

Ekotoxikologické testy s obojživelníky

Klára Hilscherová a Blahoslav
Maršálek

RECETOX- Přírodovědecká fakulta MU Brno, Kamenice 3
Botanický ústav AVČR, Květná 8. 603 65 Brno

Obojživelníci unikátní pro (eko)toxikologické procesy:

- Jsou významnou součástí ekosystémů - reprezentují většinou **konzumenty druhého řádu** (většina druhů je insektivorních).
- Většina zástupců (zejm. ze skupiny bezocasích, *Anura*) prodělává unikátní **proces metamorfozy (embryo, larva, dospělec)**
- životní strategie **reprezentuje řadu rozličných expozičních cest** a míst pro působení polutantů
- **transdermální přenos** vody a polutantů: u obojživelníků 70-90% celkové kapacity.
- **u jiných obratlovců** jsou procesy výměny vody, iontů (a také plynů) realizovány hlavně přes **plíce/žábra, gastrointestinální trakt**



Dramatický úbytek populací obojživelníků (označovaný Global Amphibian Decline)

sledován od 60. let 20. století

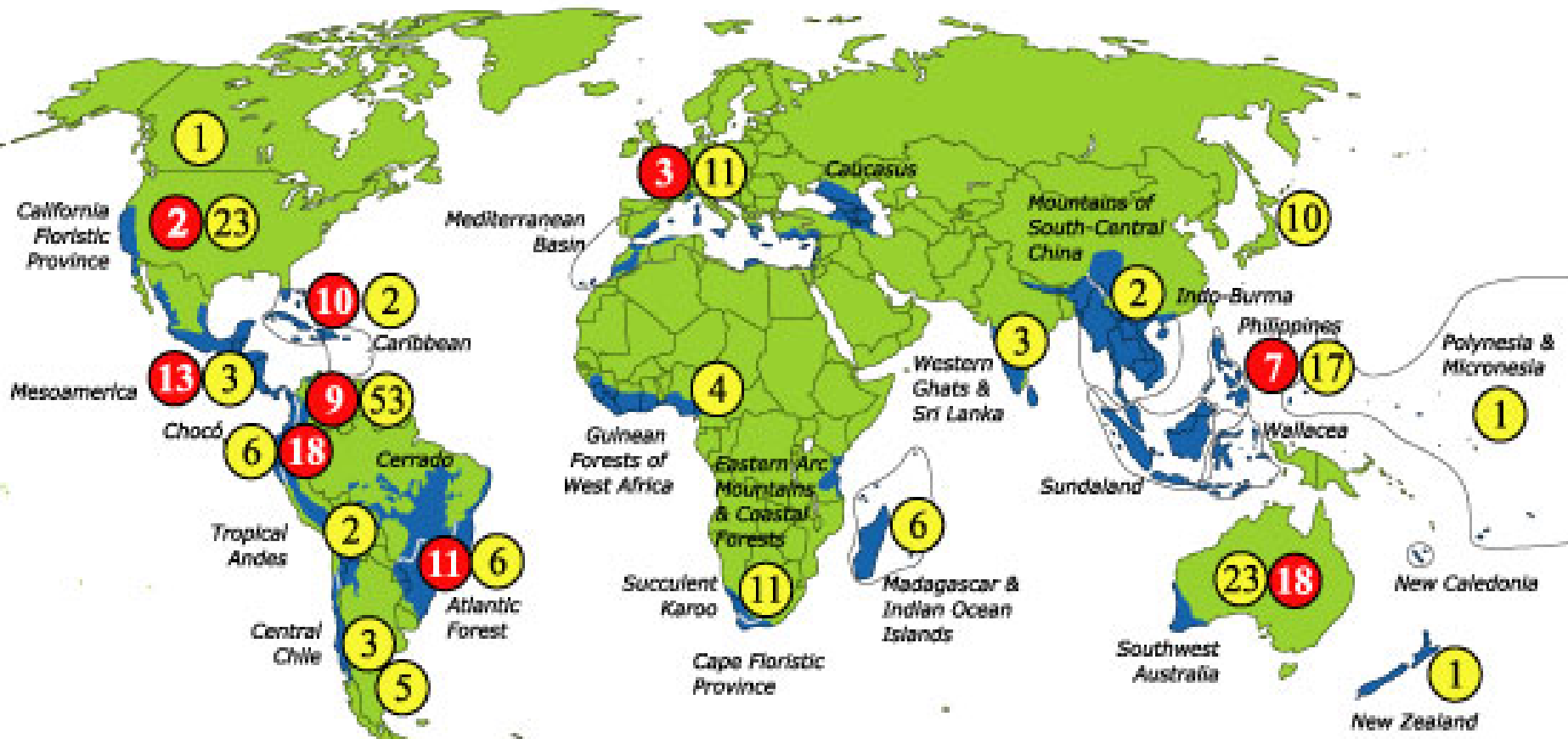
výsledky dlouhodobého pozorování

- z více než 20 zemí světa

- množství možných příčin



Distribution of Global Amphibian Declines



= Extinct, Missing or Critically Endangered

= Additional Threatened (Endangered or Vulnerable)

Source: IUCN 2000, AmphibiaWeb, Hero J.-M. & L. Shoo, 2003. Chapter 7 in Amphibian Conservation, Smithsonian Press. Background biodiversity hotspots map from Myers et. al., 2000. Nature 403:853-858 c/o Conservation International. Prepared by J.-M. Hero, April 2002.

Předpokládané příčiny poklesu počtu obojživelníků v přírodě:

- vyšší citlivost k znečištění prostředí (transdermální přenos)
- změny klimatu a změny mikroprostředí (reprodukce)
- introdukce predátorů
- imise a kyselá srážky
- UV záření – výkyvy, klimatické změny
- infekce, onemocnění, paraziti
- poškození, úbytek habitatů
- kombinace vlivu nových polutantů a změn přirozeného prostředí
- působení pesticidů – aplikovány v době rozmnožování a vývoje obojživelníků
