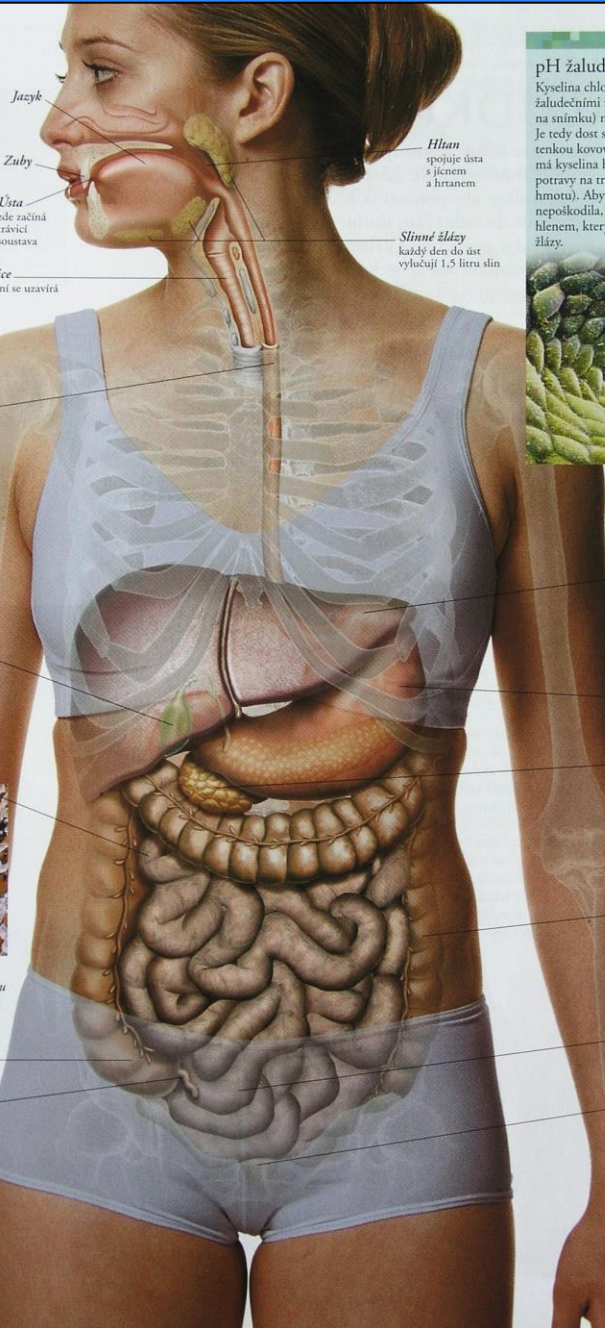


SPOJENÍ STŘEV
Tenké střevo (modře, vlevo) má vystředku plnou záhybů, aby se co nejvíce zvýšilo vstřebávání výživných látek, zatímco vnitřní část tenkého střeva (žlutě) je ploší.

Slepé střevo
krátká široká část tvořící první část tlustého střeva

Červovitý přívěsek (appendix)
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
zde začíná trávicí soustava

Průdušnice
při polykání se uzavírá

Hltan
spojuje ústa s jícenem a hrtanem

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

Fakt

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 (polorekultou hmotu). Aby kyselina žaludek nepoškodila, je sliznic chráněna hlenem, který také vylučují žaludeční žlázy.

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

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

Slinivka
každý den vylučuje 1,5 litru trávicí šťavy; šťava 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

Ústa
enzymy ve slinách začínají štěpit sacharidy

Slinné žlázy
vylučují do úst sliny

Játra (místo tvorby žluči)

Žlučník (místo bromažení žluči)

Jícen

Slinivka břišní (pankreas)

Žaludek
vylučuje kyselinu chlorovodíkovou a enzymy štěpící potravu a hlen chrání žaludeční sliznici

Dvanáctník
zde žluč štěpí tuky; enzymy z pankreatické šťavy štěpí sacharidy a bílkoviny a přeměňují tuky na mastné kyseliny a glycerol; hydrogenuhličitan sodný (jedlá soda) v pankreatické šťávě neutralizuje kyseliny

Lačnick
zde se vytvářejí enzymy, které společně s enzymy ze slinivky dokončují štěpení potravy

Kyčelník
vstřebává výživné látky a žluč, které se pak krevními cévami vracejí do jater

Tlusté střevo
vstřebává vodu z odpadu, aby se vytvořila stolice; bakterie vytvářejí vitaminy, které jsou následně vstřebávány

Konečník
zde se stolice vytvořená v tlustém střevě shromažďuje před vyloučením

Řítní otvor

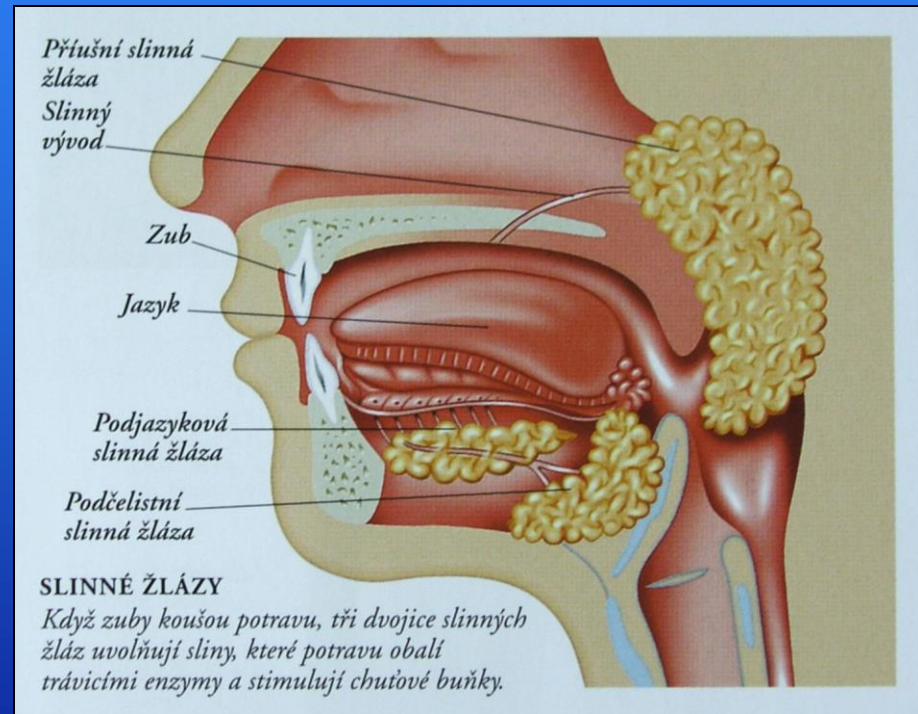
Doprava pankreatické šťavy a žluči do dvanáctníku

Doprava výživných látek do jater
vstřebané výživné látky putují do jater, kde jsou zpracovány; některé tuky ještě před vstupem do krevního oběhu procházejí lymfatickými cévami

