

Ekotoksykologia

Miary toksyczności

Biomarkery

Ogólna teoria stresu

Wpływ substancji toksycznych na populacje

Prof. dr hab. Ryszard Laskowski
Instytut Nauk o Środowisku UJ
Ul. Gronostajowa 7, Kraków
pok. 2.1.2

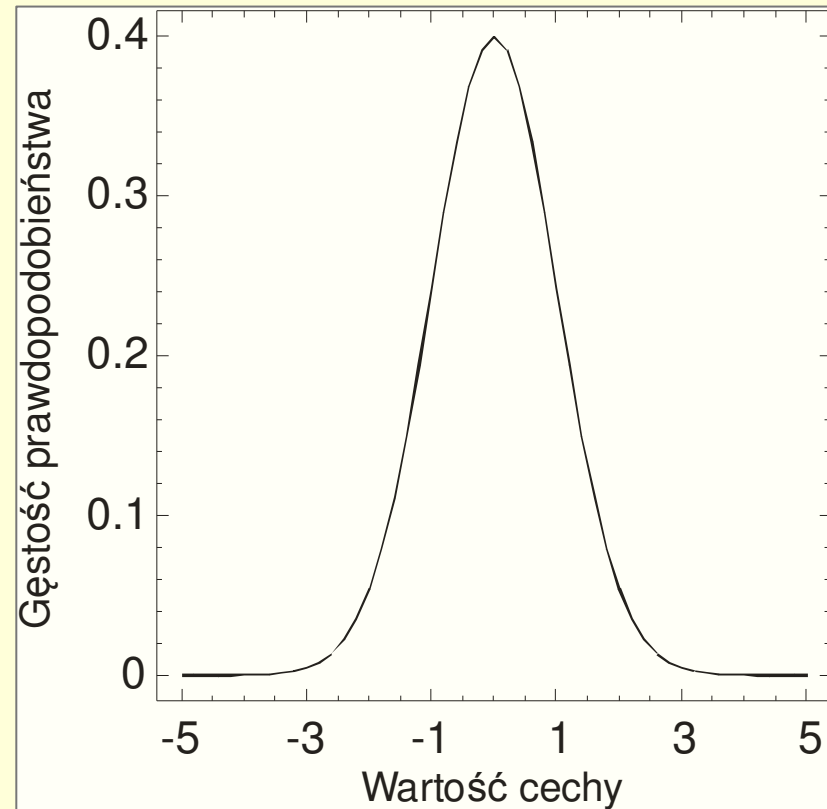
<http://www.eko.uj.edu.pl/laskowski>

Toksykologia a ekotoksykologia

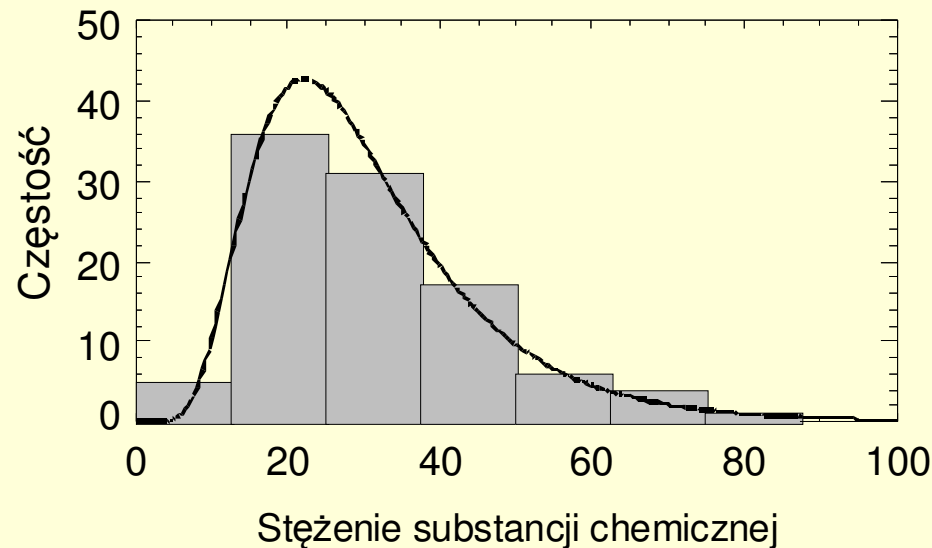
- Toksykologia:
 - wypracowana metodyka (obserwacja pojedynczych organizmów lub komórek)
 - jasne miary toksyczności (dawka letalna i LD_{50} , stężenie letalne i LC_{50} , etc.)
- Ekotoksykologia:
 - czy można stosować metody stosowane w toksykologii?

Pamiętajmy: „...wyższe poziomy organizacji niż pojedynczy osobnik...” – populacja to nie to samo co organizm!

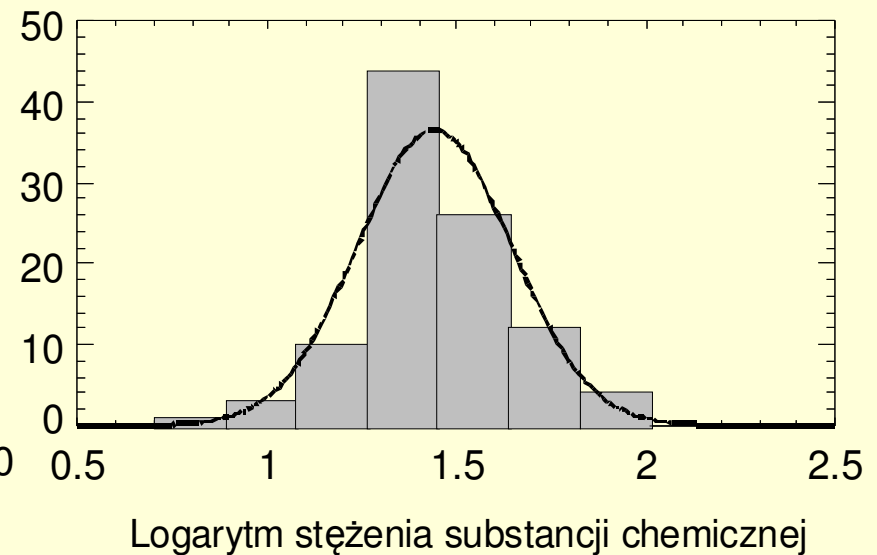
- Osobniki różnią się tolerancją na warunki środowiskowe – rozkład cech w populacji można z reguły opisać tzw. *krzywą Gaussa* (*rozkład normalny*)



W ekotoksykologii na ogół interesuje nas rozkład
wrażliwości na stężenia substancji toksycznych w
populacji

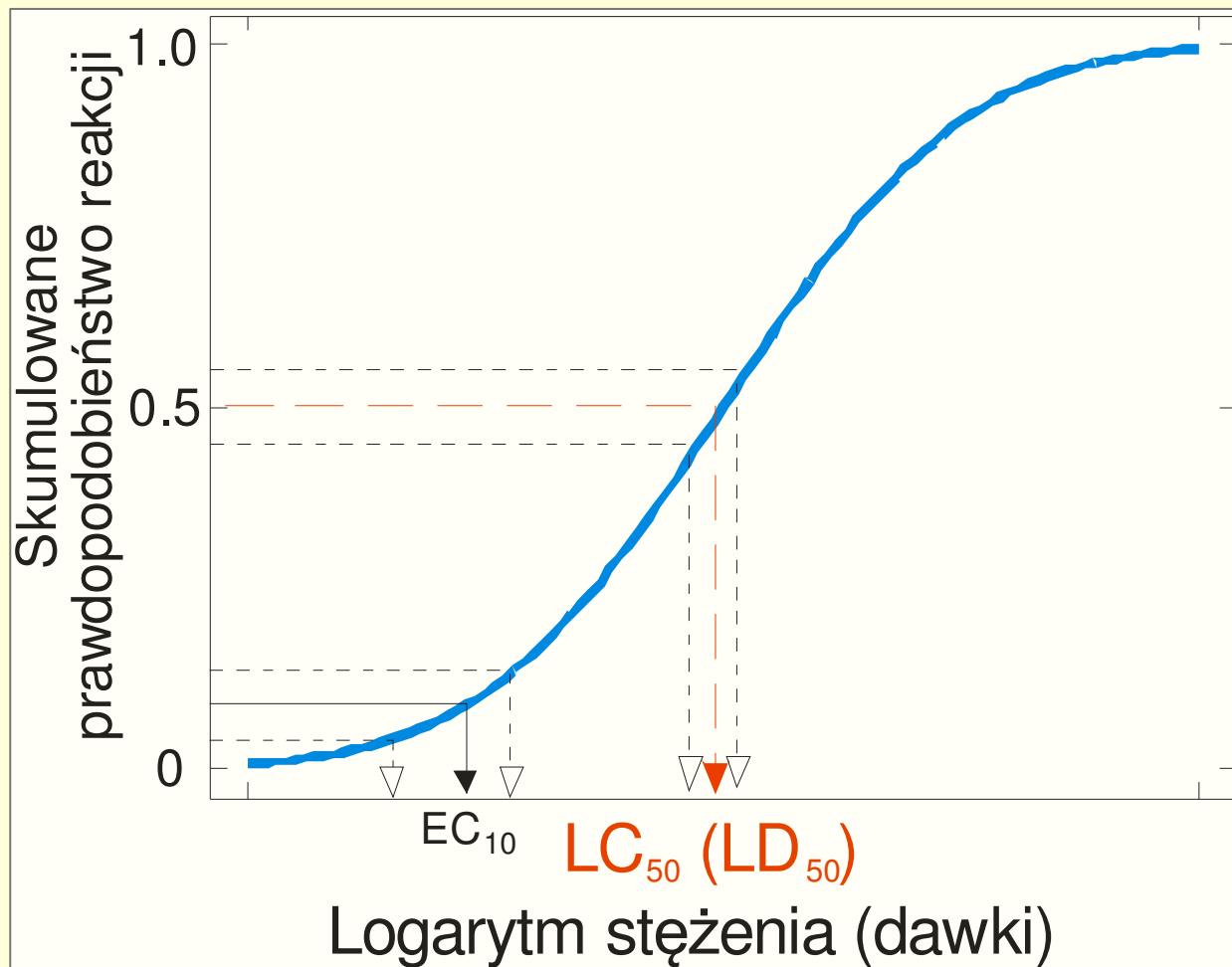


Rozkład log-normalny: brak wartości
poniżej zera, prawo-skośny



Ten sam rozkład po
zlogarytmowaniu osi odciętych

Krzywa skumulowanego rozkładu (dystrybuanta) log-normalnego jako podstawa jednej z najważniejszych technik w (eko)toksykologii: wyznaczanie **LC₅₀** - stężenia powodującego 50% śmiertelność w populacji



LC₅₀ - bardzo dobra miara w toksykologii:

- duża dokładność
- dobre podstawy statystyczne

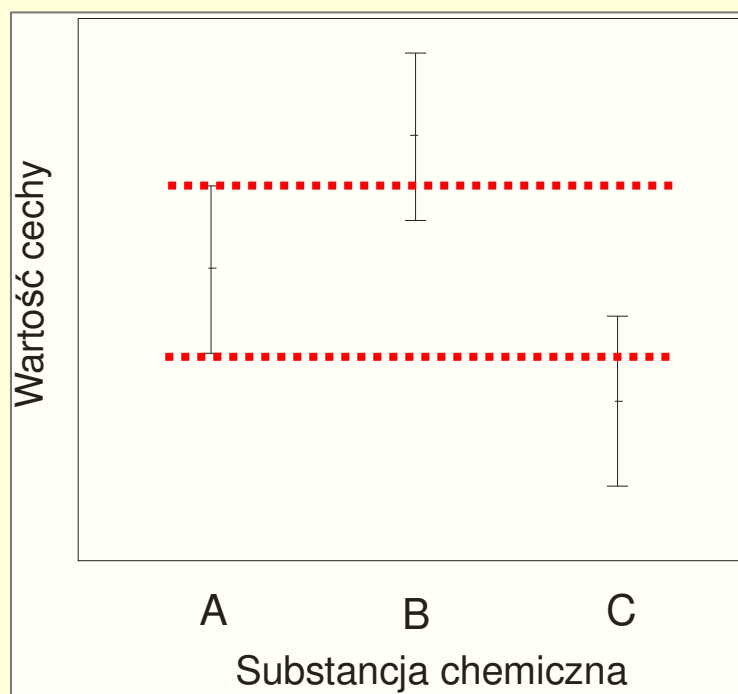
Czy równie przydatna w ekotoksykologii?