- kombinace více faktorů – např. negativní působení introdukovaných druhů je dále umocňováno působením cizorodých látek, infekčních onemocnění nebo zvýšenou mírou UV-B záření

Embryotoxicita x teratogenita

Embryotoxicita – vlastnost látek, která se projevuje nepříznivými účinky na zárodek (embryo)

Embryotoxické látky působí smrt zárodků či narušení vývoje nebo růstu

Teratogenita – vlastnost látek, která způsobuje trvalé funkční nebo strukturní abnormality (malformace) během období embryonálního vývoje

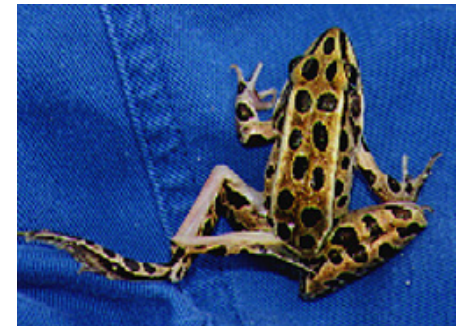
Teratogeny působí neúčinněji ve stadiu organogeneze

Malformace u obojživelníků

- celosvětový problém, souvisí se snižováním populací obojživelníků (Worldwide Amphibian Decline)
- 44 států USA, Kanada – malformovaní jedinci nalézáni přímo v prostředí (*Rana pipiens*, *Rana clamitans*, *Bufo americanus*, ...)
- hlavní příčiny – UV-B záření
 - invaze parazity (Trematoda – *Ribeiroia ondatrae*)
 - kontaminanty životního prostředí



pesticidy, herbicidy
těžké kovy



Možný důvod: Kontaminanty

“Obojživelníci jsou zvláště citliví vůči xenobiotikům v prostředí díky své fyziologii a chování” (Bidwell and Gorrie, 1995)

Frog Metamorphosis



Ekotoxikologie obojživelníků: málo známá oblast, rozvoj v posledních letech

O koncentracích a efektech polutantů na obojživelníky existuje velmi málo údajů. Nedostupné jsou experimentální studie určující biokoncentraci (biokoncentrační faktory, BCFs) a/nebo bioakumulaci.

Testy toxicity a využití v ekotoxikologii

- sporé informace - omezené použití
- **ochrana obojživelníků**
- limitace na rody Rana (skokan), Bufo (ropucha), Xenopus (drápatka)



- **údaje o kontaminaci, bioakumulaci apod. máme pouze z uhynulých jedinců** (? stáří..)
- **Biochemické ukazatele z krve** (plánované odběry v přírodních populacích – výjimečně)

Testy s obojživelníky

Obojživelníci nacházejí uplatnění v testech **teratogenity**, **genotoxicity** a v testech pro odhalení **narušení endokrinního systému**

Typy studií: taxonomická diverzita, rozmnožovací aktivita, embryolarvální vývoj, biochemie orgánů. Etické překážky.