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

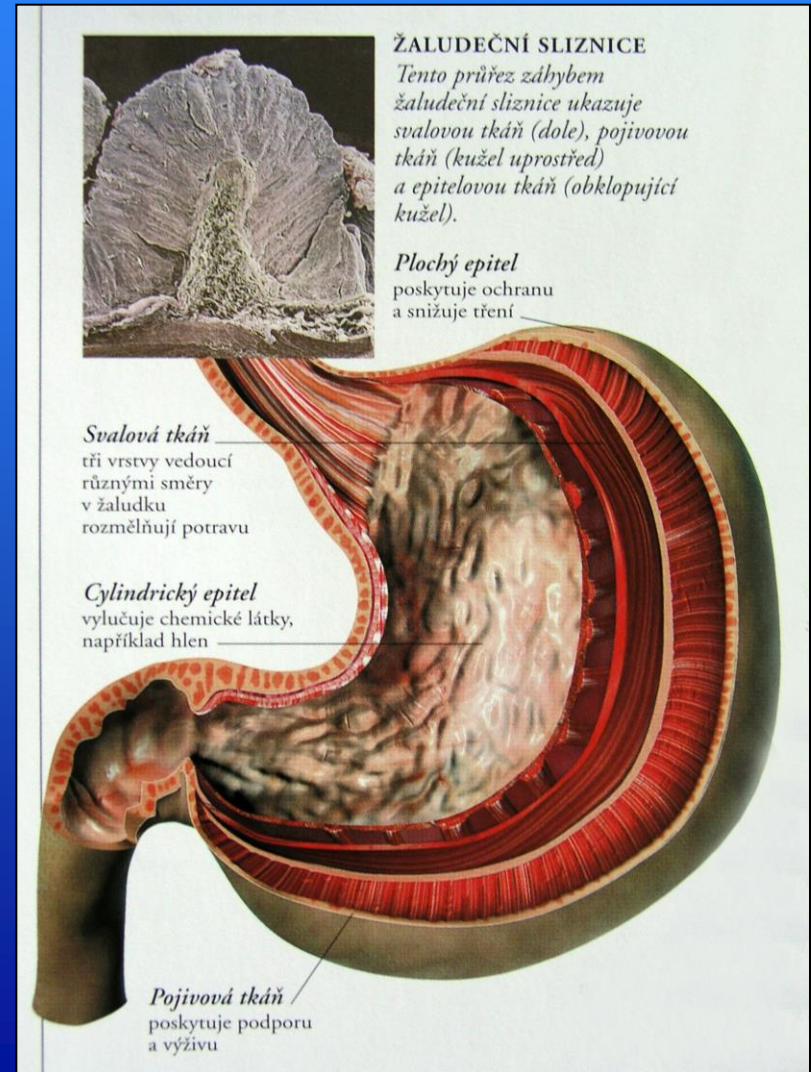
Dutina ústní

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



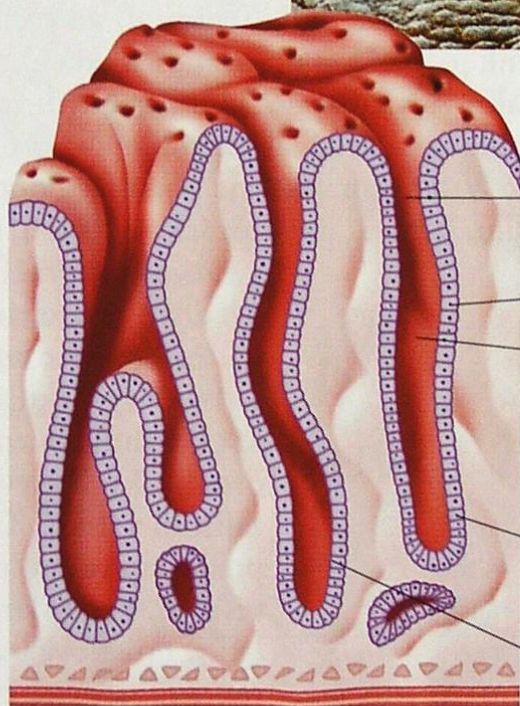
Žaludek

- pH~1-3 (HCl, pepsin, ureáza)
- sliznice – biomembrána mezi kyselým a slabě alkalickým prostředím (krevní plazma) – lepší propustnost pro lipofilní látky neutrální a slabě kyselé povahy (chráněná vrstvou hlenu (mucin) – směs mukopolysachridů a mukoproteinů)
- doba zdržení v žaludku – podle charakteru obsahu – 3-5 hod. – chemické změny látek (H^+) rozhodují o prostupu žaludeční stěnou, nebo o dalším transportu do střeva)



SLIZNICE

Na tomto snímku je povrch sliznice (mukózy), vrstvy žaludku vytvářející hlen. Tmavé dírky 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*

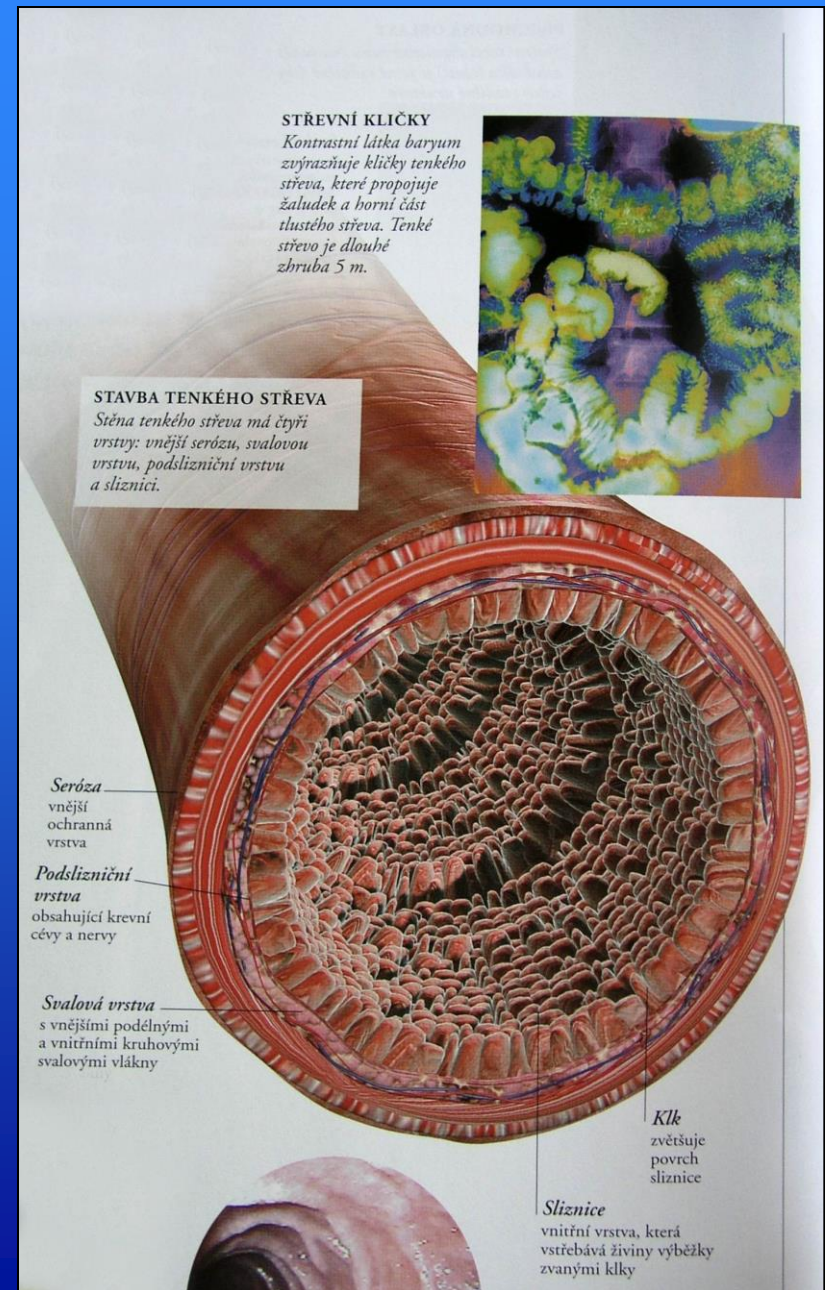
*Buňka vytvářející
kyselinu*

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, pH 7-8
- sliznice – biomembrána s malým počtem pórů, propustná pro lipofilní a neionizované látky, lépe prostupují slabé báze (difuze)
- Posun obsahu – peristaltickými vlnami (1 cm/min)
- doba zdržení – podle charakteru obsahu – 3-5 hod.
- nejintenzivnější vstřebávání



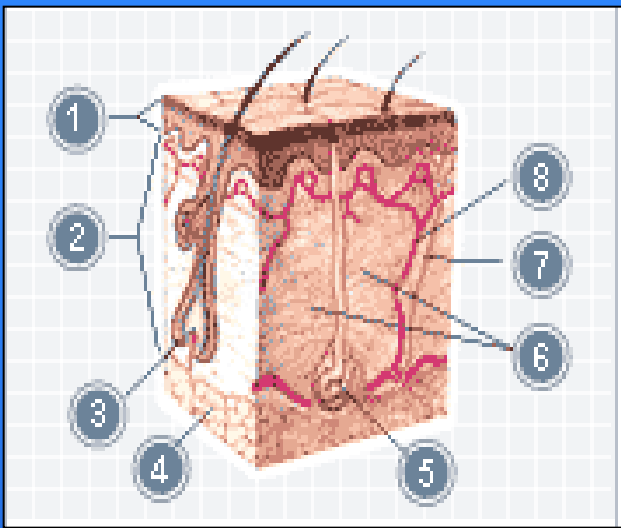
Tlusté střevo

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



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 difúze
 - 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



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.



