

# NEPŘÍZNVÝ VLIV XENOBIOTIK NA LIDSKÝ ORGANISMUS A METODY JEHO TESTOVÁNÍ

ZDENĚK KNEJZLÍK a TOMÁŠ RUML

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-  
-technologická, Technická 5, 166 28, Praha 6

Došlo dne 1.IV. 1999

Klíčová slova: text toxicity, karcinogeneze, toxicita, letální dávka

## Obsah

1. Úvod
2. Testy toxicity
  - 2.1. Podmínky a způsob volby testu toxicity
  - 2.2. Rozdělení testů toxicity
  - 2.3. Akutní testy toxicity
  - 2.4. Subchronické a chronické testy toxicity
  - 2.5. Test na teratogenitu látek
  - 2.6. Test na zjištění vlivu látek na reprodukci
  - 2.7. Test na mutagenitu a karcinogenitu látek
    - 2.7.1. Určení mutagenese *in vivo*
  - 2.8. Testy na poškození oka a kůže
  - 2.9. Testy na vyhodnocení odpovědi imunitního systému
  - 2.10. Tkáňové kultury v testech toxicity
  - 2.11. Markery toxicity
  - 2.12. Použití TT pro sestavení hygienických norem
3. Toxický efekt xenobiotik na lidský organismus
  - 3.1. Karcinogenní, mutagenní a teratogenní látky
  - 3.2. Látky poškozující funkci některých vnitřních orgánů

## 1. Úvod

Testování účinku xenobiotik na lidský organismus je vždy založeno na nepřímých metodách. Jedná se buď o experimenty na pokusných zvířatech nebo o *in vitro* testy, využívající tkáňové kultury živočišných a lidských buněk. Význam *in vitro* modelů pro toto testování stále roste s množstvím nových sloučenin a nutností jejich testování. Testy toxicity jsou dnes nedílnou součástí vývoje léků a přípravy hygienických norem v potravinářství a průmyslu.

Výhodou *in vitro* testů je rychlejší získání výsledků, podstatně nižší cena než v případě testování pokusných zvířat a možnost použití lidských buněk. Dalším argumentem pro *in vitro* testy a omezení testů na zvířatech je etické hledisko. Naopak jejich nevýhodou je omezený pohled z hlediska toxicity orgánově specifických sloučenin. Proto je při testování nové sloučeniny nutné vyhodnotit celou řadu cytotoxických parametrů případně správně vytipovat vhodný orgán, jehož buňky mají být použity. V řadě případů lze totiž využít tkáňových

kultur specializovaných buněk jako např. epidermální keratinocyty pro testování kutánní toxicity nebo hepatocyty jako model pro výzkum mechanismu hepatotoxicity.

Toxicitou se míní nepříznivý účinek na testovací systém vyvolaný účinkem dané látky nebo směsi látek. Je ovlivněna řadou faktorů jako např. koncentrací dané sloučeniny, dobou jejího působení<sup>1</sup> a faktory ovlivňujícími fyziologický stav testovaného organismu jako např. přísun živin, teplota, osvětlení aj. Doba vystavení testovaných organismů zkoumané látce se označuje jako expozice. Množství zkoumané látky, které testovací organismus přijme se nazývá dávka. Testem toxicity se potom nazývá soubor experimentů při nichž je testovací organismus exponován známé dávce toxické látky za definovaných podmínek a vyhodnocují se změny vyvolané touto expozicí v porovnání s kontrolními jedinci. Toto sdělení si klade za cíl poukázat na rozmanitost metod pro testování toxicity xenobiotik využívajících tkáňových buněk nebo modelových organismů.

## 2. Testy toxicity

### 2.1. Podmínky a způsob volby testu toxicity

Pro volbu testu jsou velmi důležité fyzikálně-chemické vlastnosti zkoumané látky. Nejsou-li o látce známa žádná toxikologická data, je třeba provést základní testy toxicity<sup>2</sup>. Poté se provádí specializované testy, jejichž volba je podmíněna výskytem a použitím sledované látky. Omezujícím kritériem může být u pevných látek jejich rozpustnost, u kapalných pak mísitelnost s vodou, protože v testech toxicity je testovaný organismus exponován většinou vodnému roztoku testované látky. Látka by neměla reagovat s vodou, ani s ní vytvářet pěny, gely a emulze. Nesplňuje-li tuto podmínku, je nutno použít rozpouštědlo v koncentraci tolerované testovacím systémem. Při testech na zvířatech lze látku podávat přímo např. přimícháním do potravy.

### 2.2. Rozdělení testů toxicity

Rozdělení testů toxicity (TT) lze provést podle různých kritérií např. podle druhu testovacího organismu, doby expozice a koncentrace toxické látky. Vzhledem ke komplexnímu charakteru živých systémů není snadné vymezit hranice mezi skupinami TT. Podle doby expozice se TT rozdělují na akutní, kde se doba expozice pohybuje v rozmezí 4-24 hodin, subchronické TT trvající několik týdnů až čtyři měsíce a chronické, u kterých je doba expozice testovacího organismu od půl roku po několik let. Subchronické a chronické TT se z hlediska doby expozice prolínají a jejich rozdíl spočívá hlavně ve volbě dávky toxické látky. V tabulce I jsou uvedeny nejčastěji používané testovací organismy.

Při vyhodnocování výsledků v testech je třeba brát ohled na specifika testovacího organismu. Proto se v jednotlivých TT obvykle volí více druhů testovacích organismů s ohledem na konečné tvrzení, které je závislé na formě a místě výskytu látky.

Tabulka I  
Testovací organismy v testech toxicity

Prokaryota		<i>Pseudomonasp.</i> , <i>Phosphobacter phosphoreus</i> <sup>3</sup> , <i>E. coli</i> <sup>4</sup> , <i>Enterobacter cloacae</i> <sup>4</sup> , <i>Alcaligenes sp.</i> <sup>5</sup>
Eukaryota	jednobuněčná	kvasinky <sup>6</sup> , prvoci, sinice
	vícebuněčná	bezobratlí - červi (žížaly) <sup>7</sup> rostliny <sup>8</sup> obratlovci - králíci <sup>9</sup> , myši <sup>10</sup> , krysy <sup>11</sup> , opice, ryby <sup>12</sup> , ptáci

Pro toxikologické veličiny jiné než mortalita se používají speciální testy, které se orientují na jednotlivé charakteristické změny a reakce testovacích systémů a organismů: neurotoxický test, reprodukční test, test na teratogenitu, na mutagenitu<sup>13</sup>, karcinogenitu<sup>14</sup>, test vlivu látek na imunitní systém, kůži, oči, test chování organismu, a ostatní testy. Podle způsobu podávání látky rozlišujeme tři hlavní skupiny TT: orální, inhalační, **přímá** distribuce do krve. V prvním případě se látka podává spolu s potravou a tekutinami, při inhalačních TT se studovaná látka dostává do organismu respiračním systémem.