- **ISO, OECD, ASTM - FETAX** (Frog Embryo Teratogenesis Assay: *Xenopus*) *Xenopus laevis* - testování chemických látek a přípravků, sedimentů apod.
Evropa - skokan

Modelové druhy

- Nejčastěji používaný modelový organizmus - drápatka vodní (*Xenopus laevis*) (**ASTM E1439-98**)
- Další používané druhy - skokani *Rana pipiens* (**ASTM E1439-98, 1998**) a *Rana temporaria*
- rosničky *Litoria adelaidaensis* a *Crinia insignifera*
- drápatka *Silurana tropicalis*
- ropuchy *Bufo americanus* (**ASTM E1439-98, 1998**) a *Bufo arenarum*
- ocasatí obojživelníci žebrovník *Pleurodeles waltl* (AFNOR T90-325, 1992), axolotl *Ambystoma mexicanum* (Federal Register, 1998), čolci *Notophthalmus viridescens*, *Triturus vulgaris*



Většina informací – **FETAX**- Frog Embryo Teratogenesis Assay -Xenopus

- dobře **standardizovaná metoda**
- **reprezentativnost pro další obojživelníky????**
- postup využívající **testování letální toxicity a neletálních efektů (morfologické malformace)** během embryolarválního vývoje
- US-EPA č. 1001.0 - Fathead minnow, Embryo-larval Survival and Teratogenicity) lze dobře modifikovat pro účely testování efektů s obojživelníky
- skokan hnědý (*Rana temporaria*).
- ropucha obecná (*Bufo bufo*)
- ekotoxikologické biotesty s obojživelníky by neměl být pouze (ale v 90% je) FETAX

Test FETAX

- **FETAX = Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus**
- - podle metodiky **standard ASTM (*American Society for Testing and Materials*) E 1439-98 (1999): Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX).**
- Laboratorní test pro odhad rizika embryotoxicity a teratogenity chemických látek a enviromentálních směsí v roztoku
- Akutní, semistatický test
- **Hodnocení embryotoxicity s žábami - FETAX**
 - **expozice vajíček během embryonálního vývoje**
 - **ve standardní podobě ukončen po 96 hod**
 - **varianty – kompletní životní cyklus**



Frog Embryo Teratogenesis Assay: *Xenopus* (FETAX)

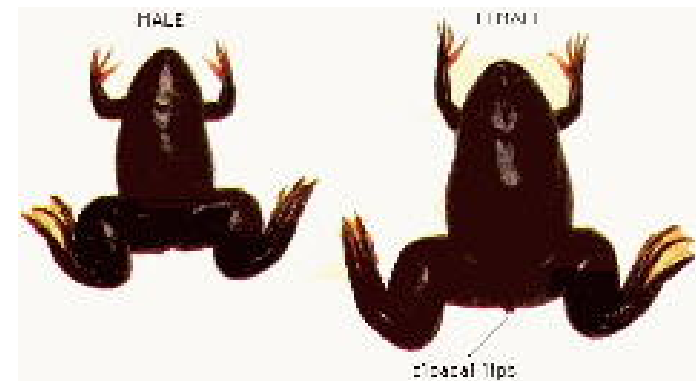
- Původně designován pro testování teratogenity chemických látek (farmak) na drápatce jako modelu pro obratlovce (pro lidi)
- Dobrá korelace mezi známými lidskými teratogeny a výsledky z FETAXu
- Používán pro testy jednotlivých látek, směsí, i odpadních vod