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.

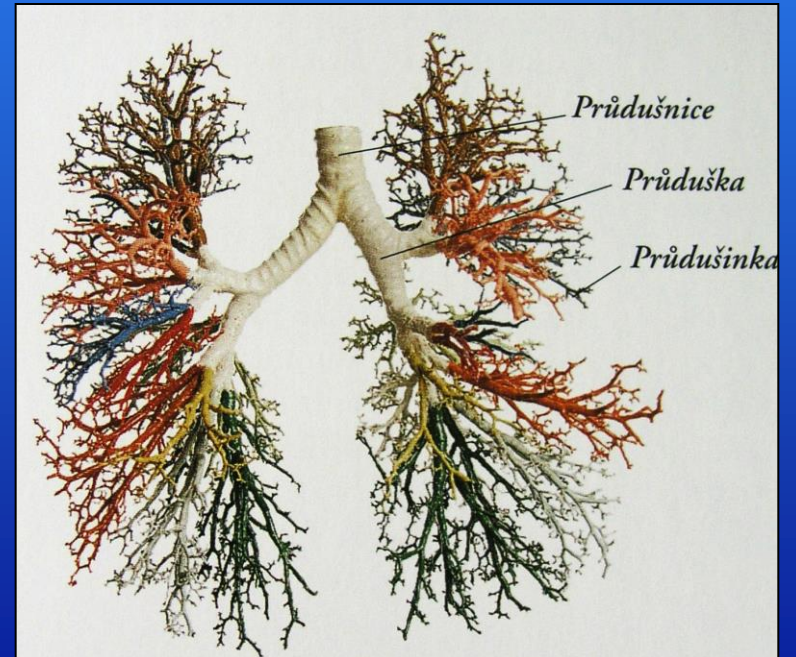
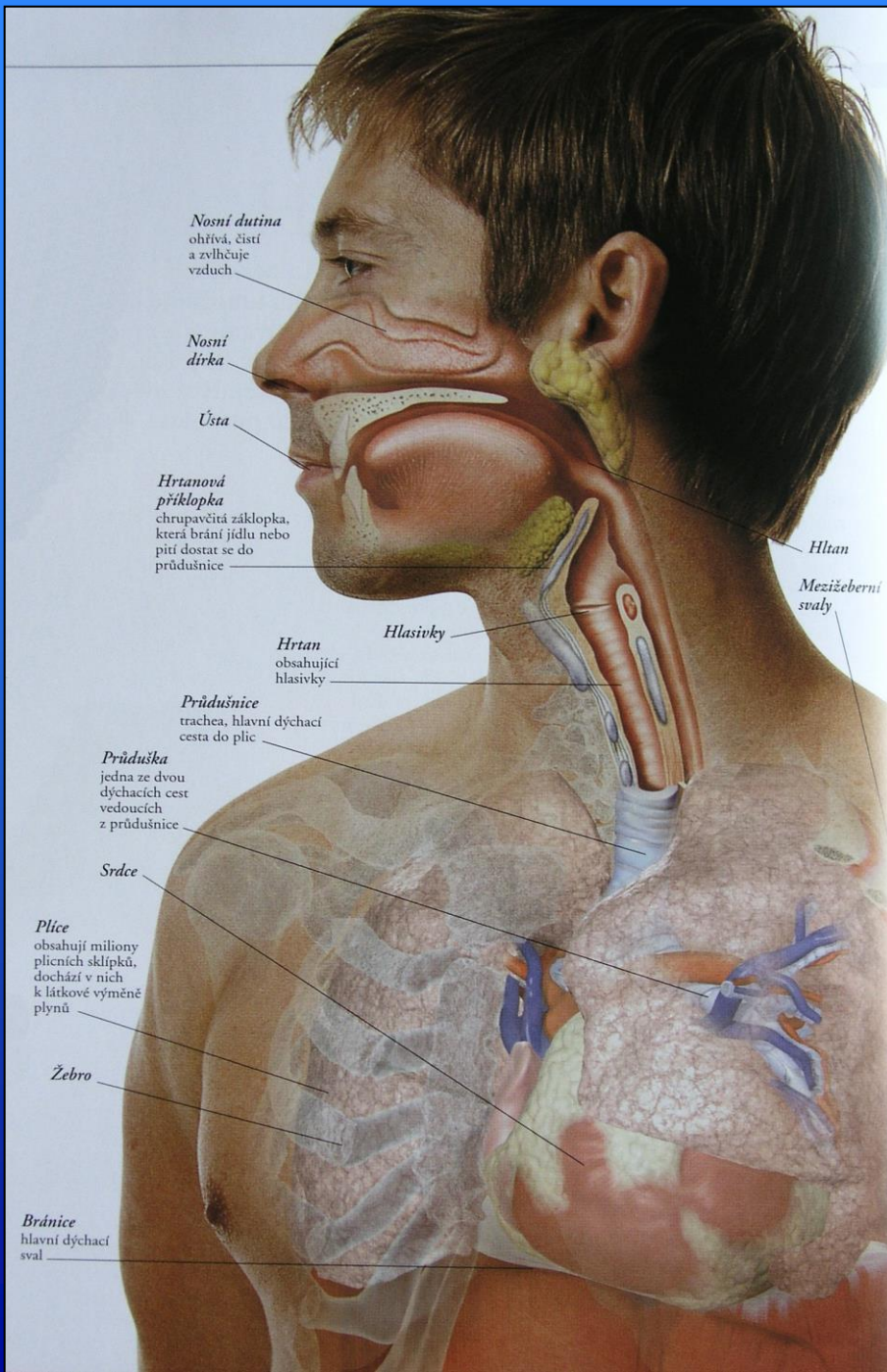
Resorpce toxické látky respiračním ústrojím (inhalační penetrace)

Resorpce nosní sliznicí

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

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)