### 2.3. Akutní testy toxicity

Tyto testy jsou velmi často používány<sup>15,16</sup> a provádí se jako první. Nejčastější testovací organismy jsou myši a krysy<sup>14</sup>, vzhledem k jejich relativně nízké ceně a krátké generační době. Proto je většina toxikologických dat vztažena k těmto testovacím organismům. Testovací zvířata musí být v dobrém zdravotním stavu a jejich selekce od ostatních jedinců se provádí jeden týden po narození<sup>17</sup>. Podmínkou je kontrolní skupina stejného počtu jedinců téhož druhu. Často se používá i druhá kontrolní skupina chovaná mimo laboratoř. Zdravotní stav jedinců obou kontrolních skupin se porovnává, a tak je možné vyloučit těžko postižitelné vlivy jako např. infekce, které by mohly zkreslit výsledek. **Není-li** znám koncentrační rozsah ve kterém by se vliv toxické látky měl testovat, jsou aplikovány rozdílné dávky více testovacím skupinám. Aby byly výsledky **reprodukovatelné** je třeba zachovat stejné podmínky (výživa, teplota, osvětlení, ...) ve všech skupinách. Po provedení akutního TT (obvykle 24 h) jsou data, tj. patologické změny jedinců, vztažena ke kontrolní skupině a vyhodnotí se LD<sub>50</sub> (lethal-dose), většinou za 24 hodin. Další veličina je LCT<sub>50</sub> (lethal concentration time), při níž jsou zvířata exponována 4 h různým dávkám toxické látky. LCT<sub>50</sub> udává koncentraci látky způsobující úhyn 50 % jedinců během dvou dnů po expozici. **Nezpůsobí-li** 24 hodinový akutní TT pozorovatelné změny, odstaví se testovaná zvířata a pozoruje se jejich fyziologický stav. Mezi hlavní znaky které se sledují patří: lokomoce, zvláštní reakce, hlasové reakce, citlivost k bolesti, zvuku a doteku, sociální vztahy mezi jedinci, agresivní chování, tonus svalstva, paralýza, křeče, posturální reflexy, poškození oka, reflex rohovky, chvění a fotofobie. Často se pro srovnání používají ještě další testovací organismy (psi, kočky, králíci).

Velmi populární organismy pro testy akutní toxicity jsou nitěnky *Tubifex tubifex*. Slouží hlavně jako indikátor čistoty vod. Jejich snadný chov, velmi nízká cena a vysoká citlivost je předurčuje právě pro tyto testy<sup>16</sup>.

### 2.4. Subchronické a chronické testy toxicity

Při subchronickém testu toxicity<sup>18</sup> je podávána zkoumaná látka po dobu tří až pěti měsíců. Tento test vždy předchází testům **chronickým**<sup>19</sup>, které nejsou kratší než jeden rok. Jedná se o látku, kterým je člověk dlouhodobě vystaven jako například potravinová aditiva<sup>20</sup>, složky kosmetických přípravků, polutanty ovzduší a léky. Látka se podává orálně s potravou nebo tekutinami. **Dochází-li** k interakci mezi složkami potravy a testovanou látkou, látka se enkapsuluje, nebo se vpravuje přímo do žaludku pokusného zvířete, aby se zabránilo její ztrátě. Při aplikaci v potravě je konzumované množství evidováno. Méně časté je intravenosní podávání látky. Experimentu předchází **předběžné** testy rozsahu jednoho až třech týdnů, k nimž je použito více skupin, kterým je podávána rozdílná dávka testované látky. Poté jsou zvířata usmrcena a histologicky analyzována, což umožní zjistit nejpravděpodobnější poškození orgánů. Při vlastním subchronickém TT lze pak cíleně volit sledované znaky a test má vyšší reprodukční a výsledkovou hodnotu. Při tomto druhu TT se chovají tři skupiny testovacích zvířat a jedna skupina kontrolní. Každá skupina čítá 10 až 20 samců u krys nebo 3 až 5 u psů a stejný počet samic. Každá skupina je exponována odlišné koncentraci látky. Zvířata jsou krmena v periodě 6 až 12 hodin a každý den pozorována a vážena. U každé skupiny se v jistých periodách (dle druhu testovacího organismu) odebírá krev a moč pro analýzu (tab. II). Zvířata uhynulá během testu

Tabulka II  
Vyhodnocované znaky při subchronických a chronických TT<sup>2</sup>

Druh vyšetření	Sledované znaky
Hematologické vyšetření	počet leukocytů, erythrocytů, hematokrit, hemoglobin
Chemické složení krve	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , Ca <sup>2+</sup> , CO <sub>2</sub> , celkový protein, alk. fosfatasa, bilirubin, močovina, glukosa, elektroforéza sérových proteinů
Analýza moči	pH, celk. protein, glukosa, ketonové látky, sediment, bilirubin
Hmotnost	tělesná, srdce, játra, ledviny, štítná žláza, slezina
Histologické vyšetření	srdce, játra, ledviny, štítná žláza, slezina, vaječníky, plíce, slinivka

se zvaží a je provedeno histologické vyšetření poškozených orgánů.

Chronické TT jsou kombinovány s testy speciálními<sup>21</sup>, neboť k prokázání specifických účinků látek je často třeba dostatečně dlouhá doba (teratogenita, karcinogenita). Pro zvolení postupu při chronických TT jsou důležité výsledky subchronických TT. Po vyhodnocení prvního subchronického nebo chronického TT lze použít k opakovaným testům jiné biologické druhy, jako třeba kozy, opice, a kočky<sup>22</sup>.

## 2.5. Test na teratogenitu látek

Mnoho látek způsobuje špatný vývoj a následné poškození plodu<sup>23,24</sup>. Vývoj orgánů a tkání má specifické fáze: vznik (diferenciace v embryonální fázi) a růst (fáze zárodku). Vývojové fáze plodu určuje jeho vnímavost k negativním účinkům látek. Je-li toxická látka podávána březí samici v době, kdy u plodu dochází k diferenciaci orgánů, může dojít k jeho poškození. Je-li látka podávána ve fázi zárodka, lze v některých případech pozorovat růstovou retardaci. V těchto testech jsou často používány králíci, krysy a myši, pro jejich snadné oplodnění. V případě krys, je ve skupině okolo 10 samic a počet mláďat v jednom vrhu se pohybuje okolo deseti. Test má tři části<sup>25</sup>: 1) oplodnění samice speciální inseminační technikou, 2) ověření oplodnění a expozice toxické látky, 3) zjištění defektů plodu. Doba březosti je u myši 21, krys 22 a králíků pak 30–35 dní. Všechny testy na teratogenitu zahrnují dva druhy organismů a v každém testu je přítomna pozitivní kontrolní skupina, které se podává trypanová modř nebo vysoké dávky vitamínu A, který způsobuje silné poškození plodu a má velmi podobné účinky u většiny druhů; proto se mu v dnešní době dává přednost. Jeho teratogenní účinky u člověka se nepodařilo prokázat. Všechny testované látky jsou podávány v 7–15 dnu březosti a testovací zvířata jsou denně vážena a pozorována. Den před vrhem je plod odebrán a histologicky vyšetřen. Nejčastější maltransformací je rozsednutí ústní štěrbiny, poškození kloubů a renální ageneze. Často se též usmrcují samice po odebrání plodu a podrobují se identickým vyšetřením. Pokud došlo k potratu, je pokus opakován s menší dávkou toxické sloučeniny. Jako model lze použít embryonální buňky *in vitro*<sup>26</sup>, které jsou velmi citlivé k vlivům toxických látek.

