

# FETAX

Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus



Vypracovali:  
Jakub Kubačka  
Martin Steček



# Test embryotoxicity a teratogenity na drápatce vodní

- Test se provádí podle metodiky ASTM (American Society for Testing and Materials)
- Prováděn na ranních vývojových stádiích – embryích drápatky vodní
- 96 hodinový akutní test, slouží k odhadu rizika embryotoxicity a teratogenity
- Drápatka vodní slouží jako modelový organismus – možná extrapolace výsledků na jiné organismy včetně savců s 85% pravděpodobností

# Drápatka vodní

- Původem Středoafriický druh
- 10-15 cm (samci 2/3)
- Pohlavní dospělost v 10-12 měsících
- Zajímavost: v minulosti využívány jako těhotenský test

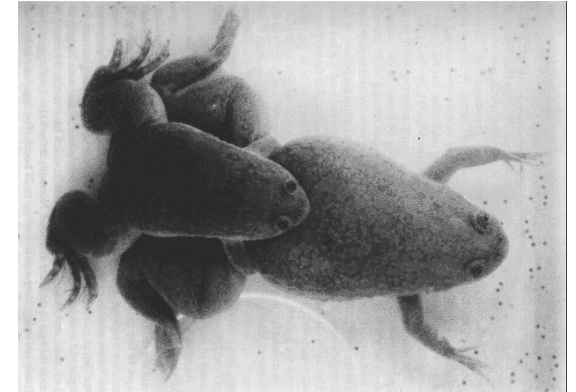


# Chov drápatky vodní

- Izolace od denního světla
- 4-6 kusů na min. 1,8 litrové aquarium
- Teplota vody 23 +/- 3 °C
- Čistá voda stabilní kvality, nejlépe z přírodního zdroje – ne povrchová
- Krmná směs: hovězí játra + vitamínová směs



# Příprava testu – rozmnožování



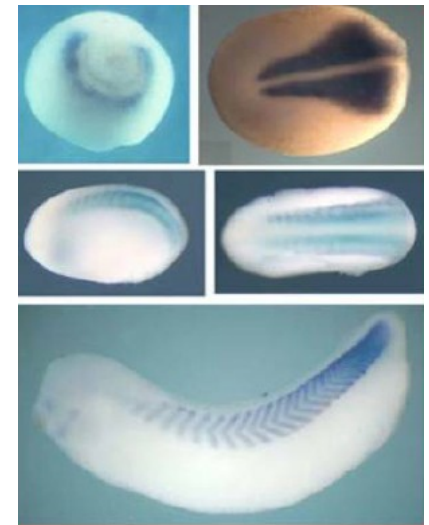
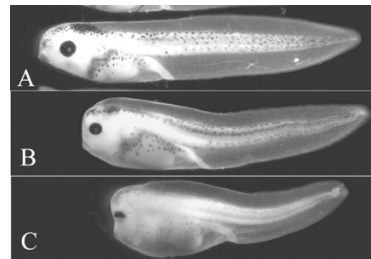
- Umístění v aquariích po párech
- Teplota  $21 \pm 2$  °C
- Navození páření: lidský Choriogonadotropin:  
samci 250-500 IU, Samice 500-1000 IU.  
Koncentrace: 1000 IU/ml v 0,9% roztoku NaCl
- Snůška vajec po 9-12 hodinách
- připuštění pouze dokonale kruhové snůšky

# Roztok FETAX

NaCl	625 mg
NaHCO <sub>3</sub>	96 mg
KCl	30 mg
CaCl <sub>2</sub>	15 mg
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	60 mg
MgSO <sub>4</sub>	75 mg
H <sub>2</sub> O	1000 ml
pH	7,6 – 7,9

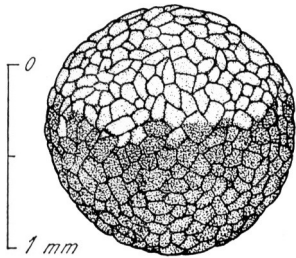
# Příprava embryí

- Oddělení vajíček ze snůšky v 2% L-cysteinu – 1-3 min. (pH roztoku 8,1)
- Separace deformovaných embryí
- Vhodné stádium pro začátek testu: střední blastula – ranní gastrula (8-11 stádium vývoje)
- Přechovávání v FETAX roztoku