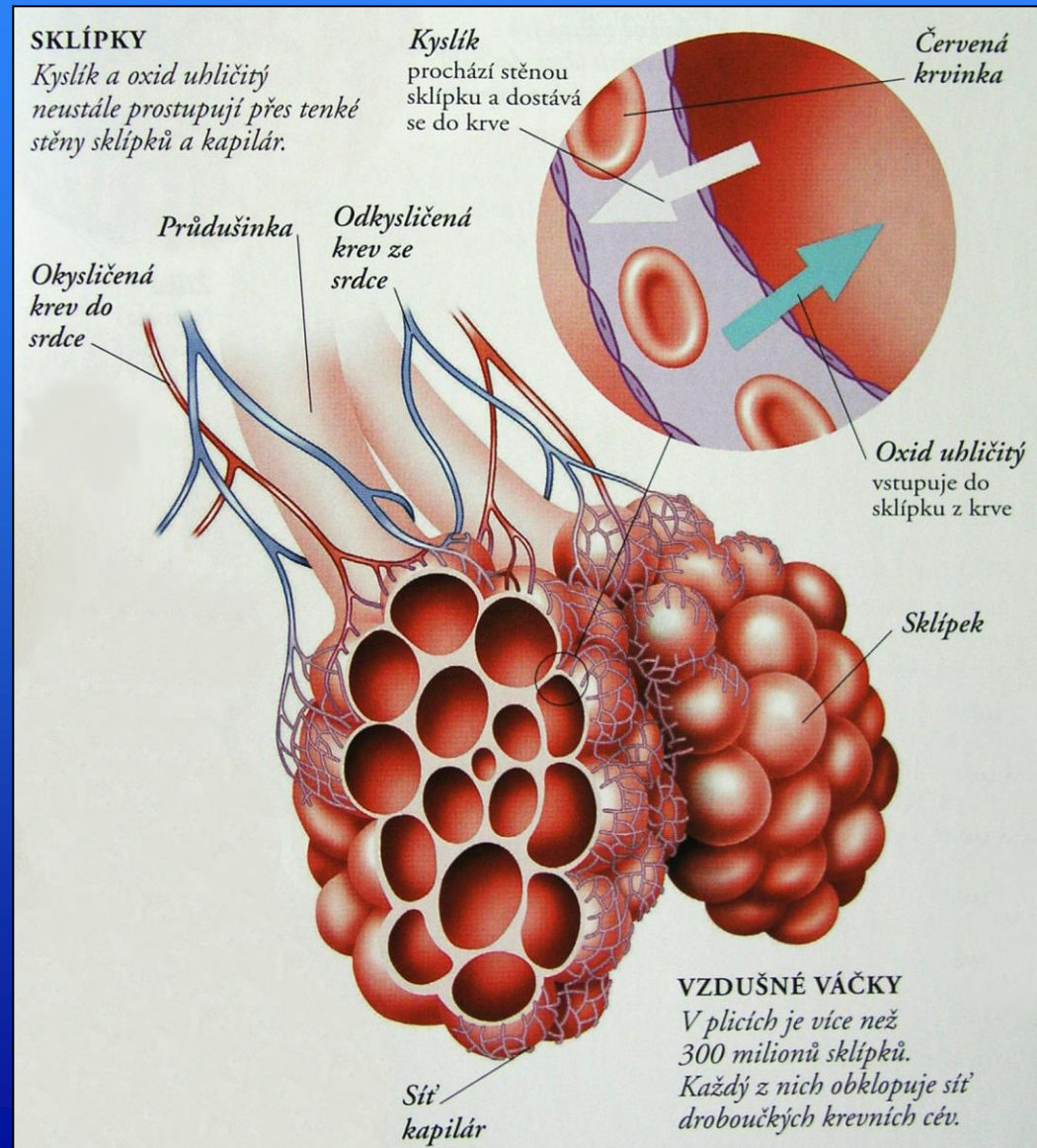


DÝCHACÍ CESTY V PLICÍCH

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 – rychlá intoxikace



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



TEPNY DO MOZKU

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

Horní dutá žíla
dopravuje odkysličenou krev z horní části těla do srdce

Plicní žíla
přivádí odkysličenou krev z plic do srdce; jediná žíla dopravující odkysličenou 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 odkysličenou krev do všech částí těla

Fakt

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 několikalivrstvou stěnu tepny (bíle), která rytmickými stahy usnadňuje rychlé proudění krve.



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 odkysličenou krev do dolní části těla



TEPNY V RUCI

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

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 dlaníový oblouk

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.

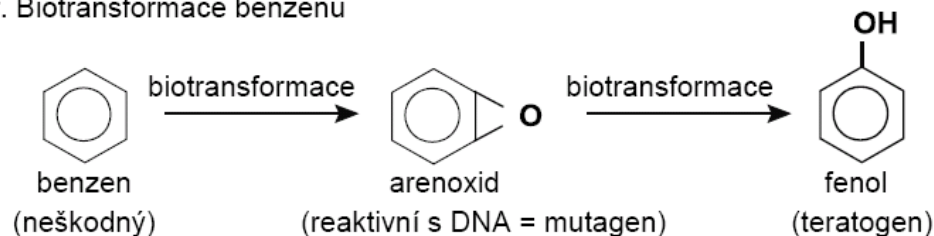
Účinek na toxicitu

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

Lokalizace

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

Př. Biotransformace benzenu



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

Příjem:

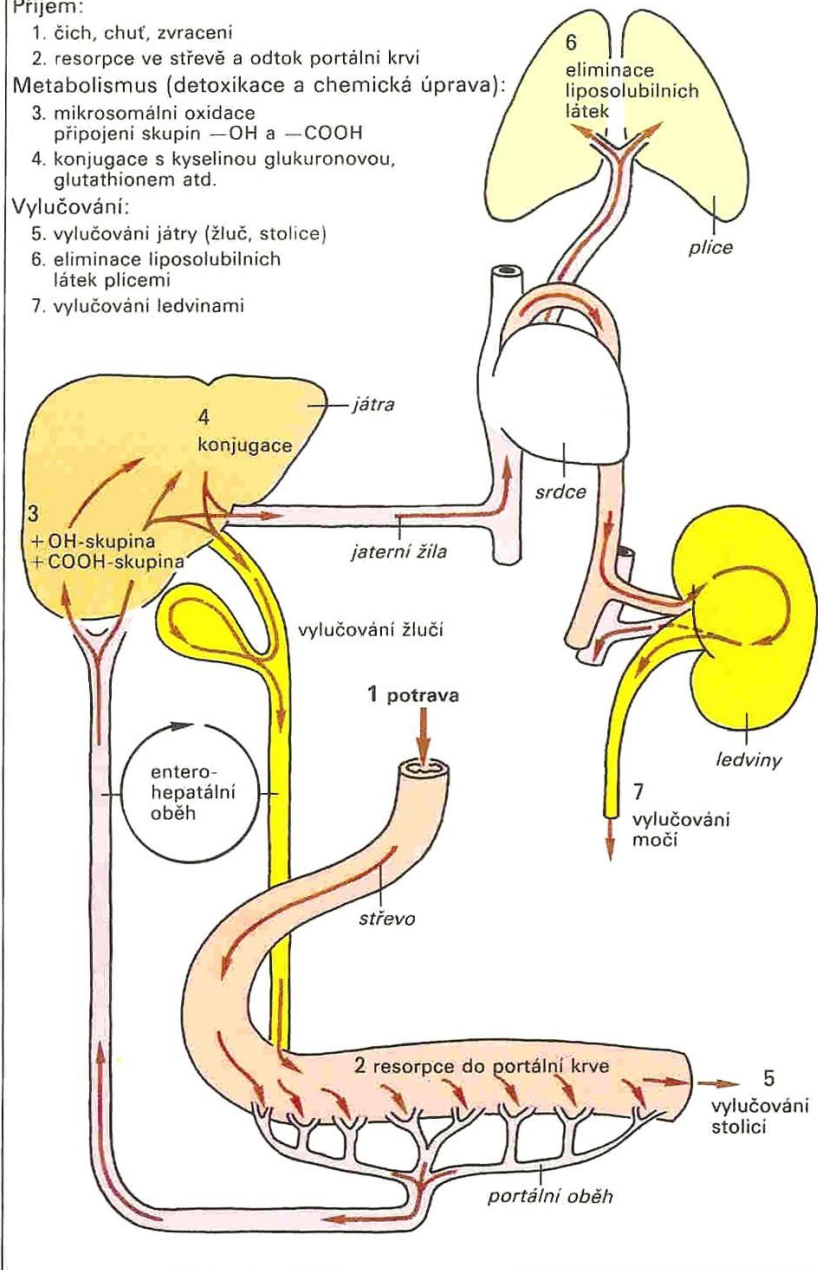
1. dých, chuť, zvracení
2. resorpce ve střevě a odtok portální krve