Jsou prováděny i testy na neplacentárních živočiších. Nejčastější je použití kuřecího embrya<sup>27</sup>. Tento test je však kritizován pro vysoké množství falešných pozitivních kontrol ve srovnání s testy se savci v důsledku vlivů působících při vývoji jedince (pH, infekce, ...). Proto se kuřecí embrya používají spíše pro testy celkové toxicity. 20 oplodněných vajec se exponuje různým dávkám, 0,1 ml roztoku studované sloučeniny se sterilně injikuje do vajíčka, které se uchovává 17 dnů při 38 °C a potom při 37 °C. Vylíhnutá kuřata jsou podrobena studiím na změnu růstu.

## 2.6. Test na zjištění vlivu látek na reprodukci

U těchto testů se sledují tři hlavní znaky<sup>28</sup>: 1) vliv látek na plodnost u samic, 2) vývoj plodu zahrnující teratogenní a mutagenní účinky, 3) způsob přijetí mláďete samicí a její schopnost laktace, vývoj mláďete a jeho sexuální zrání. Tyto testy jsou často multigenerační, tj. sleduje se účinek toxické látky ve více generacích.

Každou skupinu tvoří deset samců a dvacet samic. Během dvoutýdenního estrogenního cyklu je kontrolován sexuální vývoj a fyziologický stav samic. Po pěti týdnech se samice připustí a chovají se odděleně. Třináctý den po pöpuštění je polovina samic z kontrolní a testovací skupiny usmrcena a i s embryem histologicky a biochemicky vyšetřena. U mláďat z  $F_{1a}$  generace jsou zjišťovány jejich abnormality a u matek z  $F_0$  generace je sledována jejich schopnost laktace. Po týdenním odpočinku lze matky z  $F_0$  generace znovu oplodnit a dát tak vznik  $F_{1b}$ , u které se sledují stejné znaky jako v  $F_{1a}$  generaci.  $F_{1a}$  generace je dále exponována studovaným látkám a po pěti týdnech může dojít k oplodnění samic z tohoto vrhu a vznikne tak  $F_{2a}$  generace. Nejčastěji se provádí třígenerační test, umožňující zjistit kumulaci defektů v po sobě jdoucích generacích.

## 2.7. Test na mutagenitu a karcinogenitu látek

Těmito testy se zjišťuje možnost poškození genetické informace chemickými látkami. K tomu dochází zpravidla následujícími způsoby: 1) bodovou mutací, 2) delecí určité části DNA, 3) translokací, duplikací nebo inverzí jejich úseků 4) chromosomovými zlomy. Některé z těchto poškození DNA mohou vést ke vzniku nádorů. Jedním z nejčastějších testů mutagenity je zjištění dominantní letální mutace (DLM) (dominant lethal assay)<sup>29</sup> za níž se považuje poškození DNA vedoucí ke smrti heterozygotního jedince. Jedná se většinou o chromosomální aberace. Myším samcům se podává subchronická dávka ( $1/5 LD_{50}$ ) testované látky. Následně jsou připuštěni k samicím, které nebyly dané látce exponovány. U samců se studuje stav zárodečných buněk v různých stadiích spermatogeneze. Po čtrnácti dnech jsou samice usmrceny a je zjištěn počet žlutých tělísek, která plní vyživovací úlohu zárodka. Po určení počtu ranně usmrcených zárodků lze spočítat mutační index:

$$MI = \frac{\text{počet ranně uhynulých zárodků}}{\text{celkový počet zárodků} \times 100}$$

Tento test však nepostihuje bodové mutace, jež však lze stanovovat na rostlinách<sup>30</sup> a bakteriích.

Některé látky se mohou přeměnit na mutagenní v organismu, vlivem detoxikačních mechanismů. Účinky těchto metabolitů lze zjistit na hostitelských mikroorganismech v těle testovacího zvířete (host mediated assay)<sup>31</sup>. Jako modelové mikroorganismy se používají *Salmonella* a *Neurospora*. *Zvířatům* se po expozici toxické látky injikují bakterie do pobřišnice. Zjištěná frekvence mutací v odebraných bakteriích se porovnává s výsledky získanými *in vitro*.

Testy na karcinogenitu<sup>32</sup> porovnávají frekvenci vzniku nádorů u zvířat vystavených karcinogenní látce vzhledem ke kontrolní skupině. Tato kontrolní skupina je velice důležitá, protože vznik nádorů mohou způsobovat chemické látky přítomné v prostředí a virové infekce. Nejčastěji používaná zvířata v těchto testech jsou myši, krysy a psi. U myši a krys je nevýhodou jejich vysoká citlivost k infekcím. Nyní jsou preferovány dlouhotrvající testy, odpovídající současnému stavu životního prostředí. Jejich délka je závislá na druhu testovacího zvířete: dva až tři roky u krys, u psů asi sedm let. V potravě se zjišťuje obsah pesticidů a jiných látek, které by mohly při testech interferovat. Většinou se používá syntetická dieta,

prostá všech potenciálně škodlivých látek. V experimentu jsou přítomny tři testovací skupiny. Jedné je podávána maximální dávka a jedincům zbylých skupin 1/3 a 1/9 maximální dávky. Minimální délka testu je 90 dnů. Zvířata jsou denně vážena a kontroluje se jejich fyzická kondice. Veškerá zvířata jsou po ukončení testů usmrčena a je u nich zjišťován počet nádorů a patologické změny na orgánech.

Testy *in vivo* jsou velmi zdoluhavé proto se v některých případech dává přednost testům *in vitro*. Jedním z nejznámějších je Amesův test<sup>33</sup>. Na ztužené živné půdě obsahující testovanou látku se kultivuje auxotrofní kmen *Salmonella typhimurium* vyžadující pro svůj růst histidin. V jednotlivých koloniích se následně zjišťují reverzní mutace, kultivační na půdě bez histidinu. U látek u nichž je podezření že se transformují na aktivní karcinogeny v organismu se používá Amesův test s homogenátem zjater a ledvín. Byly vyvinuty kmeny *Salmonella typhimurium* i pro detekci jiných mutací než bodových. Na podobném principu fungují testy s použitím mutantů kvasinek (DEL assay)<sup>34</sup>. Některými technikami lze určit vliv látek na vznik chromosomových zlomů. Často se též používá technika určování mutací mitochondriální DNA kvasinek<sup>34</sup>. Další metody *in vitro* jsou založeny na použití tkáňových kultur, kde jsou buňky po expozici škodlivé látky mikroskopicky pozorovány a biochemicky analyzovány.

### 2.7.1. Určení mutagenezí *in vivo*

Elegantním systémem stanovení mutací jsou transgenní myši<sup>35</sup>, v jejichž genomu je inkorporován bakteriofág lambda, nesoucí *lacI* gen. Tento gen je tedy přítomen ve všech tělních buňkách. Po určité době je bakteriofág uměle aktivován a každá nově vzniklá fágová částice pak nese jeden *lacI* gen. Mutace *lacI* jsou zjišťovány po vnesení fága do *Escherichia coli*, pro něž je infekční a dochází k lyzí a vzniku plaků. Principem detekce mutací je sledování aktivity produktu *LacI* jakožto represoru *beta*-galaktosidasy. Tento enzym je schopen štěpit chromogenní analog laktosy tj. X-gal za vzniku modrého zbarvení. Mutace *lad* tedy rezultuje v konstitutivní syntézu *beta*-galaktosidasy a vznikají modré plaky na rozdíl od plaků bezbarvých, v nichž je *beta*-galaktosidasa reprimována.