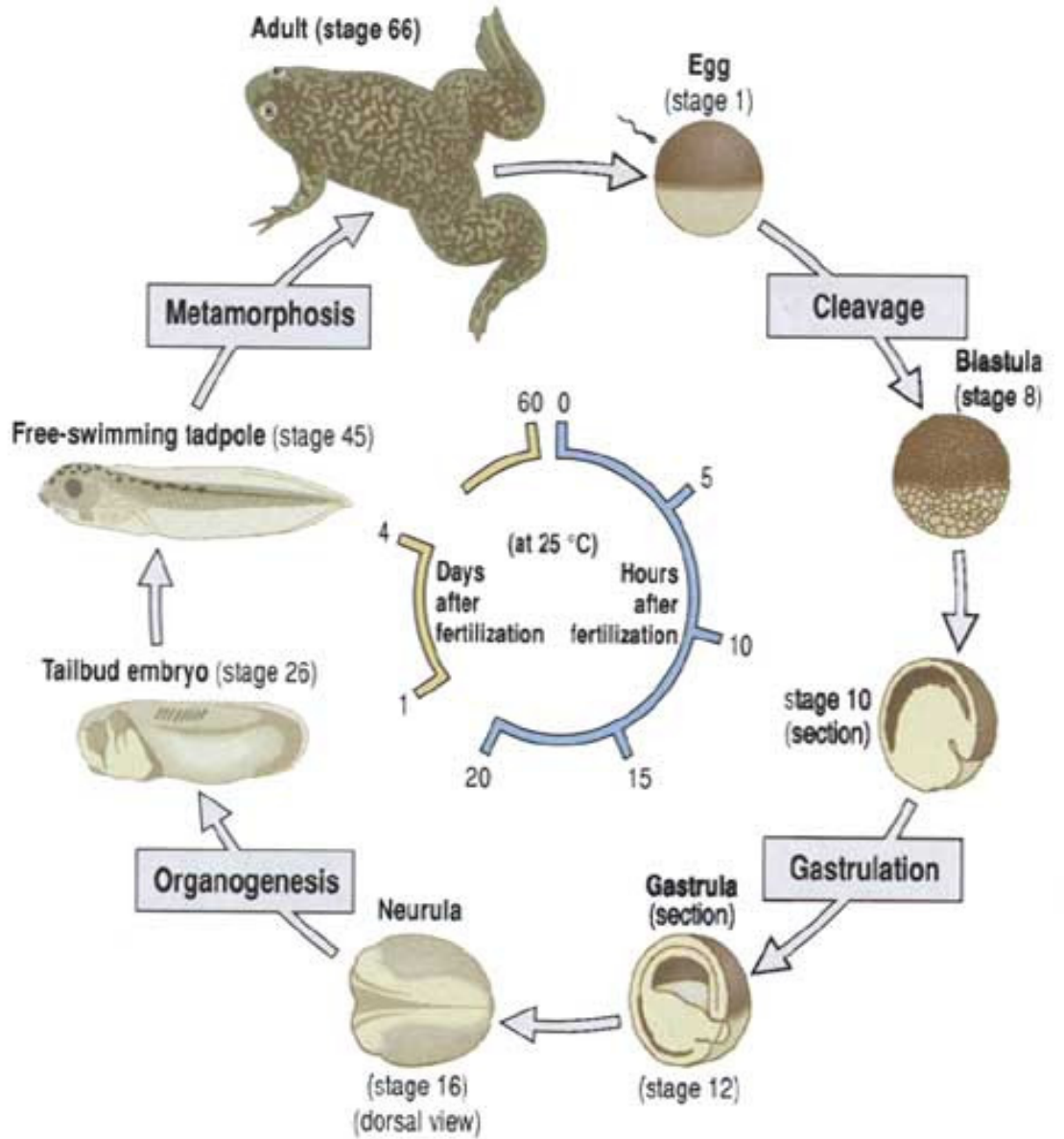
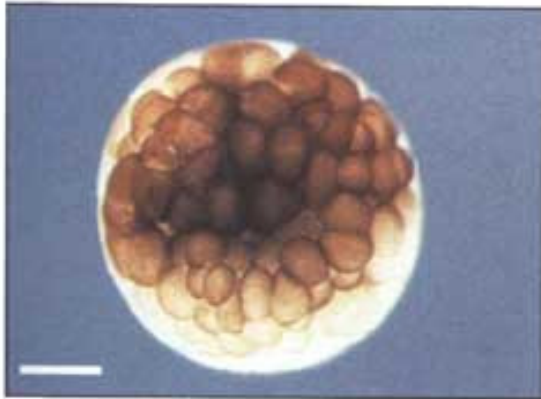


Modelový organismus - drápatka vodní (*Xenopus laevis*)

Studium vývojové, buněčné, molekulární biologie,
využití v embryologii, fyziologii, toxikologii