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

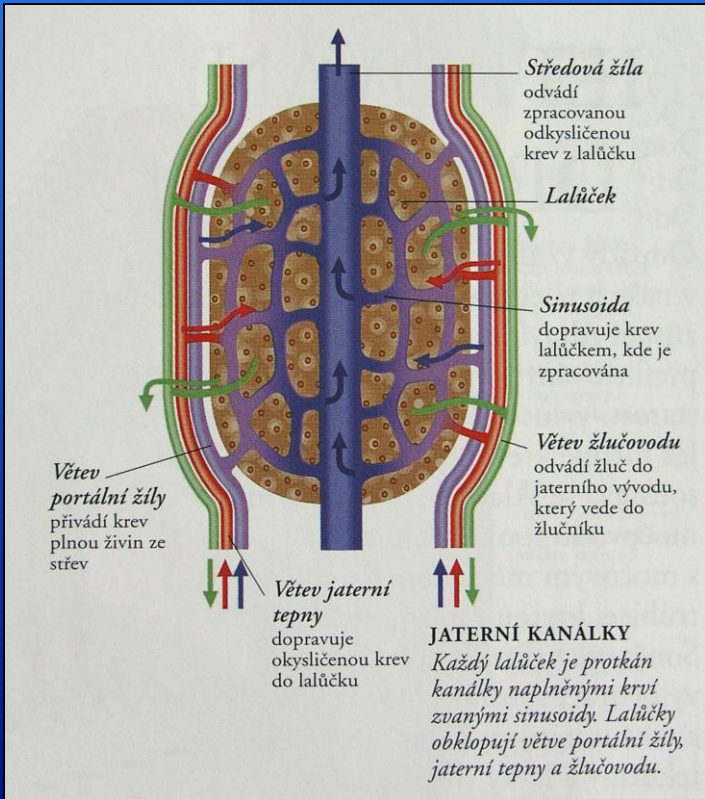
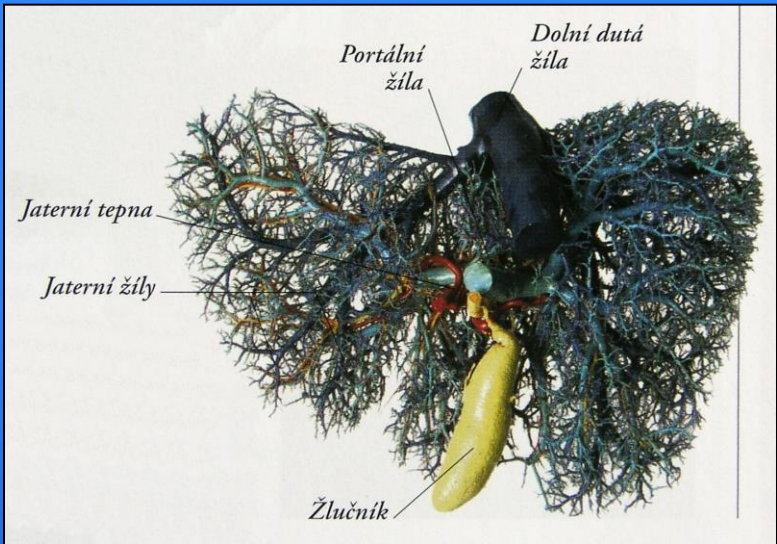
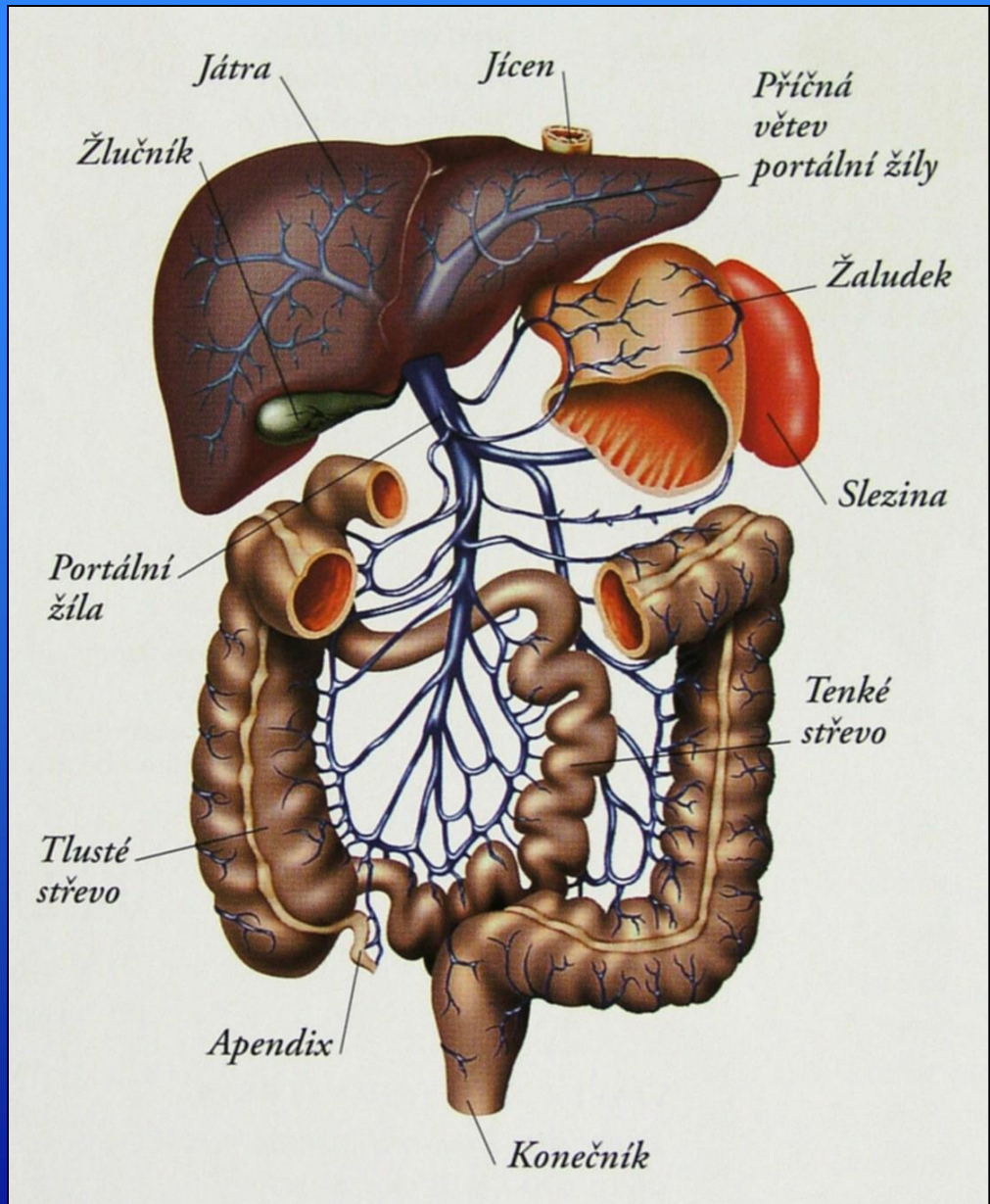