W poszukiwaniu dobrych miar toksyczności

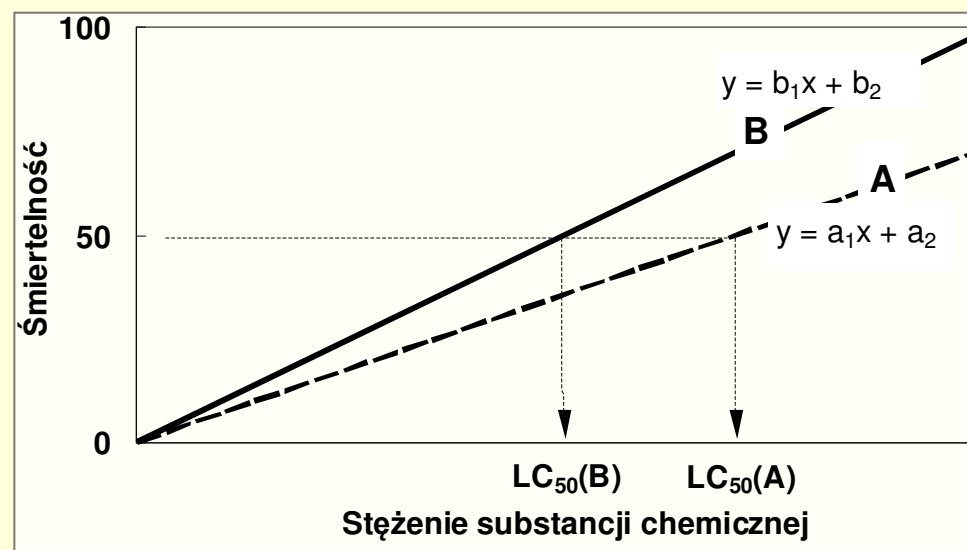
Analiza wariancji (ANOVA)

zalety: dość jasne wyniki

wady: nic nie wiadomo o zależności dawka-reakcja



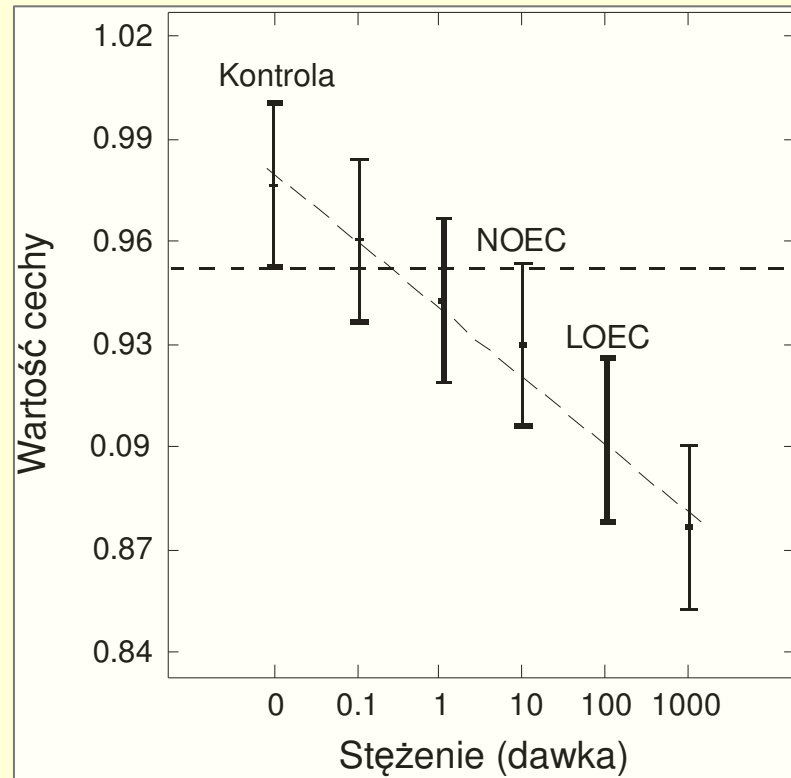
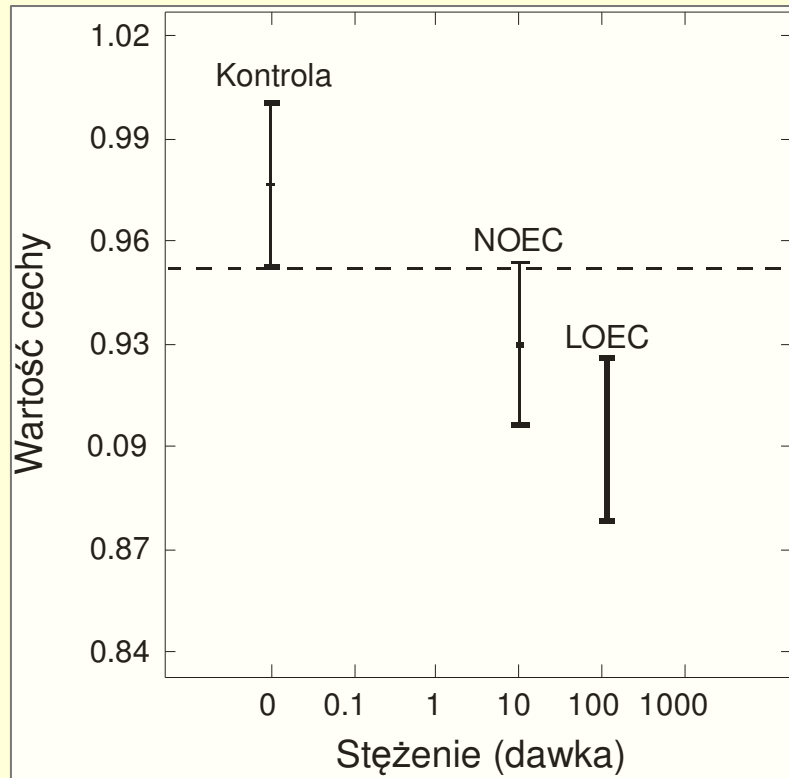
Analiza regresji z porównaniem nachyleń → możliwość porównania toksyczności różnych substancji oraz wyznaczenia wartości LC_{50}



To samo w ekotoksykologii...

- **NOEC** – „No Observed Effect Concentration”
- **LOEC** – „Lowest Observed Effect Concentration”

...nie ma sensu!



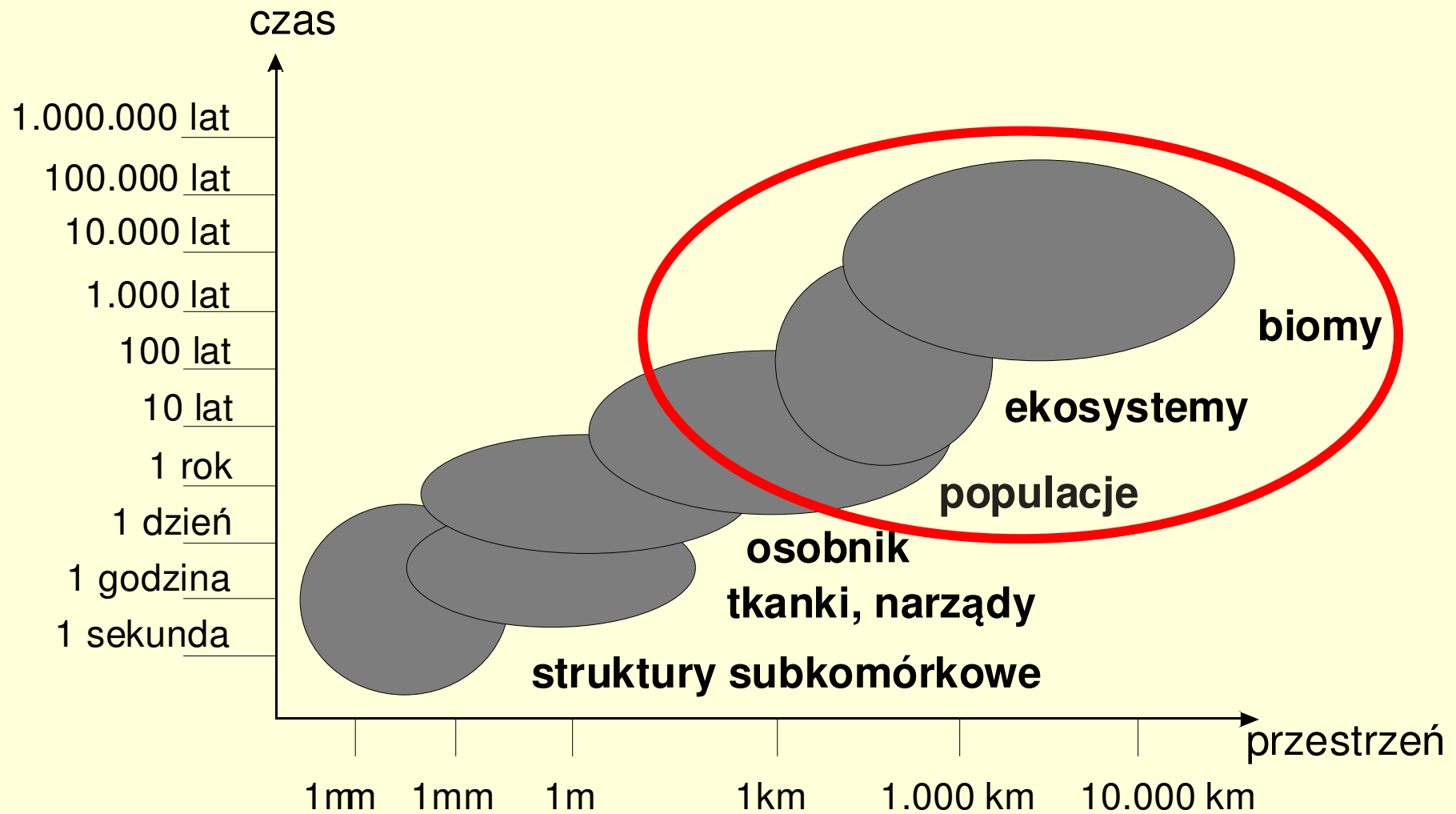
Wyniki uzyskane przy pomocy sześciu różnych testów *a posteriori*, zastosowanych do porównania średnich z dziesięciu prób pobranych losowo z dwóch populacji: X o średniej $\mu_X=90$ oraz Y o średniej $\mu_Y=100$ i równych odchyleniach standardowych $s_X=s_Y=10$; $n=10$, $\alpha=0.05$, $\beta=0.11$. Ta sama litera w kolumnie oznacza brak istotnej różnicy przy założonym poziomie ufności 95%.