Pro spolehlivost výsledků bylo určeno množství spontánních mutací v jednotlivých orgánech. Četnost těchto mutací se na základě analýzy  $3 \cdot 10^5$  plaků<sup>36</sup> pohybovala v rozmezí  $14 \cdot 10^{-6}$  (v kostní dřeni) až  $33 \cdot 10^{-6}$  (v játrech). Frekvence mutací v srdci, ledvinách a žaludku se pohybuje v tomto rozmezí.

### 2.8. Testy na poškození oka a kůže

Pokožka vytváří přirozenou bariéru v organismu. Některé chemické látky mohou způsobovat lokální poškození očí a kůže. Předmětem zájmu jsou interakce složek kosmetických, mycích prostředků a detergentů s těmito orgány. Chemické sloučeniny mohou způsobovat podráždění, poleptání, fotoalergii očí a kůže, z nichž některá jsou nevratná. Druh a intenzita poškození závisí na genetických dispozicích jedince, koncentraci a vlastnosti chemické látky.

V testu na primární poškození kůže<sup>37</sup> se jako modelové organismy používají králci (albíni) a bílé myši, kterým se dermálně podává testovaná látka. Testovací doba se pohybuje od 3 dnů do 2 let. Na povrch těla se po odstranění chlupů upevní gáza s testovanou látkou. Způsob expozice zvířat toxic-

ké látky závisí na době testu a liší se velikostí testovacího povrchu pokožky, periodou výměny látky a počtem zvířat ve skupinách. Dělí se podle času na akutní (1-10 dní), středně trvající (1-5 měsíců) a chronické (1-3 roky). Vyhodnocuje se rozsah a druh poškození pokožky. Mezi hlavní znaky patří stupeň erythemie a edému. Při dlouhodobém podávání látky může docházet k poškození vnitřních orgánů. Proto se v průběhu dlouhodobého testu zjišťuje stav krve a orgánů zvířete. Pozornost je věnována karcinogenním účinkům, protože většina látek způsobujících nádory se snadno vstřebává kůží. Z tohoto důvodu patří k doplňkovým vyšetřením sledování indukce tumorů.

Pro zjištění vlivu látek na kožní citlivost se dnes používá metoda podle Landsteinaera<sup>38</sup>. Testovacímu zvířeti, nejčastěji praseti, je intradermálně injikována zkoumaná látka. Tento test je velmi rychlý, ale nepostihuje některé reakce typické pro člověka. Proto je v současnosti tato procedura doplněna metodou podle Roudabushe<sup>39</sup>. Na povrch prasečí kůže nebo do uměle vytvořených poranění se aplikuje látka rozpuštěná ve směsi prasečího tuku, dioxanu a acetonu v poměru 1:2:7. Po 2 dnech je na stejné místo aplikována vyšší dávka. Sledovány jsou reakce pokožky na fyzikální a chemické vlivy a údaje vyhodnocované v testech na primární poškození kůže.

V testech sledujících druh a míru poškození oka se používá metodika podle Draize<sup>40</sup>. Oko králíka se po přímém podání látky nevyplachuje a vyhodnocuje se jeho stav 1., 2. a 3. den po expozici. Poté oko vypláchnuto fyziologickým roztokem a je sledováno případné hojení. Exaktnější výsledky poskytuje zjištění obsahu vody v rohovce a spojivce, tloušťky rohovky, a permeability krevních kapilár v oku. Často se výsledky těchto testů porovnávají s výsledky *in vitro*<sup>41</sup>. Výsledky jsou druhově specifické a špatně se generalizují, přesto je tento test jednou z podmínek pro schválení nezávadnosti látky.

### 2.9. Testy na vyhodnocení odpovědi imunitního systému

Jak hypersenzitivita, tak hyposenzitivita imunitního systému vyvolaná hapteny, může být v některých případech letální. U testovacích zvířat, kterým se podává zkoumaná látka, se zjišťuje stav imunitního systému tj. lymfatického systému, thymu, sleziny, mandlí a periferně spojených orgánů. Tyto testy, kde se nejčastěji používají myši a krysy, se většinou provádí jako doplňkové při chronických testech.

Směšená odpověď lymfocytů (Mixed Lymphocyte Response Assay)<sup>42</sup> po podání látky se využívá jako citlivý indikátor pro chemicky indukovanou imunosupresi. Ze sleziny se izolují T-lymfocyty a zjišťuje se jejich proliferativita v systému tkáňových kultur. K tomuto testu se zjišťuje aktivita přirozených zabijeků (Natural Killer), která se provádí stanovením jejich lytické schopnosti v tkáňových kulturách. Toto stanovení je významné, protože právě poškození těchto buněk, které mají za úkol odstraňovat poškozené somatické buňky, může vést k tvorbě nádorů nebo k těžkým komplikacím při skrytých infekcích.

### 2.10. Tkáňové kultury v testech toxicity

V současné době jsou v testech toxicity stále používanější tkáňové kultury<sup>43</sup>. Důvodem pro jejich popularitu je jednodušší reprodukovatelnost získaných výsledků, protože systémy používané *in vivo* jsou značně heterogenní. Prvním krokem je

izolace tkáňové kultury z příslušného orgánu<sup>44</sup> a její charakterizace. V některých případech může dojít k transformaci chemickými látkami, kdy se buňka nekontrolovaně dělí. Morfologické změny se zjišťují mikroskopicky.

Pro objasnění principu karcinogeneze, buněčné diferenciaci, apoptózy a regulace buněčného cyklu se používají kultury epidermálních keratinocytů<sup>45</sup>. Pro zajištění reprodukovatelnosti výsledků se používají jak transformované tak i netransformované linie buněk<sup>46</sup>. Tyto linie lze použít jako alternativu k Draizovu testu<sup>47</sup>, proti kterému jsou výhrady ze strany ochránců přírody.

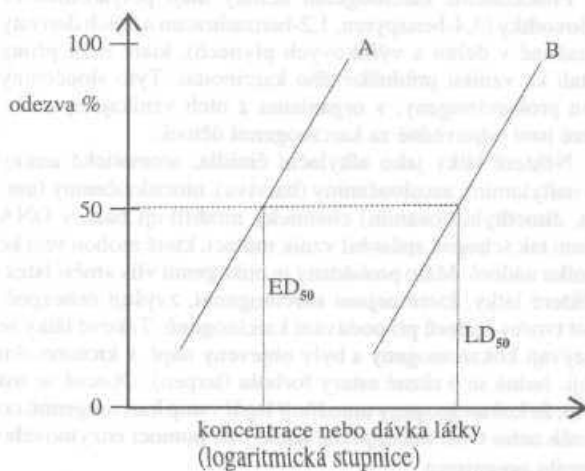
Pro cytotoxické studie se často používají tkáňové kultury hepatocytů<sup>48</sup>. A to zejména pro studie nových markerů cytotoxicity, jako je cytochrom P-450 a při studiu biotransformace léčiv<sup>48</sup>.