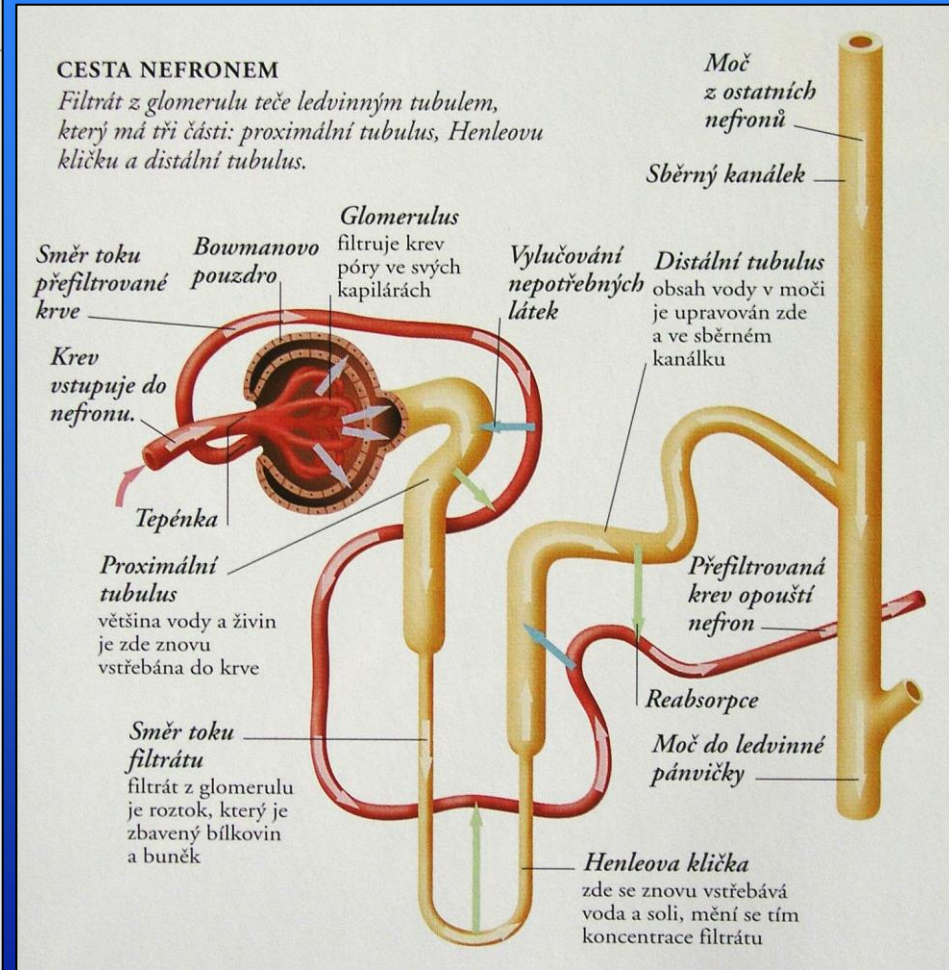
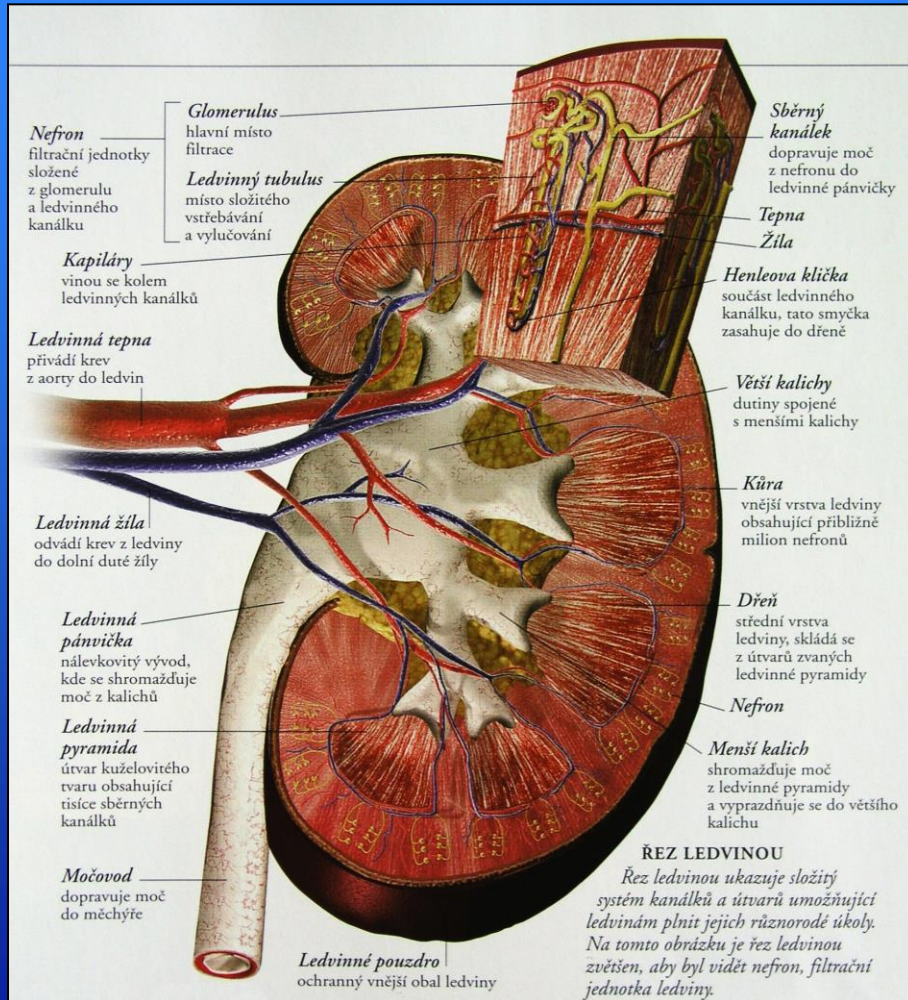
A. Mechanismy selekce, detoxikace a vylučování

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**





CHEMICKÁ KARCIINOGENEZE

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)

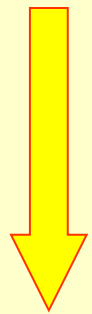
Důkazy karcinogenity

- 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 l.elektrofilní – napadají nukleofilní receptor – DNA, RNA, proteiny... kovalentní vazbou vznikají „alterované molekuly“)



chemický karcinogen (prekarcinogen)
aktivní chem.karcinogen (elektrofilní)
kritická biomakromolekula (alterovaná)
neoplastie (maligní buňka) (*reverzibilní děj*)

reverze - *absolutní* – buňka v původní podobě

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

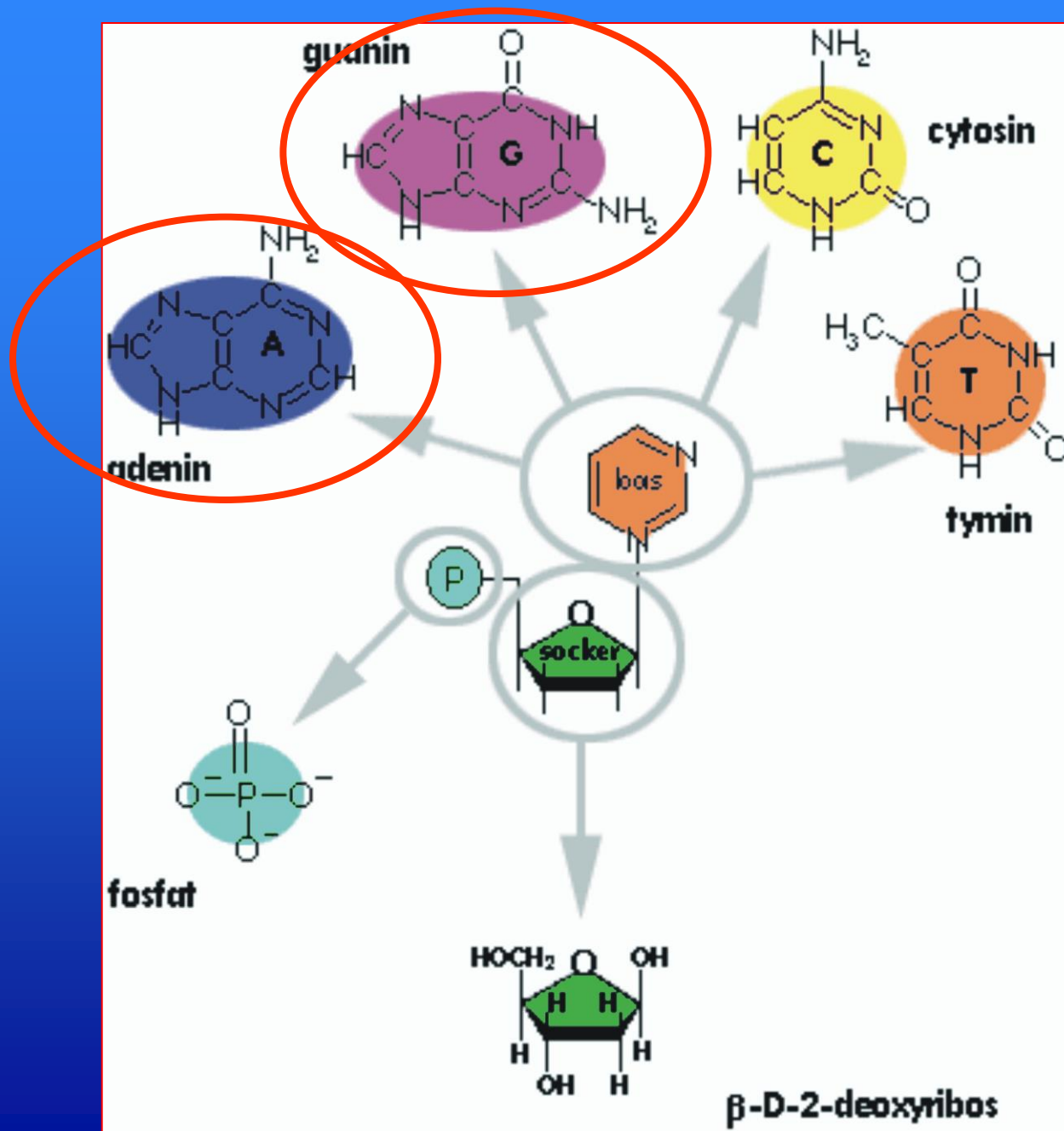
-**CH₃** (malý) – proniká snadno do struktury DNA, častý receptor – **atom N** v bázi

-**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*

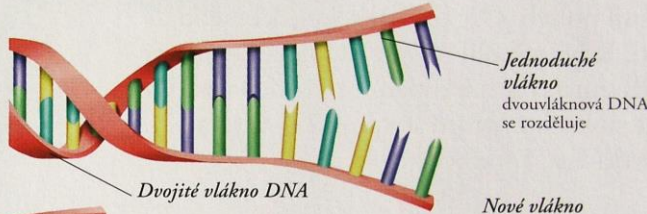
vazba – vodíkovým můstkem (deriváty antrachinonu)

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 *vpravo*) 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.