Próba	Średnia	Metoda					
		Tukeya	FSD	SNK	SNK	SNK	SNK
X1	86.5	A	A	A	A	A	A
X2	89.4	A B	A	A	A	A	A
X3	89.5	A B	A	A	A	A	A
X4	91.9	A B	A B	A	A	A	A
X5	94.5	A B	A B C	A	A	A	A
Y1	97.7	A B	B C	B	B	B	B
Y2	99.6	A B	B C	B	B	B	B
Y3	99.6	A B	B C	B	B	B	B
Y4	101.7	B	C	C	C	C	C
Y5	102.1	B	C	C	C	C	C

Przykłady świadczące o nieadekwatności kryteriów NOEC i LOEC

Gatunek	Parametr (subst. toks.)	LOEC [mg/kg]	EC ₅₀ [mg/kg]
<i>Cognettia sphagnetorum</i>	Przyrost masy (Cu)	100	8
<i>Folsomia candida</i>	Reprodukcja (Cu)	800	658
<i>Folsomia candida</i>	Reprodukcja (LAS)	400	91
<i>Platynothrus peltifer</i>	Reprodukcja (LAS)	1000	467
<i>Eisenia fetida</i>	Liczba kokonów (LAS)	800	558
<i>Eisenia fetida</i>	Liczba kokonów (DMT)	10	5,3
<i>Eisenia fetida</i>	Liczba potomstwa (DMT)	10	7,1

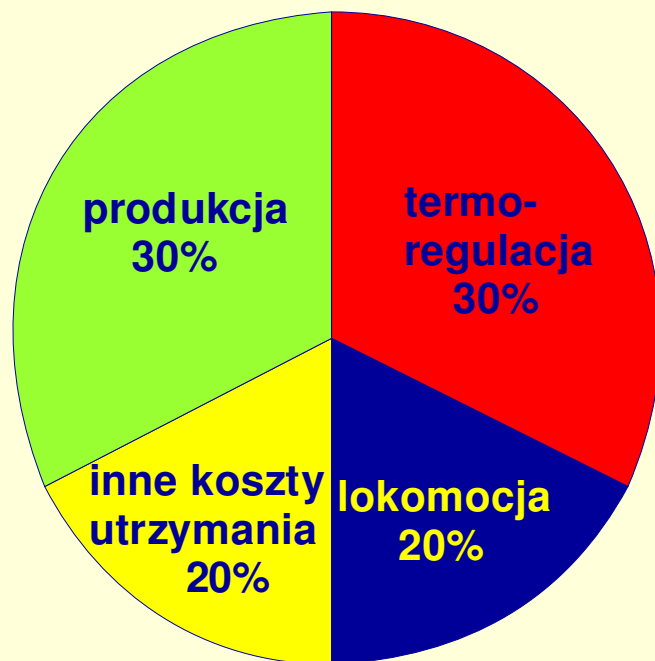
Na problemach statystycznych niestety nie koniec:



Zacznijmy od rzeczy „najprostszych”: od osobnika

Podział zasobów energetycznych na wszelkie potrzeby osobnika

**NORMALNE WARUNKI
ŚRODOWISKOWE**



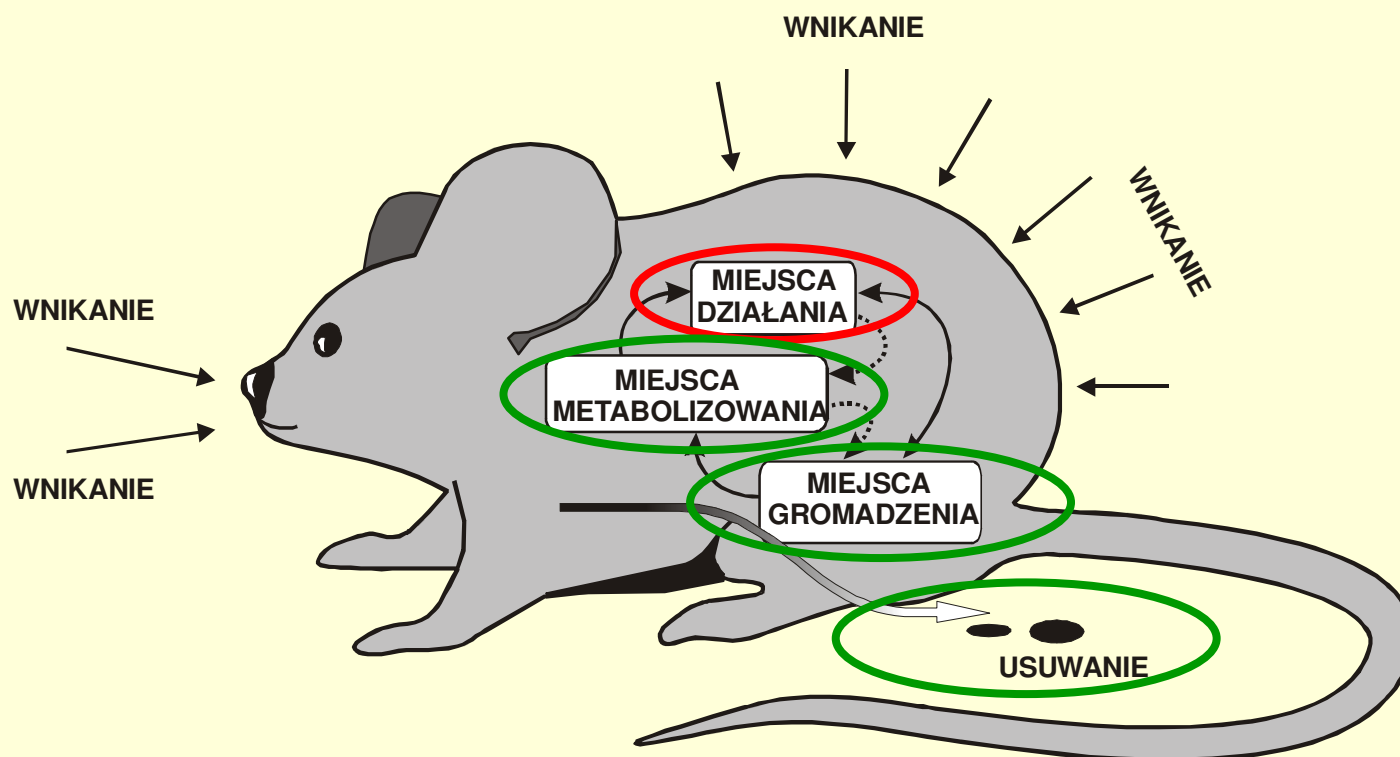
STRES (niska temperatura)



Co powodują substancje toksyczne?

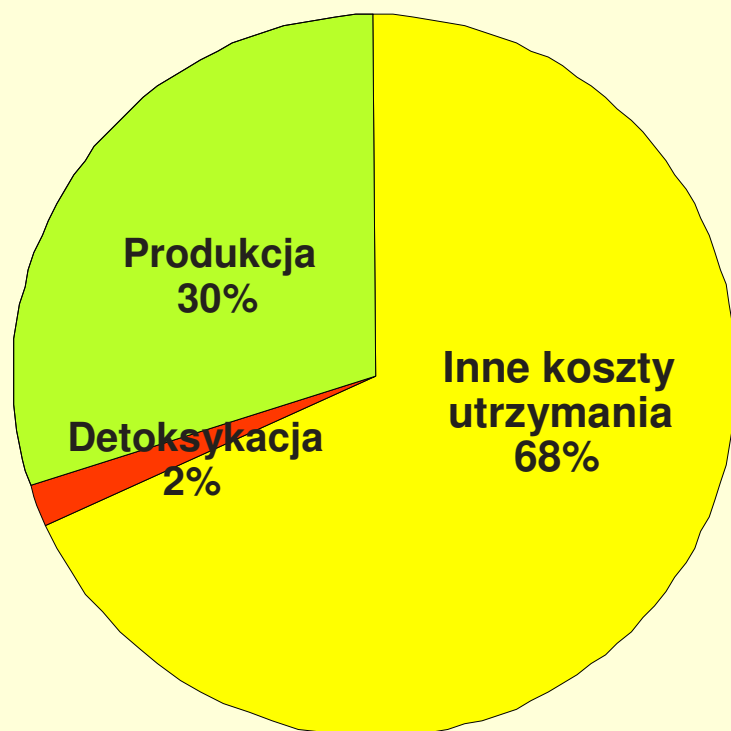
- Toksyczność (głównie blokada enzymów)