### 2.11. Markery toxicity

Biomarkery umožňují detekci stresové odezvy na polutanty životního prostředí, teplotní fluktuace a ostatní změny prostředí<sup>49</sup>. Mohou sloužit jako prvotní příznak znečištění a lze je dělit na biochemické a buněčné. Příznaky se projevují změnami distribuce molekul na povrchu buňky, množství intracelulárních enzymů, tvaru, velikosti a množství organel, velikosti buňky a její morfologie.

Změny v syntéze enzymů a jiných proteinů se zjišťují metabolickým značením, imunochemicky nebo cDNA sondou<sup>50</sup>, kdy se zjišťuje množství příslušné mRNA. Pro detekci enzymové aktivity se používá velká škála chromogenních substrátů. Nejsledovanější skupinou enzymů je cytochrom P-450, který se podílí na detoxikaci škodlivých látek. Typ indukovaného cytochromu P-450 vypovídá o potenciačním nebezpečí látky.

Stresové proteiny jsou skupinou látek, jejichž indukce v buňce je způsobena těžkými kovy, xenobiotiky, oxidativním stresem, anoxií, zvýšenou koncentrací solí, teratogeny a hepatokarcinogeny. Tyto látky regulují přepis genetické informace na úrovni transkripce a translace a mají zásadní úlohu v ochraně buňky. Příkladem je protein p53 (cit.<sup>51</sup>), přítomný v buňce i za fyziologických podmínek, který se při stresu syntetizuje ve zvýšené míře, a pravděpodobně se účastní opravy DNA. Stresové proteiny vykazují vysokou homologii u velmi rozdílných organismů, což poukazuje na jejich důležitou úlohu. Sta-



Obr. 1. Vztah mezi  $LD_{50}$  a  $ED_{50}$  (vysvětleno v textu)

novují se imunochemicky a pomocí cDNA značených sond. Dalšími stresovými proteiny je skupina tzv. heat shock proteinů (Hsp) (cit.<sup>52</sup>). Dnes je známo pět typů: Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp20-30 a ubiquitin. Avšak pouze<sup>51</sup> Hsp70, Hsp60 a ubiquitin se používají pro tento účel. Hsp70 stabilizuje cílové proteiny pomáhá transportu nově vzniklých proteinů. Hsp60 usnadňuje translokaci a skládání oligomerních proteinů v mitochondriích. Nejlepším indikátorem buněčného poškození z této skupiny proteinů je ubiquitin, protože urychluje degradaci poškozených proteinů v buňce.

Těžkými kovy jsou indukovány metallothionein<sup>53</sup> a hemoxigenasa<sup>54</sup>, která katalyzuje přeměnu herynu na biliverdin, který je následně transformován na bilirubin. Ten hraje významnou ochrannou roli při oxidativním poškození a zvýšené tvorbě radikálů v buňce. Metallothionein vyvazuje těžké kovy, a tím snižuje jejich volnou koncentraci v krvi. Oxyradikály je indukována tvorba některých antioxidačních enzymů, jako například superoxid dismutasy, katalasy, peroxidasy a glutathion reduktasy.

Velmi zajímavým se jeví zjišťování obsahu polyaminů v živočišných buňkách, které mohou do budoucna sloužit jako marker karcinogeneze<sup>55</sup>.

### 2.12. Použití výsledků TT pro sestavení hygienických norem

Toxikologické údaje zahrnují uvedení druhu testovacího organismu, doby expozice, způsobu podání látky a její dávku (ve formě:  $x$  čas / kg živé hmotnosti s přiřazením druhu zjištěného efektu např. úmrtí, poškození orgánů...). Výsledky z akutních a subchronických testů o procentuálním množství uhynulých zvířat (dolní index u LD) -  $LD_{50}$ ,  $LD_{5}$ ,  $LD_{99}$  umožňují stanovit toxikologické údaje uvedené v tabulce III.

Z údajů které jsou uvedeny v tabulce III je možné sestavit orientační hygienická kritéria pro expozici člověka škodlivým látkám uvedená v tabulce IV.

Tabulka III  
Rozdělení dávek vzhledem k mortalitě testovacích zvířat

Toxikologický údaj	Efekt na testovacích zvířatech
Absolutní smrtelná dávka	zahynou všechna zvířata ve skupině
Minimální smrtelná dávka	zahyne jedno nebo více testovacích zvířat
Maximálně snesitelná dávka	nejvyšší dávka při níž všechna zvířata přežívají

Tabulka IV  
Typy koncentrací vzhledem k době expozice

Koncentrace	Definice
Nejvyšší přípustná	dlouhodobá expozice nepředstavuje poškození lidského zdraví
Nárazová	maximální povolená expozice je 30 min
Špičková	koncentrace nesmí být překročena

Tabulka V  
Rozdělení karcinogenů podle struktur kde působí<sup>56-58</sup>

Klasifikace	Způsob účinku	Příklad sloučenin
I. Genotoxické	přímá interakce s DNA	
1. Primární karcinogeny	poškození chromosomů, mutace DNA, přímá reakce s DNA, bez metabolické aktivace	bischloromethylether, $\gamma$ -propiolakton, ethylenamin
2. Sekundární karcinogeny	metabolická přeměna na aktivní karcinogen v organismu	nitrosaminy, ethylendibromid, vinylchlorid
3. Anorganické karcinogeny	interference při replikaci DNA	Ni, Cd
II. Epigenetické	látky které neinteragují s DNA	
4. Cytotoxiny	cytoletální, indukce regenerativní buněčné proliferace, sekundárně mohou vznikat mutace	nitritotrioxtová kys., chloroform
5. Mitogeny	stimulace mitogeneze, sek. mutace, preneoplastický růst	fenobarbital, $\alpha$ -hexachlorcyklohexan
6. Peroxisomové proliferátory	tvorba peroxidových radikálů, aktivace růstových genů	fenolfibrát, diethylhexylftalát, clofibrát
7. Immunosupresory	snížení aktivity imun. sys.	azathioprin, cyklosporin A, 6-merka-ptopurin
8. Analoga hormonů	chronická stimulace buněčného růstu, vznik reaktivních radikálů	estrogeny, diethylstilbestrol, syntetické androgeny <sup>59</sup>
9. Pevné karcinogeny	pouze mezenchiální buňky, fyzikální působení, mechanismus neznámý	polymery, kovový prach (zlato), azbest
10. Kokarcinogeny	viz text	sacharin, krotonový olej
11. Promotory	klonální expanze preneoplastických buněk	estery forbolu, sacharin, krotonový olej
12. Progresory	přímá nebo nepřímá změna karyotypu, zvětšení růstové rychlosti buněk	arzenité soli, benzen, hydroxymočovina

U všech léčiv je sledována terapeuticky efektivní dávka ( $ED_{50}$ -effective dose) versus  $LD_{50}$ , jejich vztah je na obr. 1.  $ED_{50}$  je množství látky nutné k vyléčení nebo odstranění příznaků (A) padesáti procent jedinců z určitého onemocnění. Křivka B popisuje závislost  $LD_{50}$  na koncentraci látky. Vztah mezi těmito veličinami komplikuje akumulace efektů léčiva v časových intervalech podávané látky. Rozpětí bezpečných koncentrací podávaného léčiva se určí z poměru (terapeutický index)  $LD_{50}/ED_{50}$  a maximální bezpečnou dávkou léčiva můžeme určit z poměru  $LD_1/LD_{99}$ .