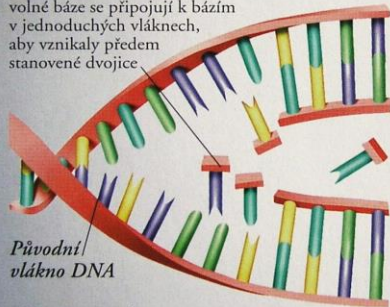
FÁZE PRVNÍ

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.



Dvojité vlákno DNA

Nové vlákno DNA

Původní vlákno DNA

FÁZE DRUHÁ

Volné báze se spojují s oběma jednoduchými vlákny DNA. Pořádí, 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 mutogeneze se jedná prakticky o **stejnou příčinu, ale různý následek**.

Mutogeneze – 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 mláďat 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 mlád'at ve vrhu 1-13



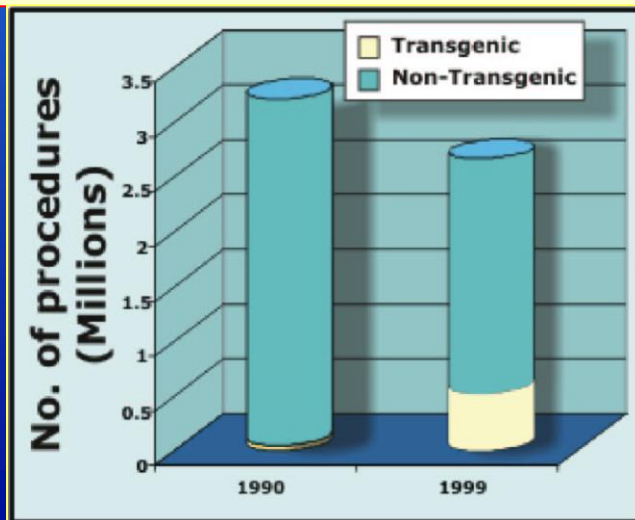
Pes domácí (Canis familiaris)

- nejčastěji plemeno Beagle, (v ČR lab.pes Horákův do 80-tých 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 - normy

- **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

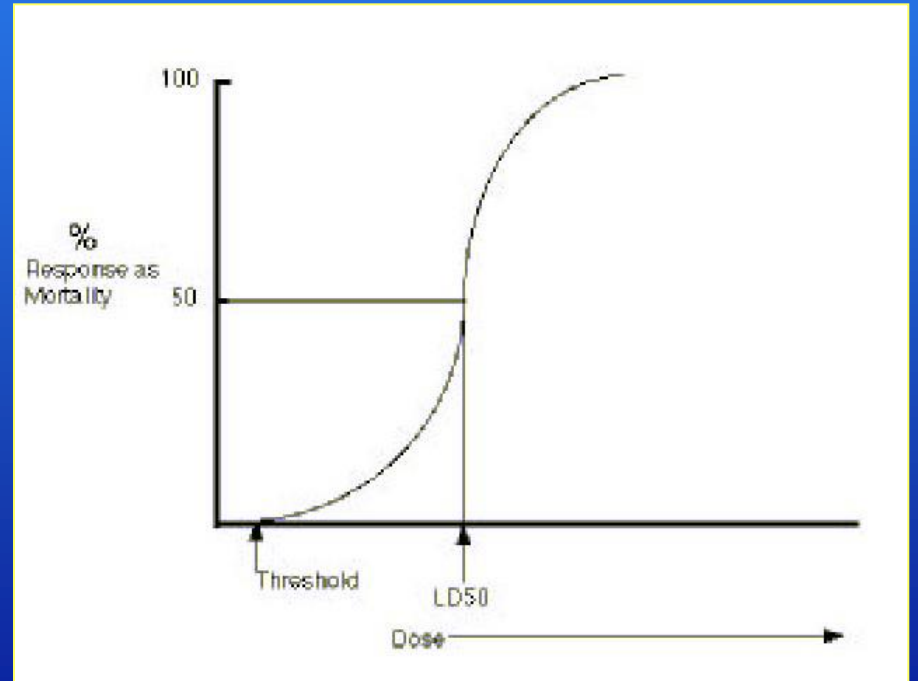
- nejnižší – detekce intoxikace, ale zachování života
 - střední – odpovídá 1/10 max. dávky
 - maximální – trochu nižší než LD_{50}
-
- Frekvence – normálně 1x denně

Testy na akutní toxicitu

informace o způsobu toxického působení, zjištění LD₅₀

Akutní orální toxicita (úvodní zkouška)

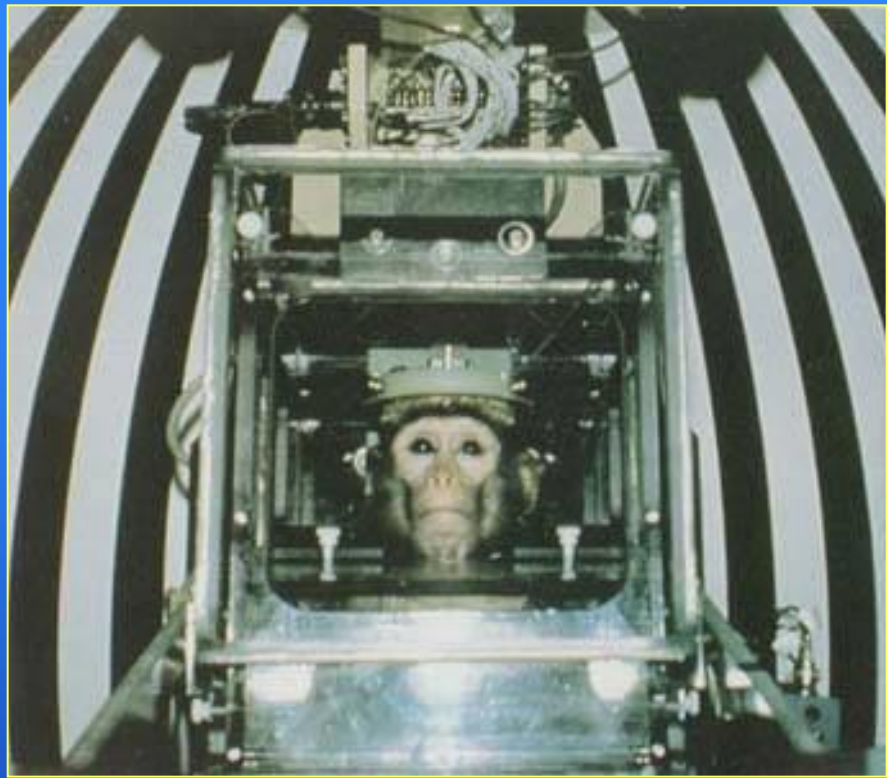
- Škodlivý účinek látky po krátkodobé expozici, nebo po několika dávkách během 24 h
- Dávka – hmotnost aplikované látky / jednotku tělesné hmotnosti lab.zvířete
- Reakce na dávku – vztah mezi tox.účinkem a dávkou
- Střední smrtelná dávka LD₅₀
- Nosič tox.látky – voda, olivový olej...
- Nejvyšší aplikovaný 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 stále 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