- Konieczność metabolizowania (detoksykacji) i wydalania, ew. gromadzenia

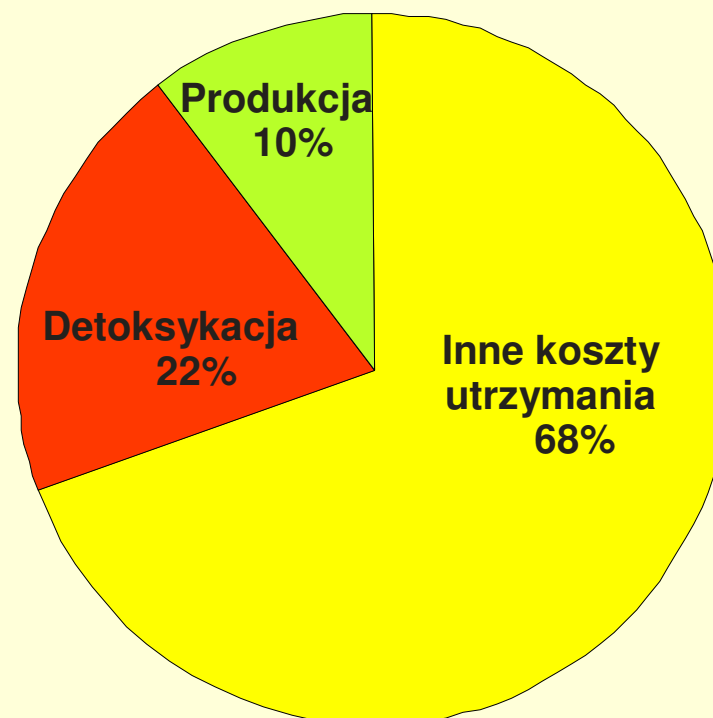


Budżet energetyczny organizmu

Normalne warunki środowiskowe



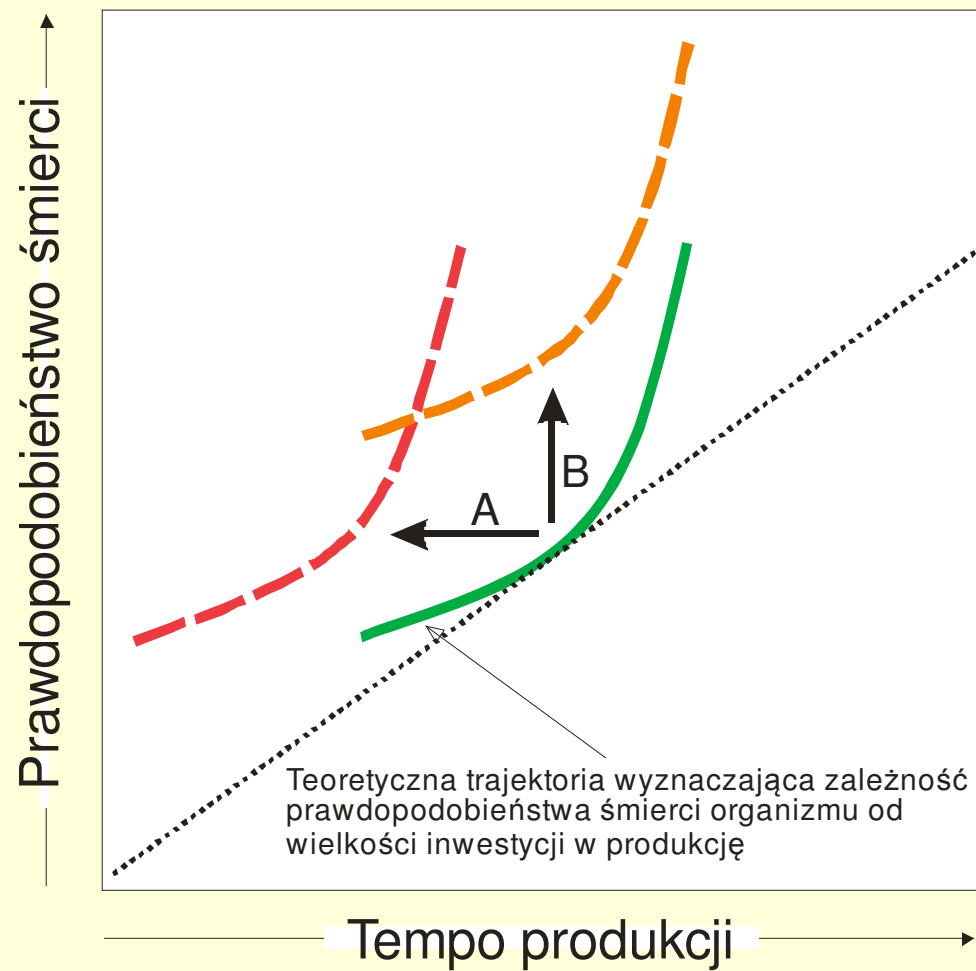
Stres (substancja toksyczna)



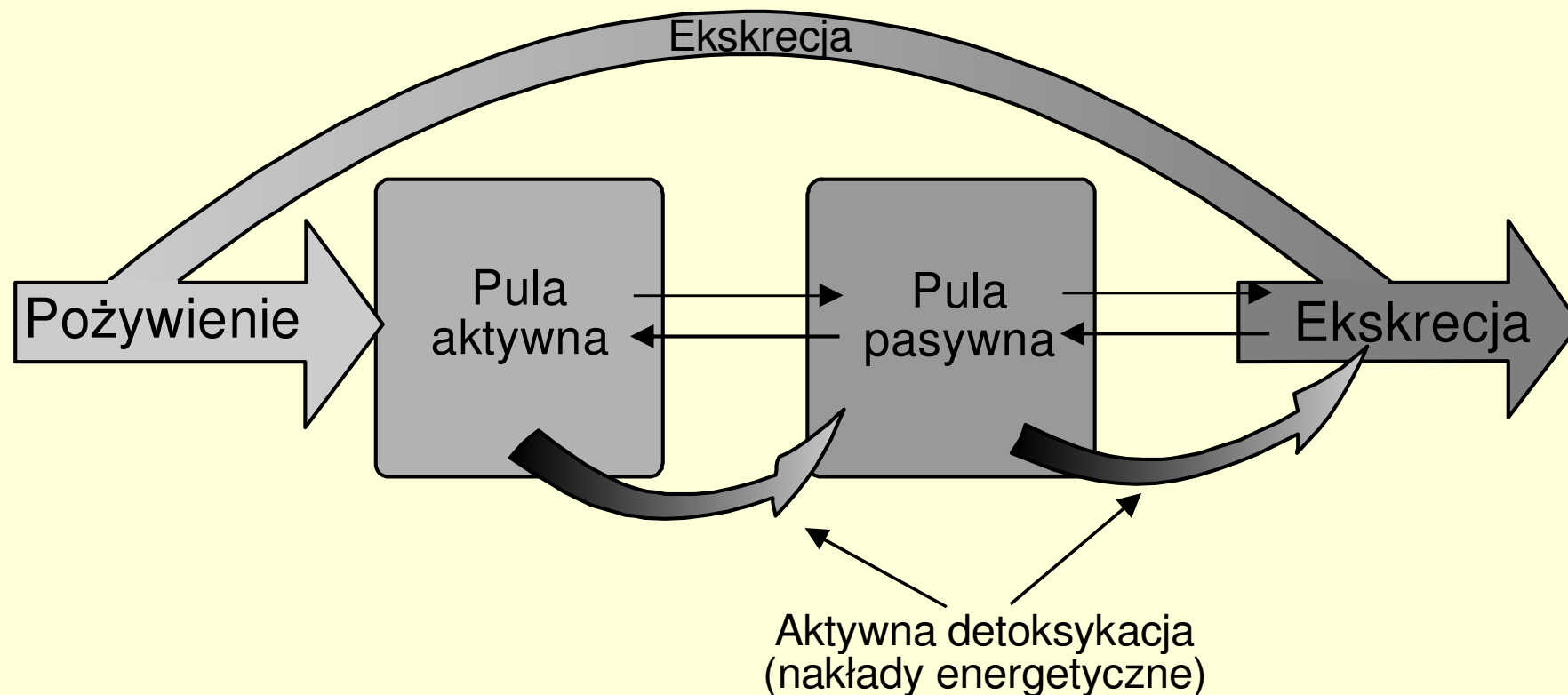
**Budżet energetyczny jest ograniczony:
tempa metabolizmu nie można zwiększać
w nieskończoność**

- metabolizm maksymalny:
 - ssaki – ok. 5-8 × BMR
 - ptaki – ok. 10-15 × BMR
 - zwierzęta zmiennocieplne są ograniczone temperaturą ciała

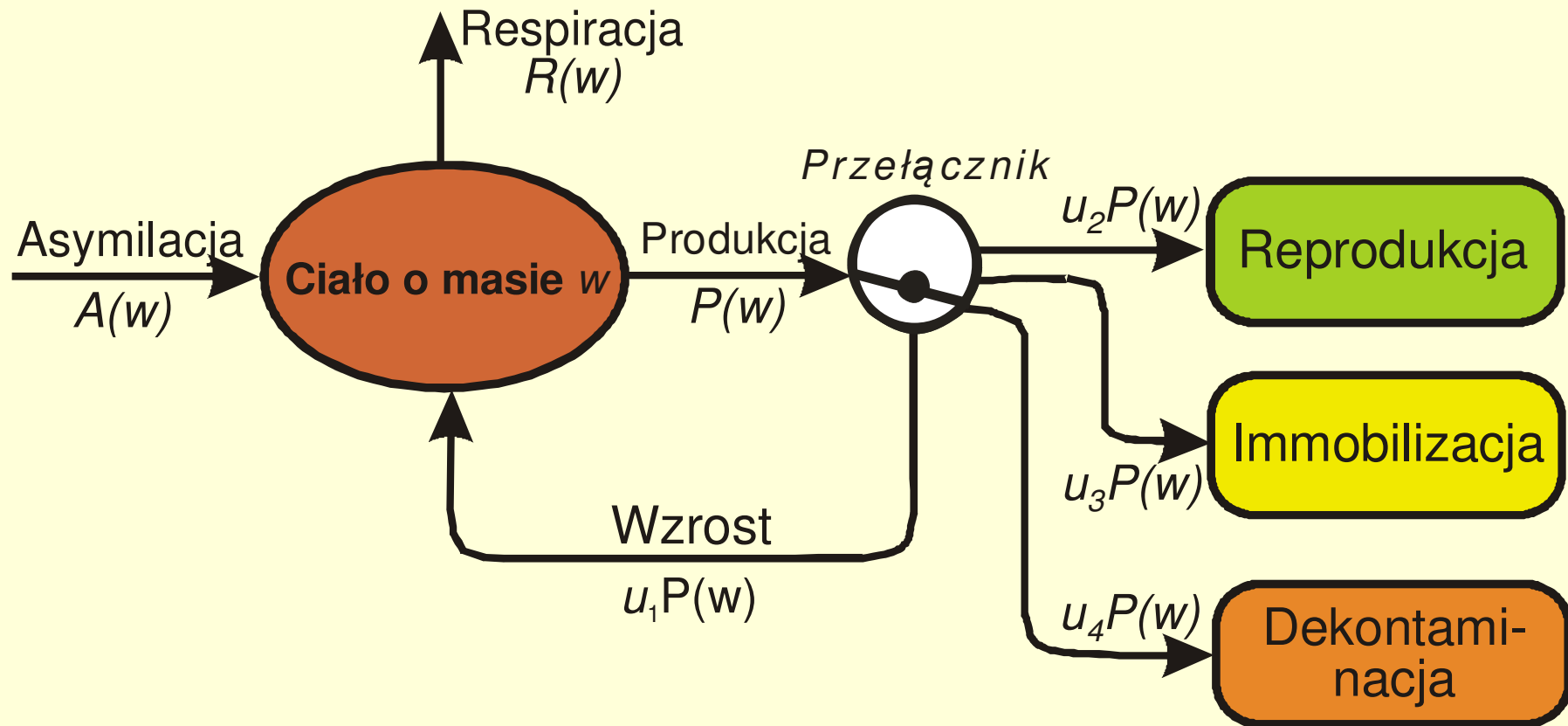
„Ogólna teoria stresu”