### 3. Toxický efekt xenobiotik na lidský organismus

Účinek xenobiotika je často ovlivněn složitými vztahy mezi jednotlivými orgány organismu. Hlavní faktory, určující výsledný efekt, jsou dávka a doba expozice. Důležitý je i životní styl jedince a jeho genetické dispozice. Xenobiotika můžeme rozdělit na látky se specifickým a nespecifickým účinkem, což má význam při vývoji léků, kde je snaha o syntézu látek se specifickým účinkem. Ve skutečnosti však mezi těmito skupinami není ostrá hranice.

#### 3.1. Karcinogenní, mutagenní a teratogenní látky

Společným znakem těchto látek je poškození genetické informace, které může vést k neotransformaci (tab. V). Mohou

být poškozeny mezenchymové buňky (sarkomy), krevní buňky (leukémie) a epitelové buňky (karcinomy). U člověka se nejčastěji vyskytují karcinomy, protože právě epitelové buňky jsou vystaveny přímým účinkům toxických látek (žaludek, plíce, kůže). Zdravý organismus nádorové buňky likviduje činností přirozených zabijáčů (natural killer cell), ale při oslabení vlivem toxických látek nemůže onkogenezi čelit. Proto některé látky způsobují vznik nádorů i sekundárně - poškozením složek imunitního systému.

Prokazatelně karcinogenní účinky mají polyaromatické uhlovodíky (3,4-benzopyren, 1,2-benzathracen a jejich deriváty obsažené v dehtu a výfukových plynech), které mají přímý vztah ke vzniku průduškového karcinomu. Tyto sloučeniny jsou prokarcinogeny, v organismu z nich vznikají epoxidy, které jsou odpovědné za karcinogenní účinek.

Některé látky jako alkylační činidla, aromatické aminy ( $\beta$ -naftylamin), azosloučeniny (barviva), nitrosoučeniny (uretan, dimethylnitrosamin) chemicky modifikují báze v DNA a jsou tak schopné způsobit vznik mutací, které mohou vést ke vzniku nádorů. Málo probádaný je onkogenní vliv směsí látek. Některé látky, které nejsou karcinogenní, zvyšují nebezpečnost tvorby nádorů při podávání karcinogenů. Takové látky se nazývají kokarcinogeny a byly objeveny např. v krotonovém oleji. Jedná se o různé estery forbolu (terpen). Obecně se má za to, že kokarcinogeny umožňují lepší vstup karcinogenů do buněk nebo tvoří nebezpečné adukty za pomoci enzymového aparátu organismu.

Nejvíce postiženým orgánem jsou játra a to pro jejich

výsadní postavení v metabolismu xenobiotik, dále jsou to plíce a ledviny<sup>60</sup>. V důsledku exponenciálního rozšíření nově syntetizovaných látek, se v posledních desetiletích stále objevují nové formy nádorového bujení a zvyšuje se frekvence jejich výskytu (srdce, mozek, nové typy leukémie). Údaje o karcinogenních efektech látek se většinou zjistí z experimentů na pokusných zvířatech a ze zdravotního stavu populace, která byla vystavena dlouhodobým vlivům xenobiotik<sup>61</sup>. Ještě větší skupinu tvoří látky podezřelé z karcinogenecity<sup>62</sup>, jejichž účinek na tvorbu nádorů nebyl přímo prokázán, ale jejich chemické vlastnosti a podobnost k pozitivně působícím látkám naznačuje, že by neotransformaci mohly způsobovat.

Některé karcinogeny jsou zároveň i silnými teratogeny. Poškození vývoje plodu nemusí však probíhat na úrovni DNA, ale mohou inhibovat mitosu a tím diferenciaci buněk. Způsob a vliv působení látek je značně závislý na stadiu vývoje lidského zárodku. Pro některé látky je charakteristický toxický efekt na embryo pouze v úzkém časovém rozmezí, kdy poškozuje pouze budoucí orgán, který je právě ve vývoji<sup>63</sup>. Výsledky z pokusů na zvířatech nemusí být vždy platné pro člověka. U některých látek byly zjištěny silné maltransformační účinky pro krysy (kys. acetylsalicylová), nikoli však pro člověka. Proto nejspolehlivější údaje o teratogenním účinku látek na lidské zárodky pocházejí z klinických analýz (tab. VI).

Tabulka VI  
Prokázaná teratogenita látek epidemiologickou evidencí

Sloučenina	Efekt
Ethylen oxid	kongenitální maltransformace, zakrnění zárodku <sup>64</sup>
Styren	zakrnění zárodku <sup>65,66</sup>
PCB	zakrnění zárodku, toxemie, kongenitální maltransformace, nízká hmotnost plodu <sup>67,68</sup>
Sloučeniny olova	potrat, degenerace zárodku <sup>69</sup>
DDT	předčasný porod <sup>70</sup>
DES	vaginální nádory (ženy), urologické anomálie (muži) <sup>71,72</sup>
Sloučeniny rtuti	prenatální mortalita <sup>67</sup>

### 3.2. Látky poškozující funkci některých vnitřních orgánů

Poškození jakéhokoli orgánu xenobiotiky je závislé na jeho buněčné struktuře a funkci. Pro teoretické úvahy je třeba vztah v potaz obsah lipidů a typy receptorů v buňkách, prokrvení orgánu a jeho detoxikační schopnosti. Obsah tuků v orgánech a tkáních (játra, CNS, tuková tkáň) může vést k akumulaci hydrofobních látek (PCB, aromatické uhlovodíky), a koncentrace toxické látky v buňkách může dosahovat letálních hodnot. Typy receptorů orgánu a obsah lipidů v membráně určují, jaké látky se dostanou do buněk. Některá xenobiotika soutěží s endogenními látkami (psychofarmaka, analoga) o receptory. Největší toleranci k propustnosti látek má srdce, což je příčinou toho, že velmi mnoho xenobiotik způsobuje jeho poškození, jako jsou arytmie, nedostatečnost a změny krevního tlaku<sup>73</sup>. Zásadní postavení v metabolismu xenobiotik zaujímají játra, disponující velkým množstvím detoxikačních enzymů.

Látky, přijaté do portálního oběhu zaživacím ústrojím jsou v játrech účinně zachycovány. Proto jsou játra při akutních i chronických otravách často postižena defekty funkce a ve vážnějších případech vývojem karcinomu, cirrhosou, změnou hepatocytů nebo nekrosou.

Ledviny jsou jedním z nejprokrvenějších orgánů a hrají zásadní úlohu v metabolismu xenobiotik. Řada látek způsobuje specifické či nespecifické poškození ledvin. Častá je jejich dysfunkce v tubulární filtraci moči. Části nefronu jsou různé citlivé ke xenobiotikům<sup>74</sup>, a to se projevuje různou četností onemocnění ledvin<sup>75,76</sup>. Rozšířená je proteinurie, vysoký obsah proteinů v moči, způsobený poškozením bazální membrány<sup>77</sup>. Patologické změny ve filtraci některých látek (glukosa, ionty) tubulárními kanály jsou zapříčiněny nefrotoxiny např. sloučeninami rtuti a látkami inhibujícími oxidativní fosforylaci, které v některých případech ničí specifické přenašeče pro tyto látky<sup>78</sup>. Nefrotoxické jsou i další látky negativním způsobem ovlivňující energetický metabolismus<sup>79</sup>, který je podstatný pro zachování ledvinných funkcí, protože většina dějů probíhajících v ledvinách je metabolicky velmi náročná. Sloučeniny, jako například N-hydroxyacetamol mohou zapříčinit úplnou nekrosu ledvin<sup>80</sup>.