- dobrá znalost normálního vývoje, biologie a biochemie
- po celý život možnost odchovu v laboratoři
- schopné přijímat usmrcenou potravu
- akvatický způsob života larev i dospělců
- dospělci resistantní vůči chorobám
- možnost indukovaného získání embryí nezávisle na ročním období
- průhlednost larev - sledování malformací vnitřních orgánů





Laboratorní chov

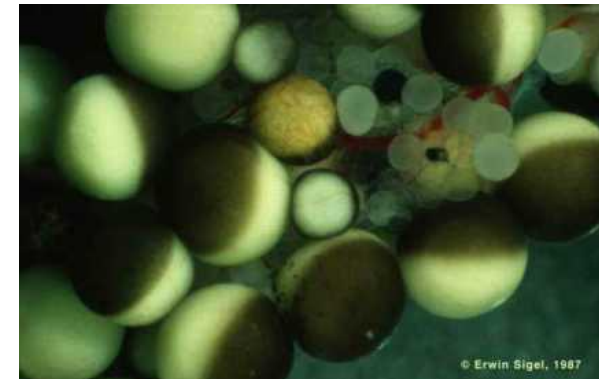
- Skleněné nebo plastové nádoby, výška aspoň 30cm
- voda - dechlorovaná nebo přírodní
 - výška hladiny 7-14cm
 - teplota $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} \leq 7$
 - provzdušňování u mladých jedinců
- Fotoperioda 12h den/12h noc
- Krmení 2-3krát týdně, následně výměna vody
 - směs mletého hovězího masa (játra, srdce, plíce)
 - doplnění o vitanímy

Průběh testu

Pracovní postup I

- **Před založením testu**

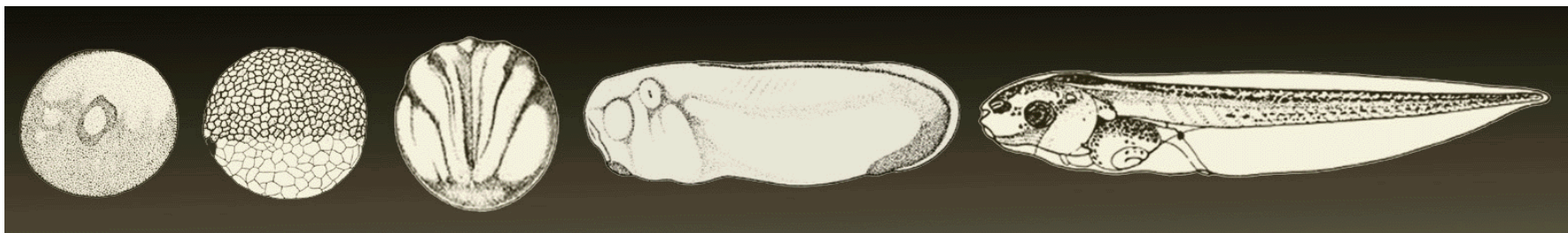
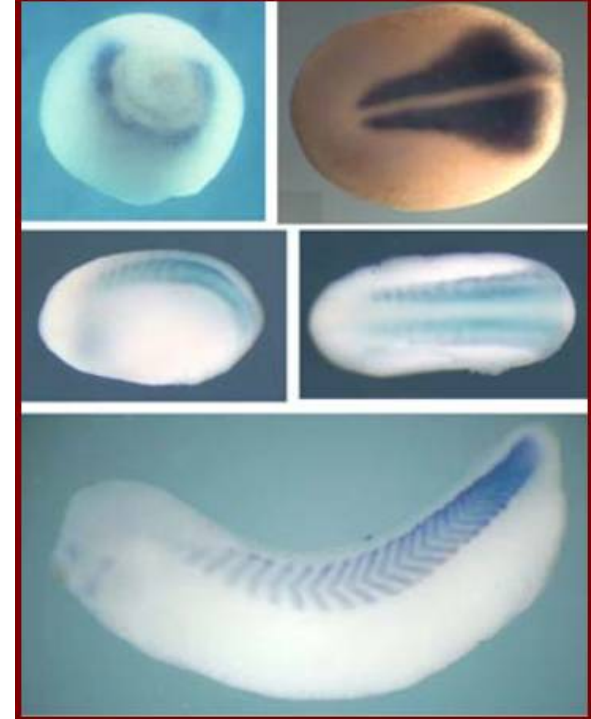
- výběr vhodného páru žab
- stimulace rodičovského páru hormonem choriogonadotropinem (HCG, den před snůškou) injekčně do hřbetního lymfatického vaku samice 500-1000 IU, samec 250-500 IU
- následná stimulace stejného jedince nejdříve po 90 dnech
- pár do samostatné nádrže – provzdušnění, teplota vody $21 \pm 2^\circ\text{C}$
- amplexus po 2-6h -> tvorba vajíček a oplození
- kladení vajíček po 9-12h od injekce
- výběr oplozených vajíček - do testu vybíráme vajíčka kulatého tvaru, nakladena jednotlivě
- co nejkvalitnější, oplozená
- dobrá snůška: $\geq 75\%$ oplozených vajíček