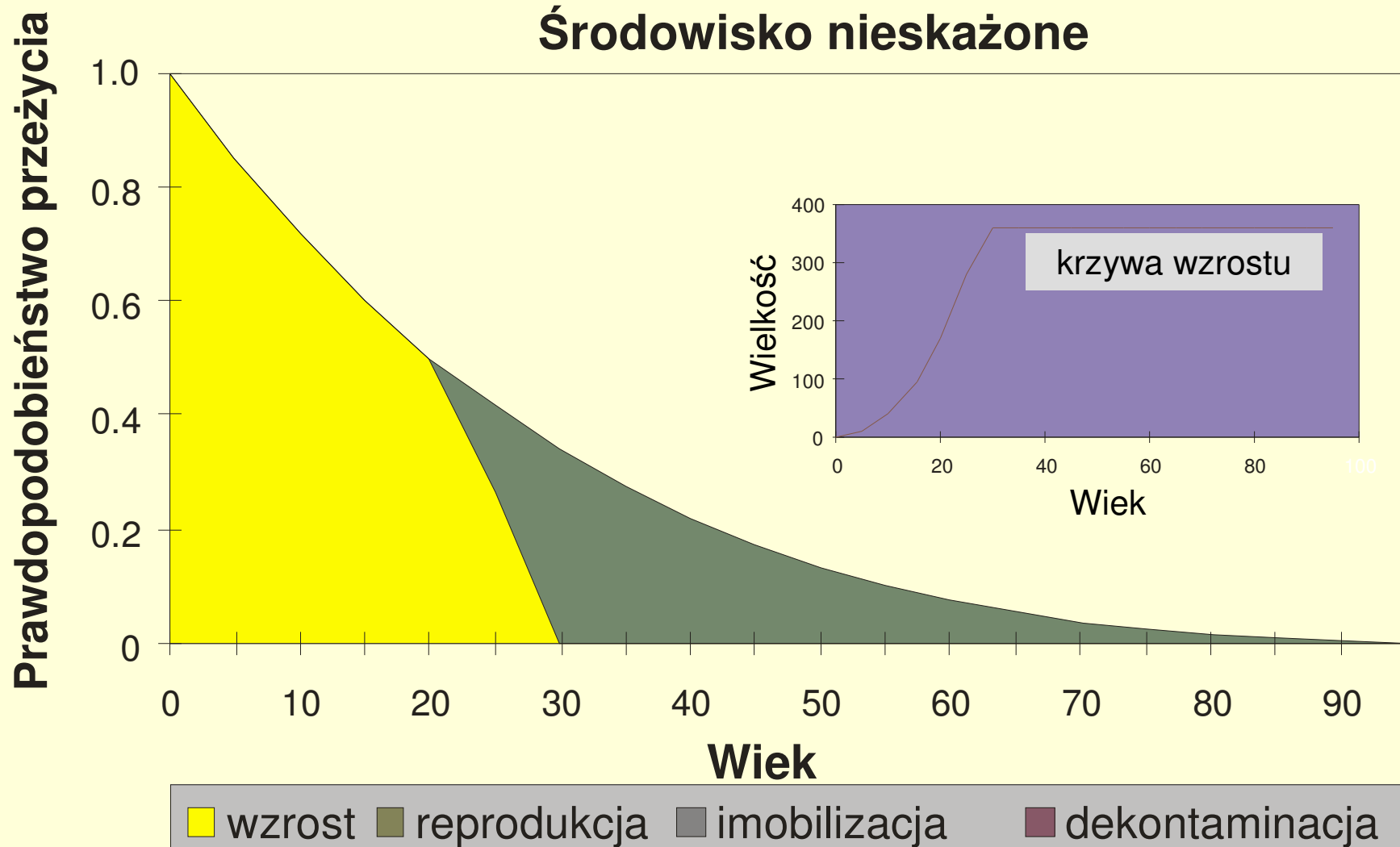
**Koszty powstają na wielu etapach.
Jaka gospodarka jest w tych warunkach
optymalna?**