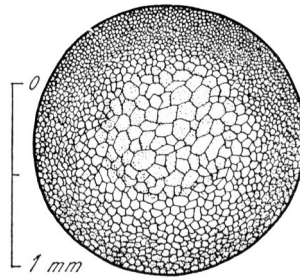


# Vývojové stádia

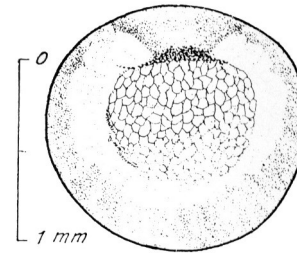
- Začátek testu:



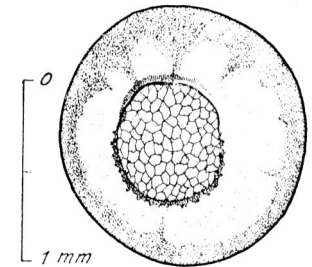
St. 8 — An.



St. 9 — Vegetative view  
Dorsal side above (Veg.)

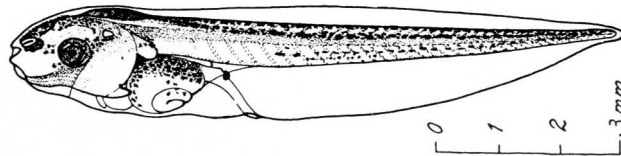


St. 10 — Veg.

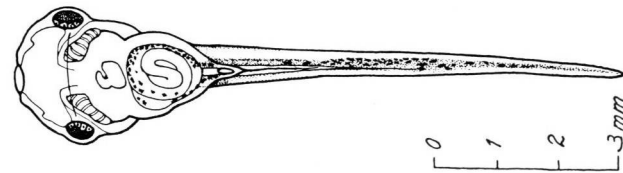


St. 11 — Veg.

- Ukončení testu:



St. 46 — Lat.

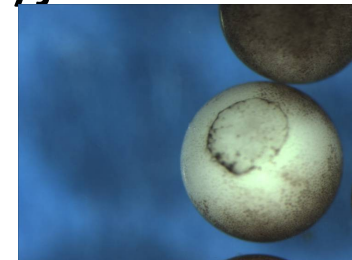


St. 46 — Ventr.



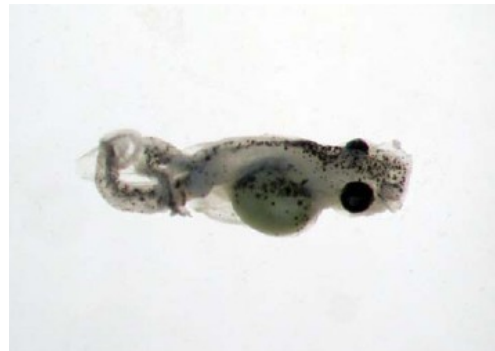
# Test

- Petriho misky, 25 embryí, 10 ml roztoku
- Min. dvě opakování pro každou koncentraci
- Negativní kontrola pouze s roztokem FETAX
- Pozitivní kontrola – 6-aminonicotinamid (LC50 2,23 mg/ml, EC50 0,005 mg/ml)
- Teplota 24 +/- 2 °C
- pH optimum 7,7 – v rozmezí 6,5-9
- Doba trvání testu – 96 hodin
- Dosažení 46 stádia u negativní kontroly
- Výměna roztoku každých 24 hodin + vyjmutí mrtvých embryí



# Vyhodnocení

- Ukončení testu: fixace živých embryí v 3% formaldehydu
- Úmrtnost
- Malformace: „Atlas of Abnormalities – John A. Bantle“
- Inhibice růstu



# Validita testu

- Embrya od jednoho páru
- Přežití kontroly > 90%, malformace < 10%
- Dodržení pH limitu: 6,5-9,0
- Vyjímání mrtvých embryí
- Dodržení teplotního limitu: 24 +/- 2 °C

# Test s MAS

- Metabolic Activation System
- Při testech pro humánní embryotoxikologii
- Simulace savčího metabolismu (cytochrom P-450)
- Extrakt z potkaních jater (indukce detoxikačního mechanismu: Aroclor 1254)
- NADPH
- Úprava dávkování roztoku z 10 na 8 ml
- Ještě větší důraz na aseptickou práci
- Přidání protilátek: penicilin-streptomycin

# Děkujeme za pozornost

## Použité zdroje

- <http://drapatka.ic.cz/?strana=2>
- <http://drapatka.ic.cz/?strana=7>
- <http://drapatka.ic.cz/?strana=7>
- <https://is.muni.cz/auth/el/1431/jaro2010/Bi5620/um/Ekotoxbiot>
- <http://www-cbd.ups-tlse.fr/organismes/nieuwkoop/nieuwkoop.html>