Stále tíživější je problém nežádoucího vlivu látek na imunitní systém. Nejrozšířenějším defektem imunitního systému je hypersenzitivita (alergie), často zapříčiněná xenobiotiky-hapteny. Podmínkou vyvolání imunitní reakce je navázání látky na krevní proteiny, nebo jiné makromolekulární determinanty. Tuto schopnost mají především xenobiotika s reaktivními skupinami v molekule, které vytváří kovalentní vazby s aminokyselinovými zbytky v proteinech (tab. VII)

Tabulka VII  
Reaktivní skupiny haptenu modifikující aminokyseliny v proteinech<sup>81</sup>

Skupina	Modifikovaná aminokyselina	
Diazoniová	-N <sup>+</sup> =N	Ser -OH
Thiolová	-SH	Lys -NH <sub>2</sub>
Sulfonová	-SO <sub>3</sub> H	Arg -NHCNH-NH <sub>2</sub>
Aktivní halogeny		Cys -S-S-
Aldehydová	-CHO	Tyr

Jiné skupiny látek mohou vyvolat u buněk syntetizujících imunitní mediátory, např. histamin, heparin, prostaglandiny, leukotrieny, jejich vyšší aktivitu a tím vyvolat nežádoucí sekundární reakci imunitního systému<sup>82</sup>. Některá antibiotika naopak vyvolávají imunosupresi.

Látky negativně působící na nervový systém, neurotoxiny, mohou způsobovat deprese<sup>83,84</sup>, hypertermii<sup>85</sup>, snížení tělesné hmotnosti, srdeční arytmií, změny rychlosti dýchání, poškozenou motoriku a třes, ztrátu paměti a další syndromy<sup>86</sup>. Rozmanitost projevů poškození nervového systému souvisí s jeho propojením se všemi orgány těla. K poškození nervového systému dochází na různých úrovních. Nejčastější je poškození iontových kanálů na povrchu cytoplazmatické membrány nervových buněk, jenž vede k poruše přenosu nervového signálu neurotransmitery<sup>87</sup>. Nervové buňky jsou citlivé k inhibitorům energetického metabolismu<sup>88</sup>.

*Tato práce vznikla za finanční podpory grantu č. 94009 Československo-americké grantové agentury a grantu 96074 Ministerstva školství.*

## LITERATURA

- Dočkal P., Soldán P.: *Metody testů akutní toxicity a biodegradability xenobiotik*. VÚV, Praha, 1988.
- Loomis T. A., Hayes A. W.: *Loomis's Essentials of Toxicology*. Academic Press, San Diego 1996.
- Qureshi A., Ansar A., Anthony A., v knize: *Microscale Test. Aquat. Toxicol.* (Wells P. G., Lee K., Blaise C, ed.). Funca, New York 1987.
- Ching P., Michael B. J.: *Biochem. Eng. J.* 1, 63 (1998).
- Yoh M., Frimpong E., Honda T.: *Microbiol.* 19, 57 (1997).
- Petit F., Le Goff P., Cravedi J. P., Valotaire Y., Pakdel F.: *Mol. J. Endocrinol.* 19, 321 (1997).
- Rombke J., Meller M., Knacker Th., Franke C, Studinger G., Nagel R.: *Chemosphere* 36, 211 (1998).
- Severinsen M., Jager T.: *Chemosphere* 37, 41 (1998).
- Zavadil J., Bukovjan K.: *Chem. Listy* 92, 551 (1998).
- Bishop J. B., Morris R. W., Seely J. C, Hughes L. A., Cain K. T., Generoso M. W.: *Appl. Toxicol.* 40, 191 (1997).
- Sarver J. G., White D., Erhardt P., Bachmann K.: *Environ. Health Perspect.* 105, 1204 (1997).
- Brueggemann R., Schwaiger J., Negele R. D.: *Chemosphere* 30, 1767 (1995).
- Glatt H., Bartsch I., Christoph S., Coughtrie M. V. H., Falany C. N., Hagen M., Landsiedel R.: *Chem. Biol. Interact.* 709, 195 (1998).
- Curren R., Bruner L., Goldberg A., Walum E.: *Erik, Environ. Health Perspect. Suppl.* 106, 419 (1998).
- Fisher D. J., Knott M. H., Turley B. S., Yonkos L. T., Ziegler G. P.: *Water Environ. Res.* 70, 101 (1998).
- Villar D., Buck W. B., Gonzalez J. M.: *Toxicol.* 40, 156 (1998).
- Walum E.: *Environ. Health Perspect. Suppl.* 106, 497 (1998).
- Adams T. B., Greer D. B., Doull J., Munro I. C, Newberne P., Portoghese P., Smith R. L., Wagner B. M., Weil C. S., Woods L. A., Ford R. A.: *Food Chem. Toxicol.* 36, 249 (1998).
- Zhang T., Zhu H. I., Jin H. J.: *J. Environ. Sci.* 10, 151 (1998).
- Roth W. L., Young J. F.: *Int. J. Toxicol.* 17, 355 (1998).
- Johnson K. M., Phillips M., Wang C, Kevetter G. A.: *J. Neurosci. Res.* 52, 709 (1998).
- Bruhwyler J., Liegeois J. F., Geczy J.: *Pharmacol. Res.* 36, 23 (1998).
- Nomura T.: *Mutat. Res.* 198, 309 (1988).
- Spielman H.: *The Mammalian Preimplantation Embryo*. Academic Press, New York 1987.
- Nazarali A., Puthucode R.: *Neuromethods* 32, 253 (1998).
- Clerici L. A., Cocco B., Sacco M. G., Monteggia E., Collota A.: *Toxicol. in Vitro* 9, 577 (1995).
- Henshel D. S.: *ASTM Spec. Tech. Publ.* 1996, 219.
- Collins T. F. X., Sprando R. L., Hansen D. L., Shackelford M. E., Welsh J. J.: *J. Toxicol.* 17, 299 (1998).
- Adler I., Filser J., Gonda H., Schriever-Schwemmer H.: *Mutat. Res.* 397, 85 (1998).
- Knasmuller S., Helma C, Eckl P. M., Gottmann E., Steinkellner H., Kassie F., Haider T., Parzefall W., Schulte H.: *Wien. Klin. Wochenschr.* 110, 824 (1998).
- van Boekel M. A., Goepfert A. R., Alink G. M.: *Cancer Lett.* 114, 85 (1998).
- Vogel E. W., Barbin A., Nivard M. J. M., Stack, H. F., Waters M. D., Lohman P. H. M.: *Mutat. Res.* 400, 509 (1998).
- Yamadav M., Espinosa A., Javier J., Watanabe M.: *Mutat. Res.* 375, 9 (1997).
- Cobb H. E., Gee P., Schiestl R. H., Sommers C. H.: *In Vitro Mol. Toxicol.* 11, 35 (1998).
- Provost G. S., Kretz P. L., Hamner R. T., Matthews C. D., Rodgers B. J., Lundberg K. S., Dyaico M. J., Short J. M.: *Mutat. Res.* 288, 133 (1993).
- Young R. R., Rodgers B., Provost G. S., Short J. M., Putman D. L.: *Environ. Mutagen.* 21, suppl. 22, 79 (1993).
- Momma J. K., Satoshi I.: *Toxicology* 126, 75 (1998).
- Leung M. F., Geoghegan B. K., Zamansky G. B., Chou I. N.: *Toxicol. in Vitro* 4, 252 (1998).
- Roudabush R. L., Terhaar C. J., Fassett D. W., Dziuba S. P.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 7, 559 (1965).
- Gettings S. D., Lordo R. A., Feder P. I., Hintze K. L.: *Food Chem. Toxicol.* 36, 47 (1998).
- Gettings S. D., Lordo R. A., Feder P. I., Hintze K. L.: *Food Chem. Toxicol.* 36, 209 (1998).
- Han S. B., Kim H. M., Kim Y. H., Lee C. W., Jang E. S., Son K. H., Kim S. U., Kim Y. K.: *Int. J. Immunopharmacol.* 20, 1 (1998).
- Forman S., Káš J., Fini F., Steinberg M., Ruml T.: *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 13, 11, (1999).
- Abdul-Hussain S., Acosta D.: *Toxic Subst. J.* 13, 1 (1994).
- Yuspa S. H., Dlugosz A. A., Cheng C. K.: *J. Invest. Dermatol.* 103, 90 (1994).
- Kortig H. C, Herzinger T., Hartinger T., Maibach H. I., Kerscher M.: *J. Dermatol. Sci.* 7, 119 (1994).
- Davila J. C, Rodriguez J. R., Melchert R. B.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 63 (1998).
- Blauboer B. J., Boobis A. R., Castel J. V.: *Altern. Test. Lab. Anim.* 22, 231 (1994).
- Adams S., Marshall B., Bethesda M. D.: *Biological Indicators of Stress in Fish*. American Fisheries Society, Washington 1990.
- Niimi A. J.: *J. Great Lakes Res.* 16, 529 (1990).
- Musonda C. A., Helsby N., Chipman J. K.: *Hum. Exp. Toxicol.* 16, 700 (1997).
- Hadravová R., Ruml T.: *Chem. Listy* 90, 109 (1996).
- Lopez B., Juan P. C.: *Mutat. Res.* 399, 3 (1998).
- Yoshida T., Yakubutsu D.: *J. Biol. Chem.* 12, 531 (1997).
- Dhalluin S., Elias Z., Cruciani V., Bessi H., Poirot O., Rast C, Gate L., Pages N., Tapiero H., Vasseur P., Nguyen B. G.: *Int. J. Cancer* 75, 744 (1998).
- Heminky K., Mutannen P., Saloniemi I., Niema M., Vainio H.: *Br. Med. J.* 285, 1461 (1982).
- Pitot H. C, Dragon Y. P.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 202, 37 (1993).
- Pitot H. C: *C. I. I. T. Activites* 1993, 13.
- Yager J. P., Zurlo J., Ni N.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 198, 667 (1991).
- Gold L. S., Slone T. H., Manley N., Bernstein L.: *Environ. Health Perspect.* 93, 233 (1991).