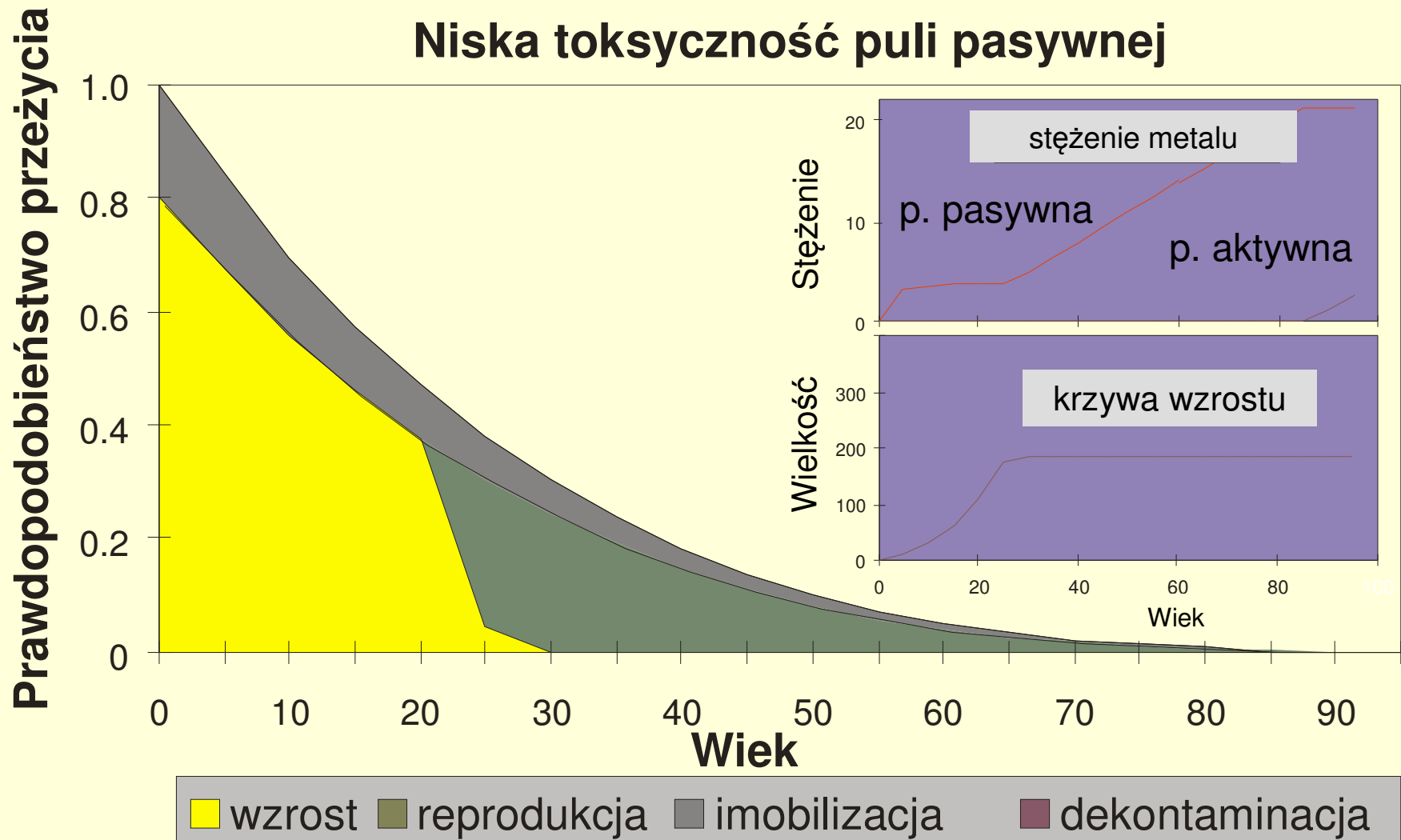
Gospodarowanie energią



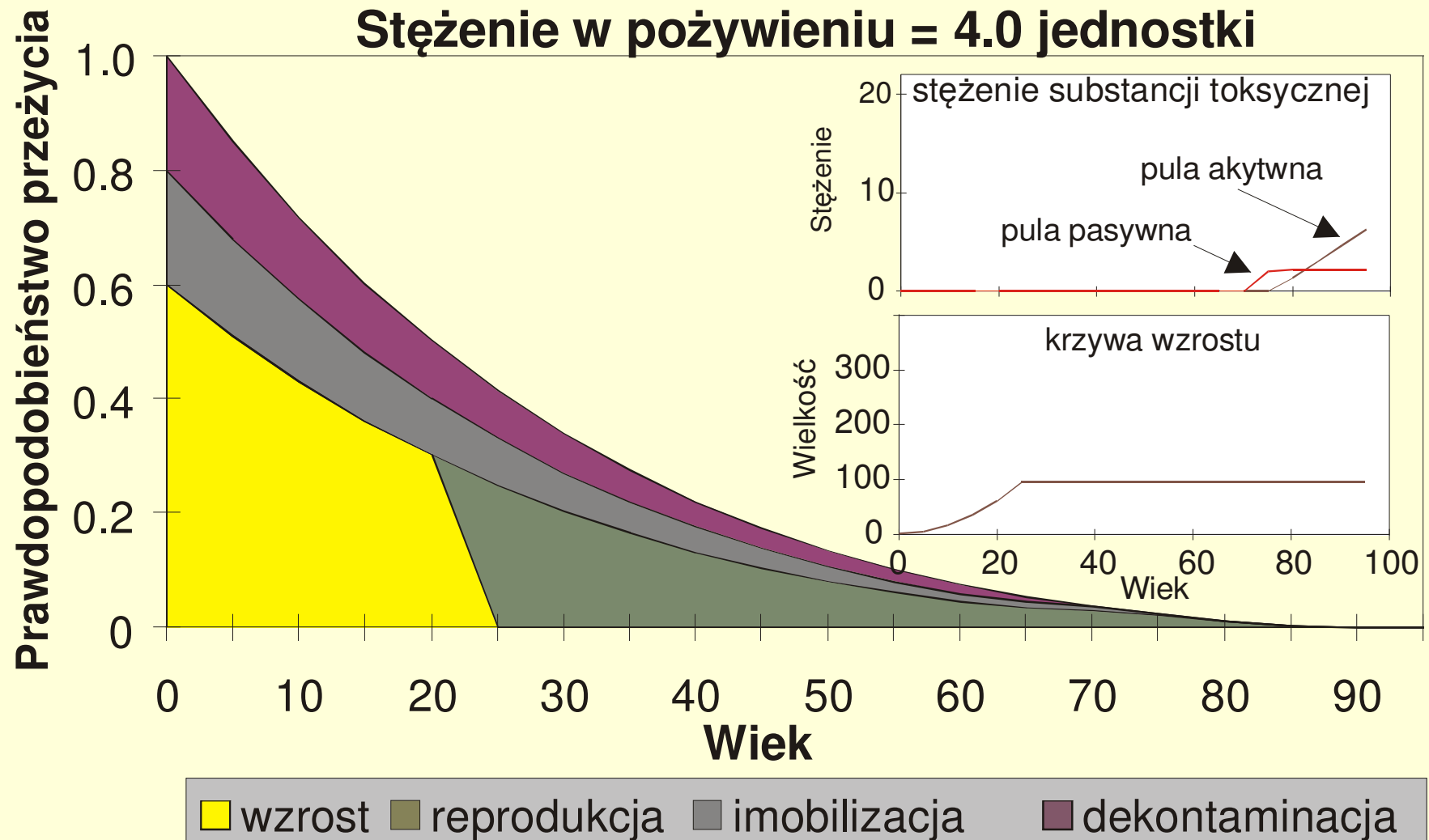
Historia życia organizmu



W skażonym środowisku część energii trzeba przeznaczyć na detoksykację



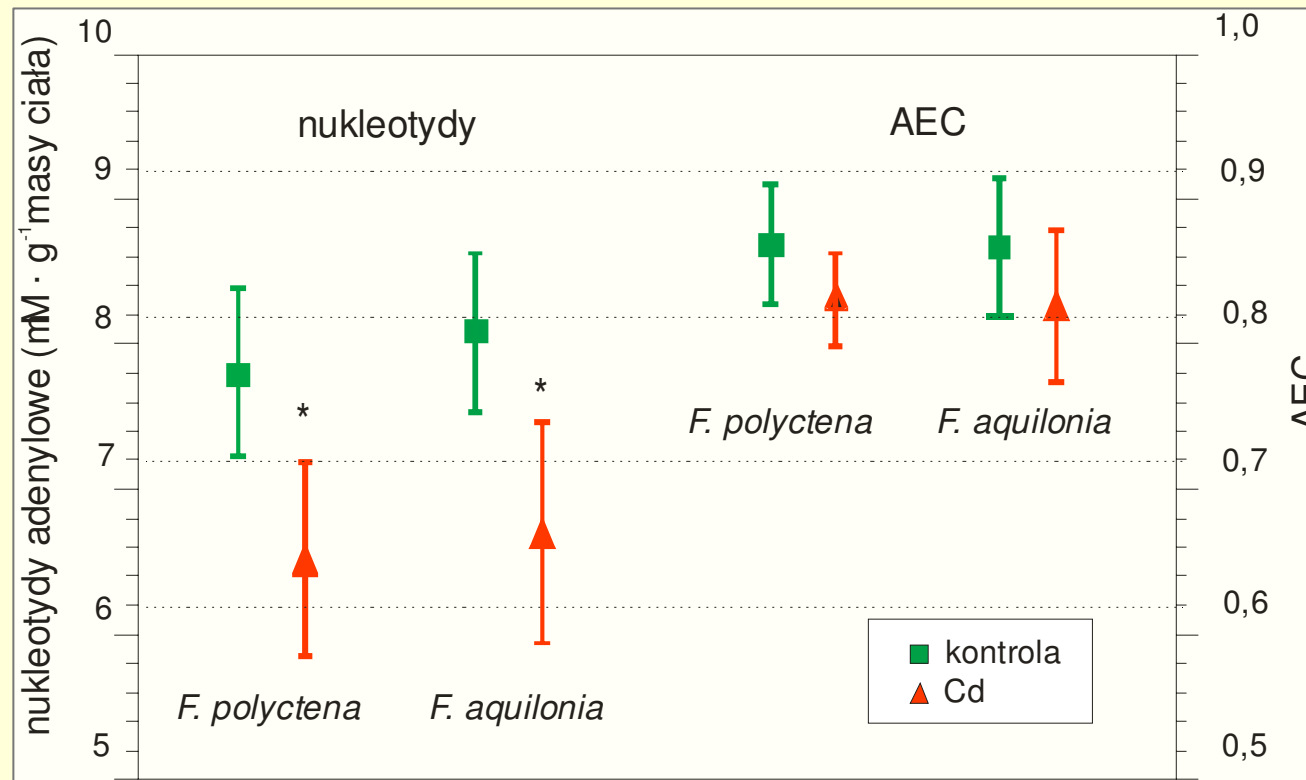
Gdy substancja jest silnie toksyczna koszty detoksykacji mogą być wysokie



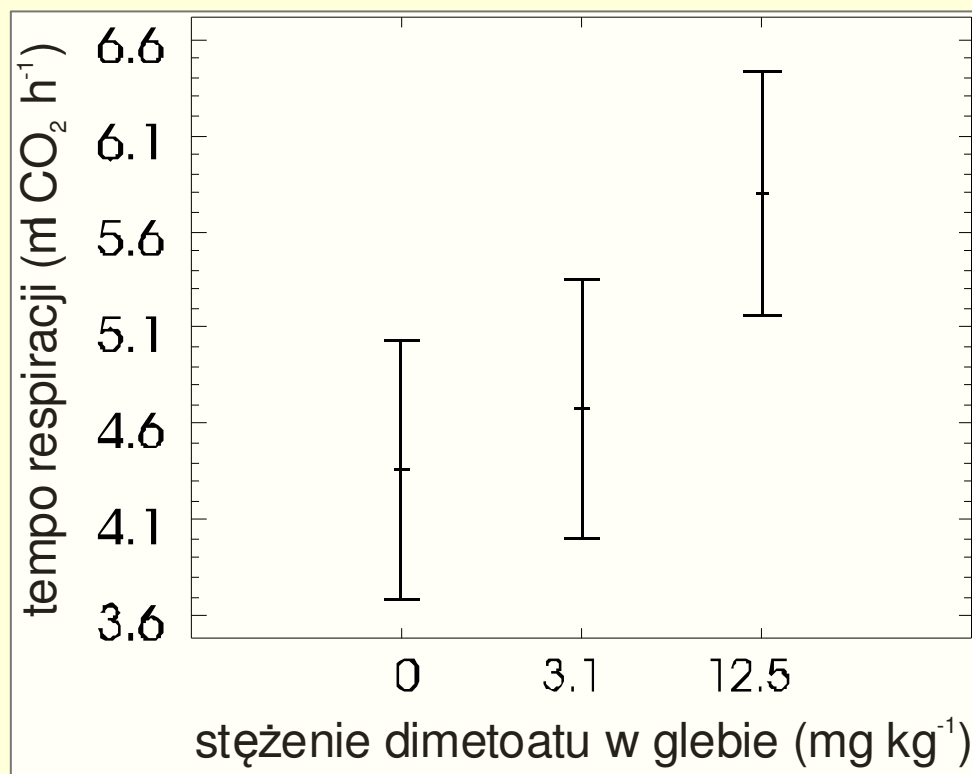
Czy detoksykacja jest faktycznie kosztowna?

Na poziomie subkomórkowym u osobników eksponowanych na substancje toksyczne obserwuje się spadek zawartości nukleotydów adenylowych oraz tzw. ładunku energetycznego nukleotydów (AEC).

$$AEC = \frac{ATP + ADP}{2} / (ATP + ADP + AMP)$$



Czy energetyczne koszty detoksykacji są znaczące dla organizmu?

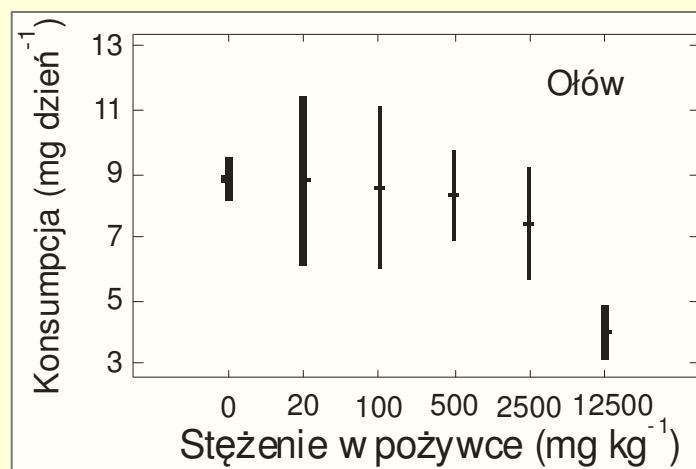
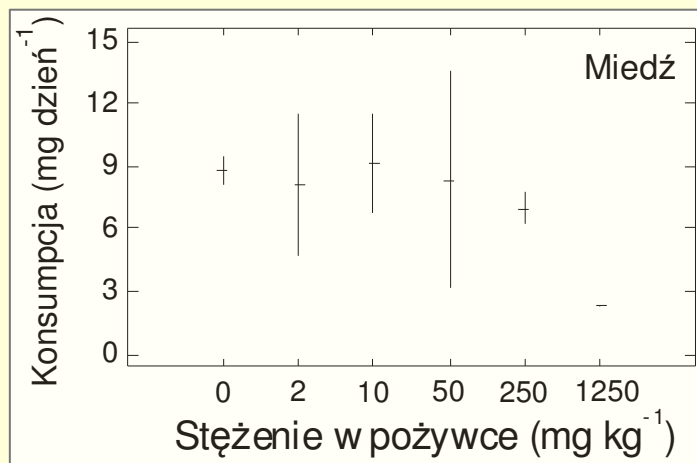
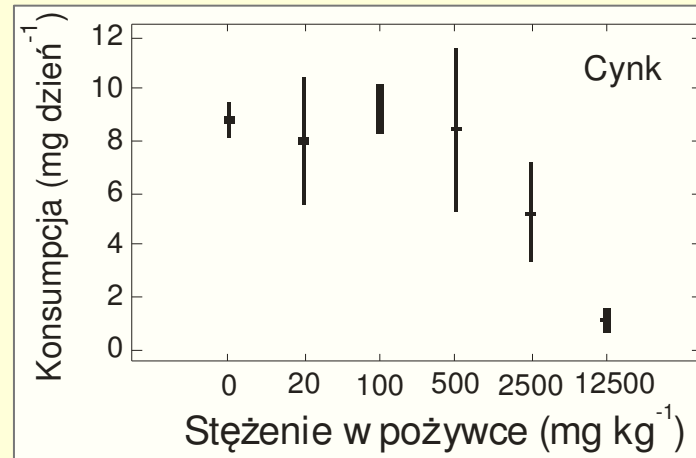


Tempo respiracji u wijów (*Lithobius mutabilis*) poddanych działaniu pestycydu (dimetoat)