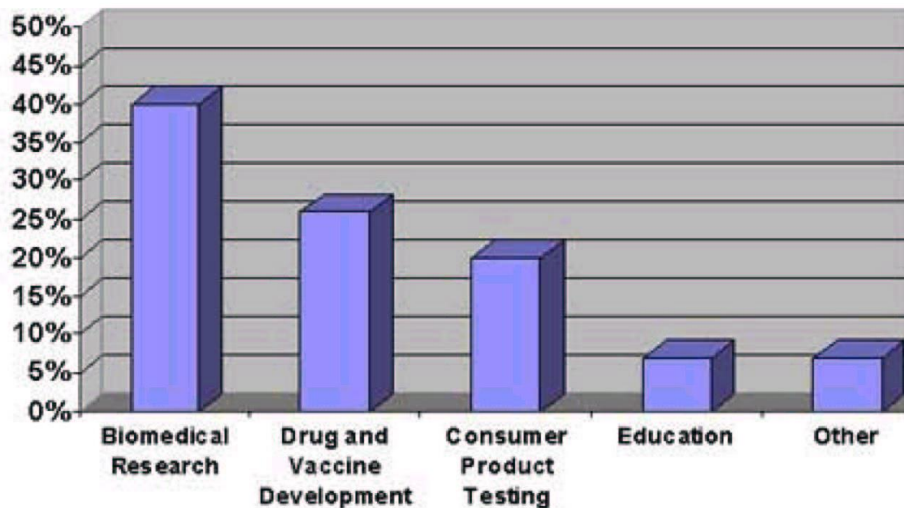
Testy na chronickou toxicitu









- 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)



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



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

Podpis zodpovědného pracovníka MŽP:



Razítko:

STÁTNÍ 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 Zámkem 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 inspekce 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

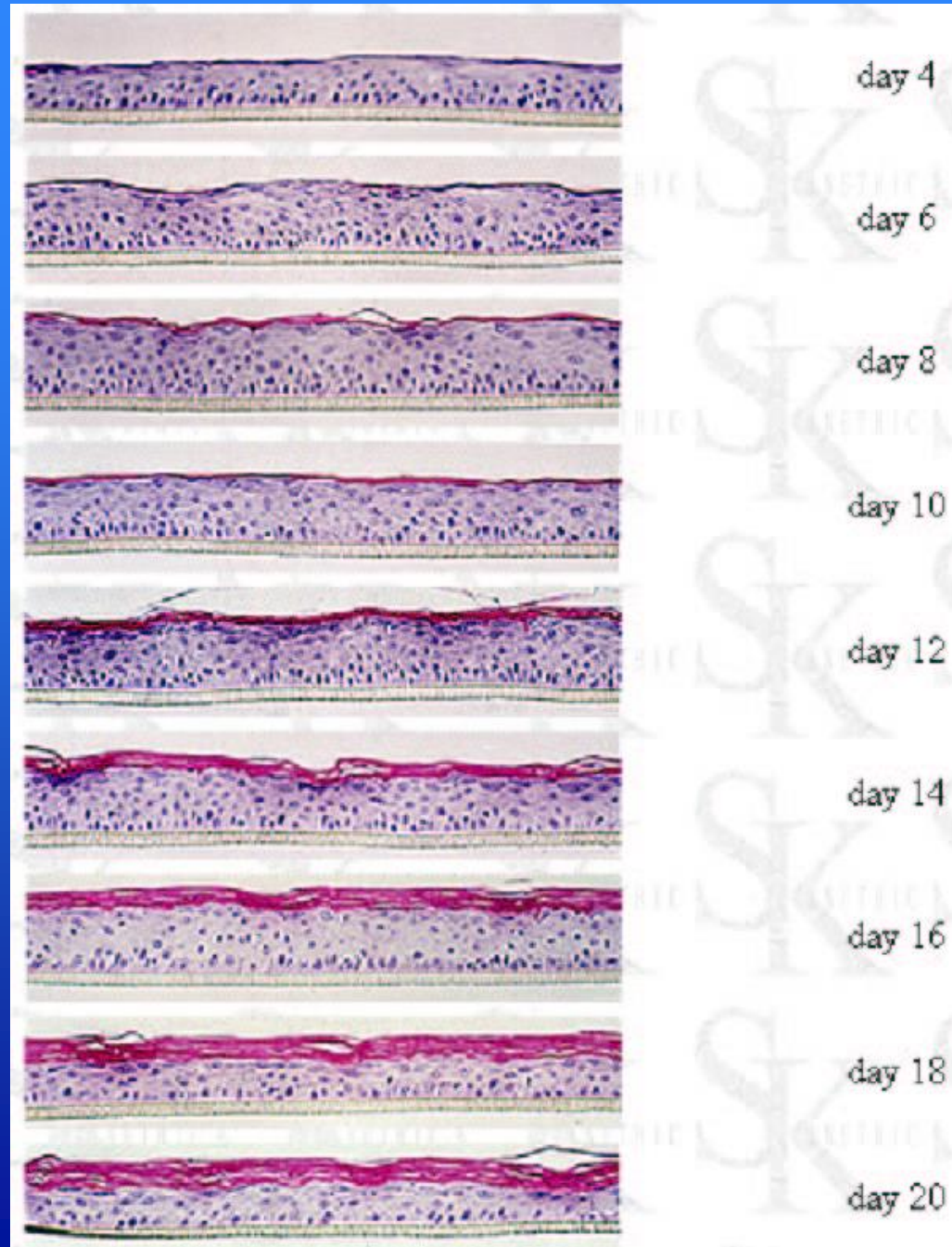
Náhrady klasických testů

- 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 cytotoxicity, 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%

Rozdělení toxických látek dle akutní toxicity

DL ₅₀ perorálně, potkan	charakteristika	přibližně odpovídající smrtelná dávka pro člověka	porovnávací látka, DL ₅₀ perorálně, potkan
< 5 mg/kg	krajně jedovatá	špetka (cca 0,1 g)	TEPP 1,2 mg/kg fluorocetan Na ⁺ 1,5 mg/kg
5 - 50 mg/kg	velmi jedovatá	čajová lžička (4 ml)	KCN 13 mg/kg HgCl ₂ 37 mg/kg
50 - 500 mg/kg	jedovatá	polévková lžice (30 g)	NaF 200 mg/kg DDT 400 mg/kg
0,5 - 5 g/kg	málo jedovatá	šálek (250 g)	amylalkohol 1,0 g/kg ethylenglykol 6,1 g/kg
5 - 15 g/kg	prakticky nejedovatá	půllitr	aceton 9,8 g/kg ethanol 14,0 g/kg
> 15 g/kg	relativně nejedovatá	litry nebo kg	glycerin 28,0 g/kg

TEPP - tetraethylpyrofosfát, $(C_2H_5-O)_2-PO-P-PO-(O-C_2H_5)_2$

Př. Nejsilnější jed = BOTULOTOXIN (neurotoxin, tzv. klobásový jed)

- produkt bakterie *Clostridium Botulinum*
- LD = $6 \cdot 10^{-9}$ g pro člověka
- 36 g je schopno usmrtit veškeré obyvatelstvo Země
- Neškodný pro želvy

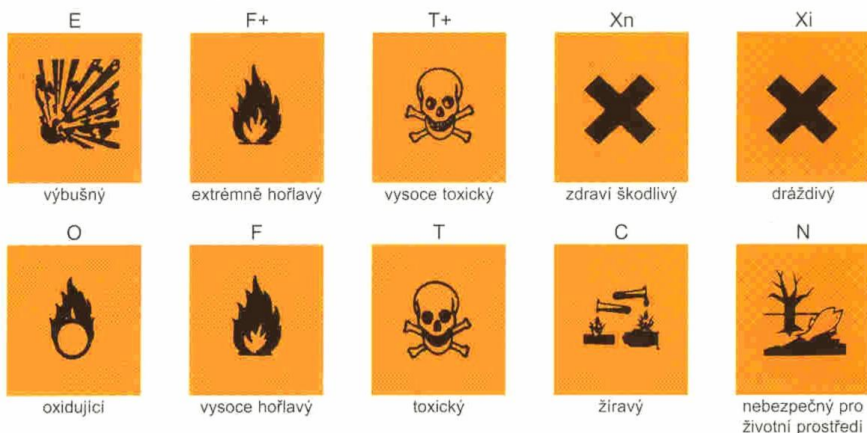
Př. Nejvíce otrav v historii lidstva způsobeno oxidem uhelnatým

- produkt nedokonalého spalování (pomalé hoření)
- krevní jed (blokuje krevní barvivo, nejcitlivější je CNS)
- projevy intoxikace při vazbě nad 10 % CO

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

PÍSEMNÉ SYMBOLY NEBEZPEČNOSTI

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

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

Jednoduché R a S věty

Kombinace R-vět

Kombinace S-vět