61. Pintadosi S., Sulivan J. B., v knize: *Hazardous Materials Toxicology: Clinical Principles of Environmental Health*, Chap. 8. Futura Publishing, Mount Kisco 1992.
62. Maronpot R.R.: Chemical Carcinogenesis, In: *Handbook of Toxicologic Pathology*, kap. 7. Futura Publishing, San Diego 1991.
63. Derelanko M. J., Holinger M. A.: *CRC Handbook of Toxicology*, kap. 12. CRC Press, London 1995.
64. Heminky K., Franssila E., Vainio H.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 45, 123 (1980).
65. Murray F., John J., Balmer M., Schvetz B. A.: *Toxicology* 11, 335 (1978).
66. Barlow S., Sulivan F. M., v knize: *An Evaluation of Animal and Human Data*. Academic Press, London 1982.
67. Bercovici B., Wasserman M., Cuccos S., Ron M.: *Environ. Res.* 28, 169 (1983).
68. Fahim M., Fahim Z., Hall D.G.: *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 13, 309 (1976).
69. O'Leary J. A., Davies J. E., Edmunson W. F., Feldman M., v knize: *Epidemiology of DDT*. Futura Publishing, Mount Kisco 1972.
70. Herbsts A. L., Ulfelder H., Poskanzer D. C.: *New Engl. J. Med.* 284, 878 (1971).
71. Gill W. B., Schumacher G. F. B., Bibo M.: *J. Urol.* 77, 447 (1977).
72. Wexler P.: *Information Resources in Toxicology*, kap. 10. Elsevier, New York 1988.
73. Raza H., Lakhani M. S., Ahmed I., John A., Morgenstern R.: *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* 118B, 829 (1980).
74. Taysse L., Chambras C., Marionne, D., Bosgiraud C., Deschaux P.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 300 (1987).
75. Steven C., Tarloff N., Fundam J. B.: *Appl. Toxicol.* 39, 101 (1992).
76. Robertson J. L.: *Toxicol. Pathol.* 26, 64 (1998).
77. Pfaller W., Gstraunthaler G., Willinger C. C.: *Toxicol. Lett.* 53, 39 (1990).
78. Edward A., Celia J.: *Toxicol. Pathol.* 26, 18 (1993).
79. Healey K., Calder I. C., Yong A. C., Crowe C. A., Funder C. C., Ham K. N., Tange J. D.: *Xenobiotica* 8, 403 (1978).
80. Davides G. E.: *Proc. Eur. Soc. Study Drug Tox.* 4, 198 (1964).
81. Sefarin W. E., Austen K. F.: *New Engl. J. Med.* 7, 30 (1987).
82. Towfighi J., v knize: *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Williams and Wilkins, Baltimore 1980.
83. Fasset D. W.: *Hygiene and Toxicology*, Vol. 2. Wiley Interscience, New York 1973.
84. Kaye S.: *Handbook of Emergency Toxicology - A Guide for Identification, Diagnosis, and Treatment of Poisoning*. CRC Press, Springfield 1980.
85. Abou-Donia M. B., v knize: *Neurotoxicology*. CRC Press, Boca Raton 1992.
86. Cooper J. R., Bloom F. E., Roth R. H.: *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. Oxford University Press, New York 1986.
87. Norton S., v knize: *Cassaret and Doull's Toxicology: The Basis Science of Poisons*. Pergamon Press, Elmsford 1975.
88. Tichy M., Benfenati E., Rucki M., Feltl L.: *Prac. Lek.*, 50, 66, (1998).

**Z. Knejzlík and T. Ruml** (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **The Negative Effect of Xenobiotics in Human Organism and Methods for Its Testing**

The need for testing of new pharmaceuticals and other newly developed compounds is connected with their potential hazardous effect in human organism. Toxicity of xenobiotics can be tested by various methods including both *in vitro* and animal models. The goal of this review is to bring an overview of various types of available techniques for evaluation of toxicity and carcinogenicity of chemical compounds. The scope and limitations of several model systems are discussed.