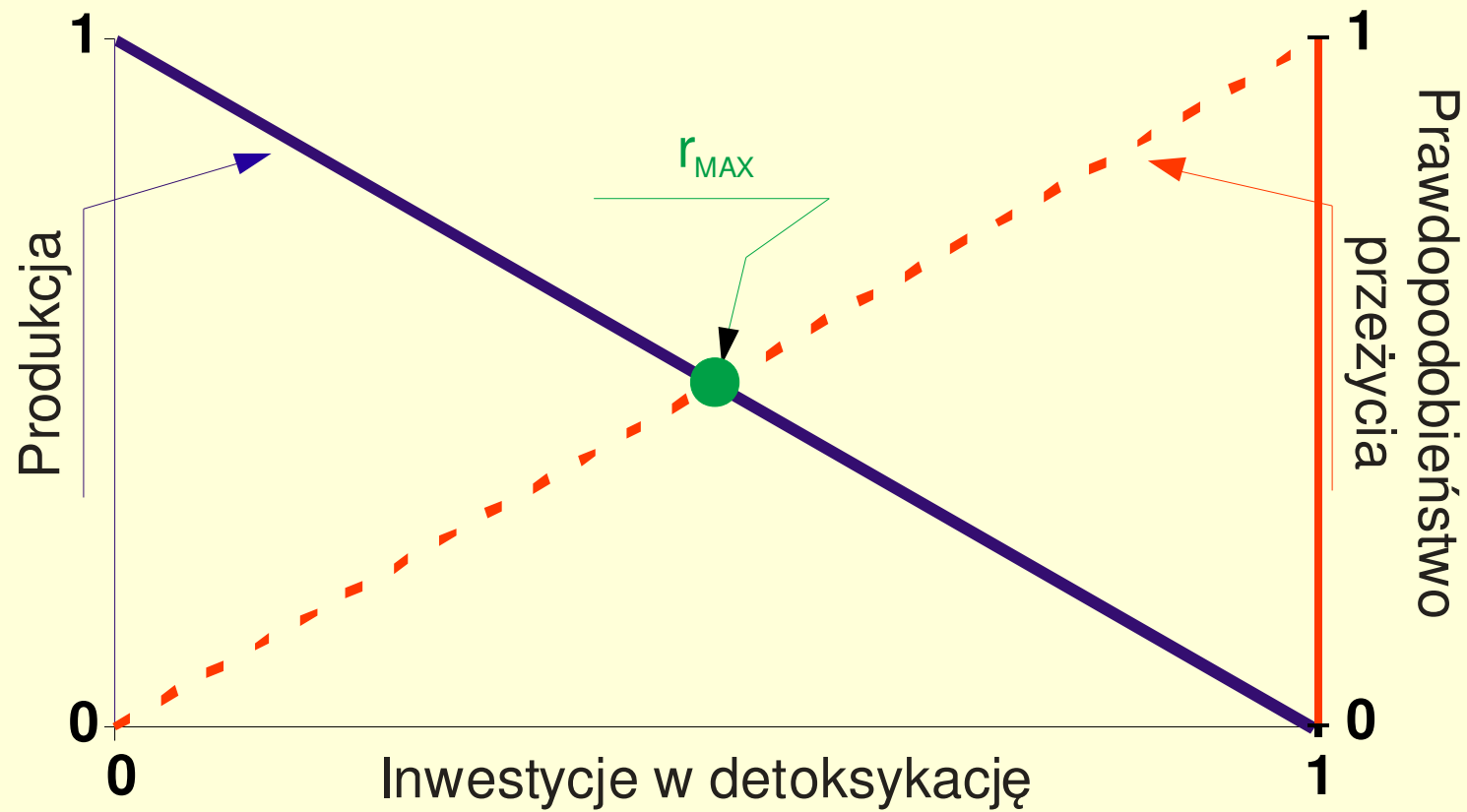
➔ Przesłanki wskazują, że koszty detoksykacji mogą być istotne i mogą decydować o przeżywalności organizmów.

W skażonym środowisku może też być mniej dostępnej energii

Wyniki doświadczenia nad ślimakami *Helix aspersa* karmionymi pożywieniem skażonym metalami ciężkimi



Życie wymaga kompromisów; także przy „decyzji”, jak wiele energii przeznaczyć na detoksykację



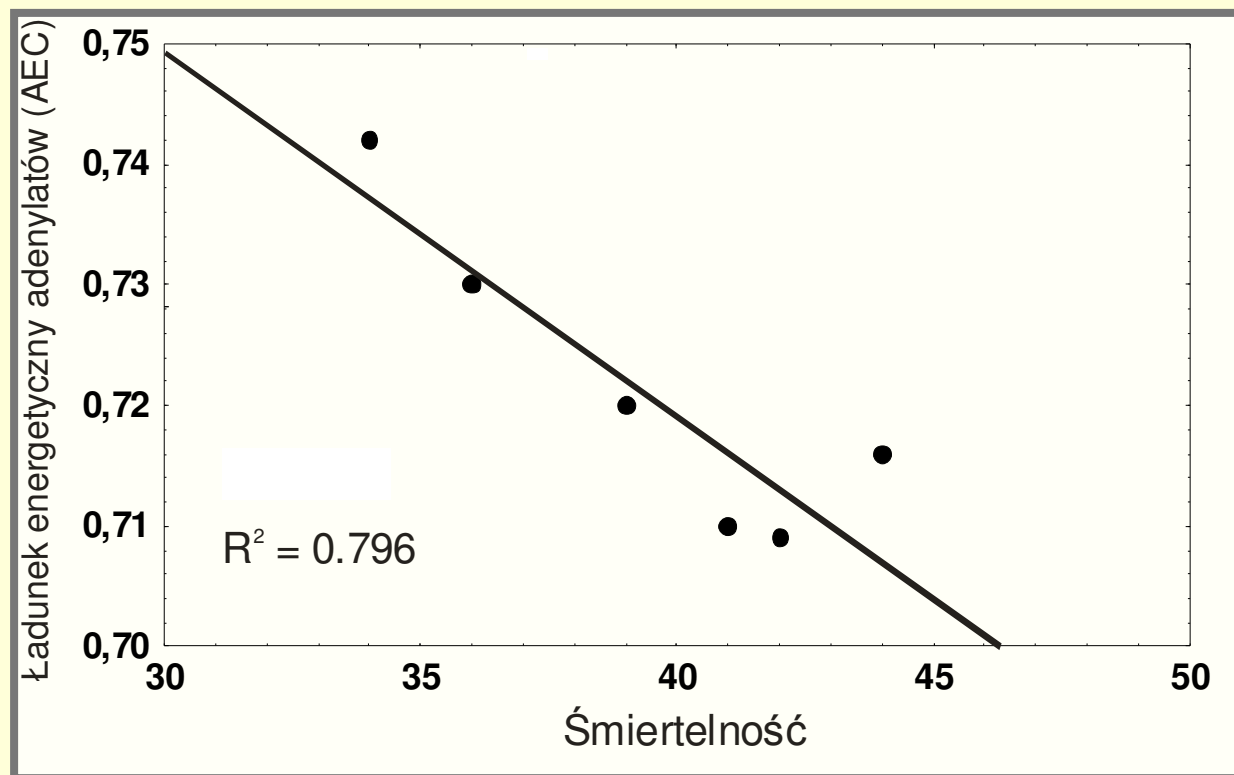
Biomarkery zatrucia organizmu

- Biomarker: „każda odpowiedź biologiczna na obecność substancji toksycznej w środowisku, na poziomie osobnika lub niższym, wykazująca odchylenie od normy”
- Rodzaje biomarkerów:
 - biochemiczne
 - fizjologiczne
 - histologiczne
 - morfologiczne
 - behawioralne

Przykłady biomarkerów

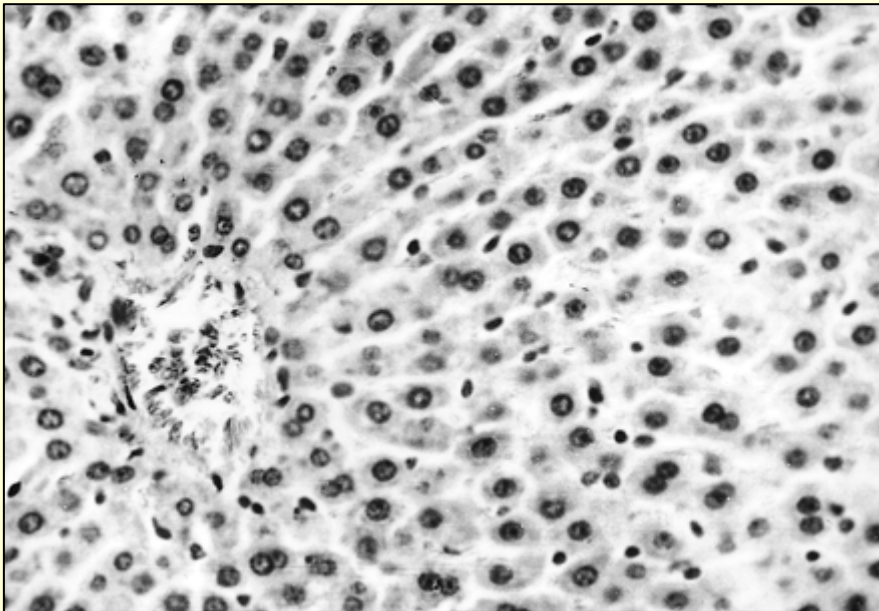
Poziom organizacji	Przykłady biomarkerów
Biochemia	hamowanie AChE; indukcja monooksygenaz; indukcja metalotionein; indukcja hsp; AEC
Fizjologia	zmniejszenie grubości skorupy jaja; maskulinizacja („imposex”); feminizacja embrionów
Tkanki	patologiczne zmiany w tkankach (nerkach, wątrobie i in.)
Osobnik	<u>Morfologia</u> : asymetria fluktuująca; tempo wzrostu <u>Behawior</u> : spadek konsumpcji; utrata orientacji; wzrost lub spadek aktywności lokomotorycznej

Związek biomarkerów z cechami historii życiowej

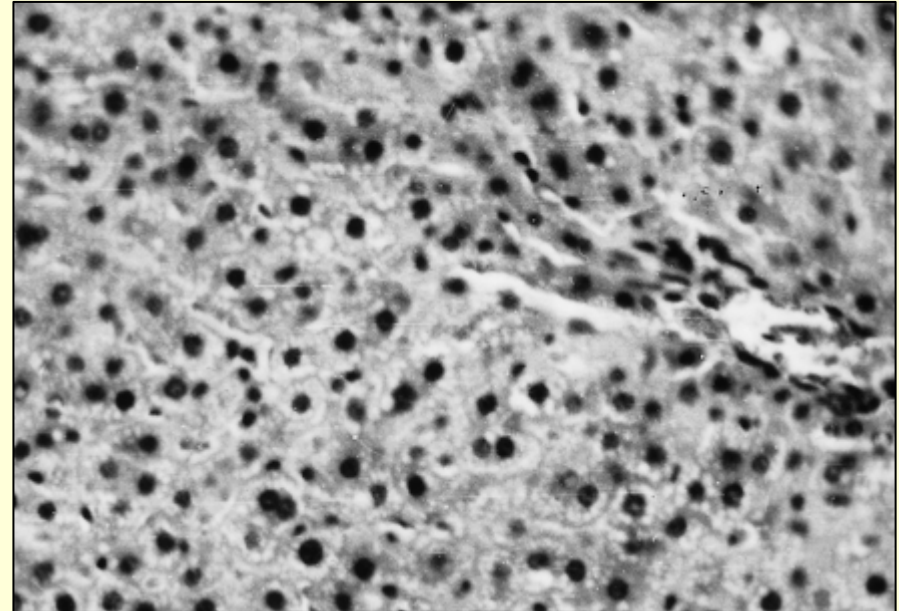


AEC koreluje ujemnie ze śmiertelnością larw much domowej (*Musca domestica*)

Przykład zmian histopatologicznych pod wpływem kadmu: wątroba szczura



Wątroba szczura kontrolnego (x300)



Wątroba szczura eksponowanego na kadm (x300); cytoplazma gąbczasta, wypełniona wakuolami, chromatyna jądrowa bardziej zwarta, nekrozy pojedynczych hepatocytów

Brzóśka i in. 2003. Liver and kidney functions and histology in rats exposed to cadmium and ethanol. *Alcohol and Alcoholism*, 38: 2-10.

Wpływ substancji na jakie cechy powinniśmy zatem mierzyć?

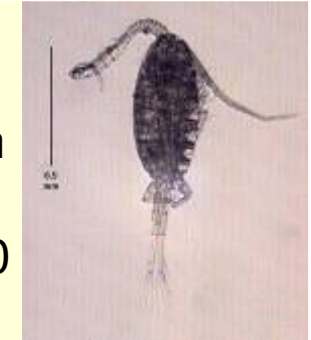
- To zależy od pytania:
 - jeśli zależy nam na wykryciu efektów „za wszelką cenę” → najwrażliwsze cechy historii życiowej lub biomarkery
 - jeśli zależy nam na precyzyjnej ocenie skutków na poziomie populacji → miary dynamiki populacji (r , λ , K)
 - jeśli celem jest ochrona populacji przed wyginięciem → prawdopodobieństwo ekstynkcji i czas do ekstynkcji

Które cechy historii życia lub biomarkery są najwrażliwsze na substancje toksyczne?

Gatunek	LC ₅₀ (14 dni)	EC ₅₀ (prod. kokonów)	EC ₅₀ (NRR)
	mg Zn kg ⁻¹		
<i>Eisenia fetida</i>	3172	1898	>2000
<i>Lumbricus terrestris</i>	2378	1029	542
<i>Lumbricus rubellus</i>	1734	599	168
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	1695	442	252

Spurgeon i in. 2000. Relative sensitivity of life-cycle and biomarker responses in four earthworm species exposed to zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 1800-1808.

Wpływ Keponu na poszczególne cechy historii życiowej *Eurytemora affinis* przy wzrastających stężeniach substancji w wodzie; w wierszach opisano zmiany wartości cech dla kolejnych stężeń w stosunku do ich wartości przy poprzednim stężeniu, np. przy podwyższeniu stężenia z 0 do 5 $\mu\text{g dm}^{-3}$, z 5 do 10 $\mu\text{g dm}^{-3}$ itd. (wg Allana i Danielsa, 1982).



Wartości LC₅₀ na podstawie testu 48 h, parametry populacyjne – 21 dni.

Wzrost stężenia ($\mu\text{g dm}^{-3}$)	% LC ₅₀	Wpływ na <i>r</i>			
		Przeżywalność	Wiek reprodukcyjny	Wielkość miotu	Liczba miotów
0 → 5	12,5	brak	brak	brak	brak
5 → 10	25	brak	niewielkie opóźnienie	znaczna redukcja	brak
10 → 15	37,5	redukcja	opóźnienie	brak	znaczna redukcja
15 → 20	50	niewielka redukcja	opóźnienie	znaczna redukcja	znaczna redukcja
20 → 25	62,5	redukcja	brak	brak	znaczna redukcja

Gdy chcemy dowiedzieć się o wpływie zanieczyszczeń na populację, lepiej stosować miary dynamiki populacji

$$R_0 = \sum_{x=0}^n l_x m_x$$

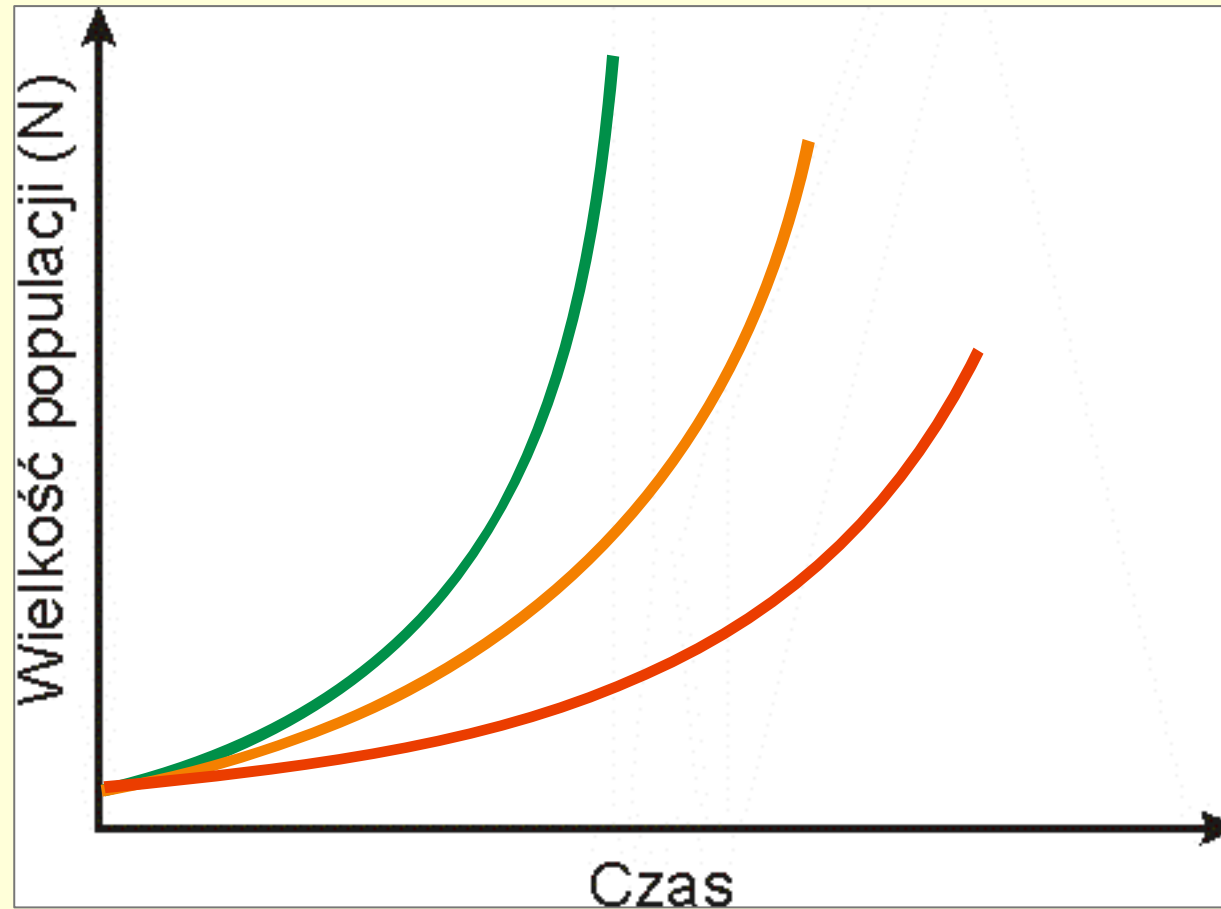
$$1 = \sum e^{-rx} l_x m_x$$

$$r_i = \frac{\ln \frac{N_t}{N_0}}{\Delta t}$$

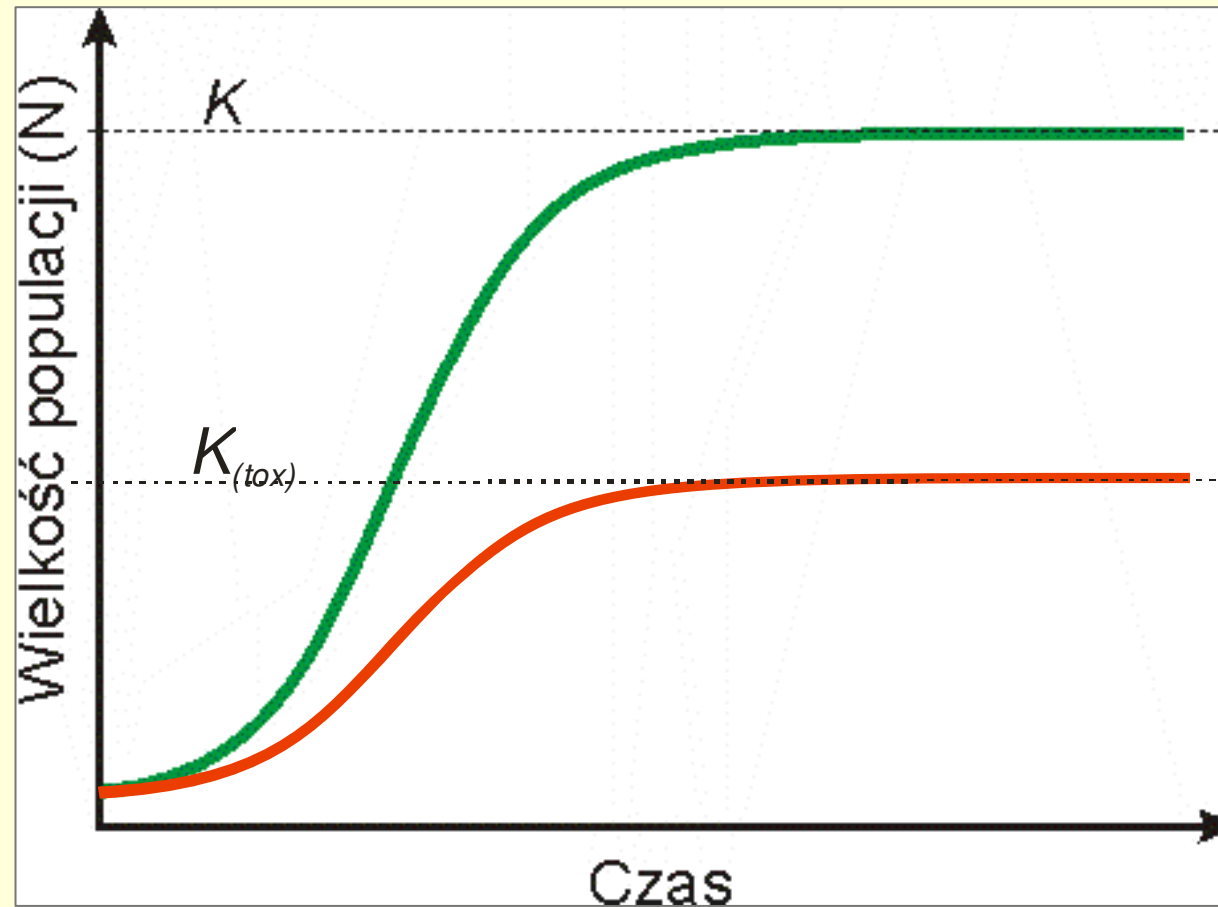
λ - dominująca wartość własna macierzy Lesliego

K – pojemność środowiskowa

Wpływ substancji toksycznych na populacje: wzrost wykładniczy (zmiana r)



Wpływ substancji toksycznych na populacje: wzrost logistyczny (zmiana K)



Opanowane terminy:

- LD_{50} – *Lethal Dose for 50% individuals* = dawka śmiertelna dla 50% osobników;
- LC_{50} – *Lethal Concentration for 50% individuals* = stężenie śmiertelne dla 50% osobników;
- EC_{50} – *50% Effect Concentration* = stężenie powodujące 50% efekt w mierzonej zmiennej (np. spadek płodności lub długości życia o 50% itp.);
- NOEC – *No Observed Effect Concentration* = najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się istotnych efektów działania substancji toksycznej;
- LOEC – *Lowest Observed Effect Concentration* = najniższe stężenie, przy którym pojawia się istotny efekt działania substancji toksycznej.