Pracovní postup II

Založení testu

- 5 h po fertilizaci, nutné před započítím neurulace
- do Petriho misek po 20-25 oplozených vajíčkách + 10ml FETAX média + testovaná látka
- expozice různým koncentracím testovaných látek v standardním FETAX médiu: koncentrační řada, každá koncentrace ≥ 2 misky
negativní kontrola ≥ 4 misky
pozitivní kontrola: 6-aminonicotinamid
all-trans retinová kyselina (ATRA)

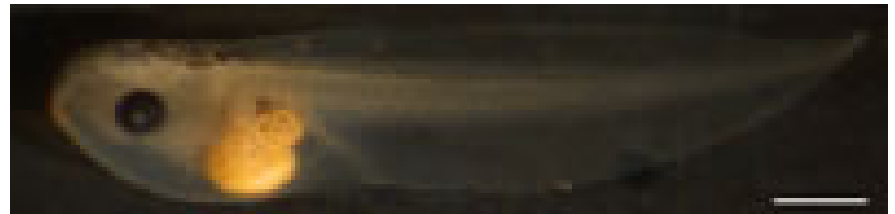


Pracovní postup III

- **Průběh testu**

- teplota $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ (nižší zpomalí vývoj, vyšší znásobí výskyt malformací), uložení do inkubátoru
- pH 7,7 (reálně mezi pH 6,5 a pH 9,0)
- náhodné uspořádání misek v prostoru
- výměna expozičních roztoků/média a odběr uhynulých embryí po 24, 48, 72 hodinách
- ukončení testu po 96h, 90% embryí by mělo dosáhnout 46.stádia vývoje

- fixace embryí ve 3% formaldehydu
- vyhodnocení pod mikroskopem
- sledování počtu a délky přežívajících jedinců a výskyt malformací



46.stádium

Vyhodnocení testu

po expozici standardně hodnocení embryotoxicity a teratogenity zkoumané látky:

letalita po 96h (**LC₅₀** - koncentrace způsobující 50% úhyn embryí)

% morfologických změn - malformací po 96 hod (**EC₅₀** - koncentrace způsobující malformace u 50% embryí)

inhibice růstu (**MCIG**) – minimální koncentrace způsobující inhibici růstu



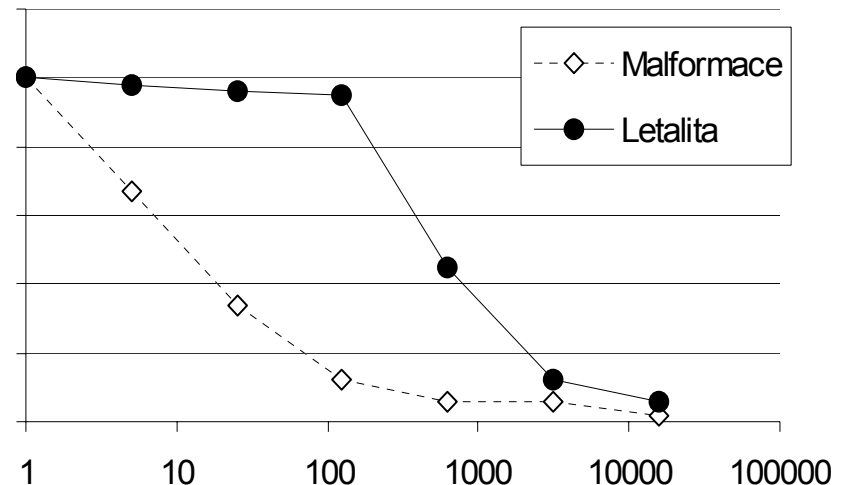
- **Index teratogenity** = hodnota podílu 96h LC₅₀ a 96h EC₅₀

$$TI = LC_{50} / EC_{50}$$

- **TI > 1,5 indikace teratogenního potenciálu**

Další parametry:

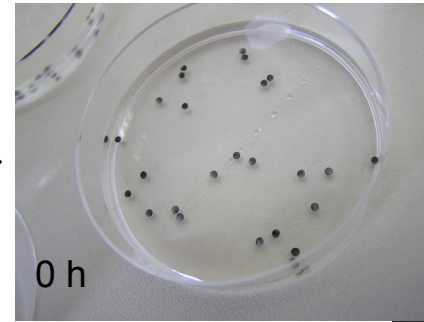
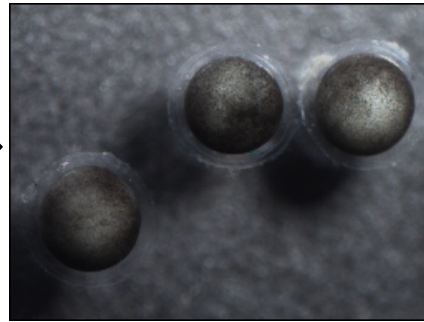
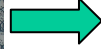
- zpomalení vývoje
- inhibice růstu
- malformace orgánů
- biochemické markery
- změny chování



Hormonální stimulace dospělého páru

DESIGN TESTU

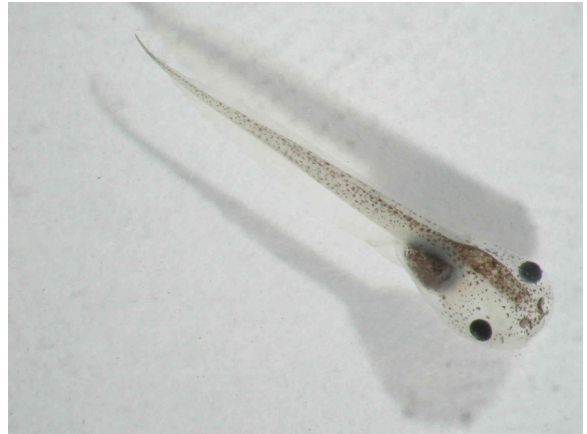
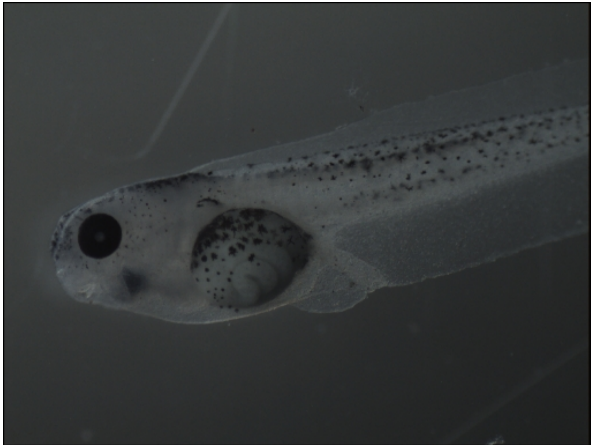
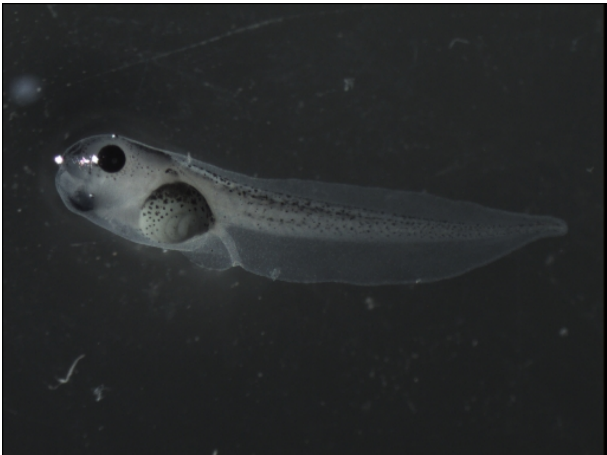
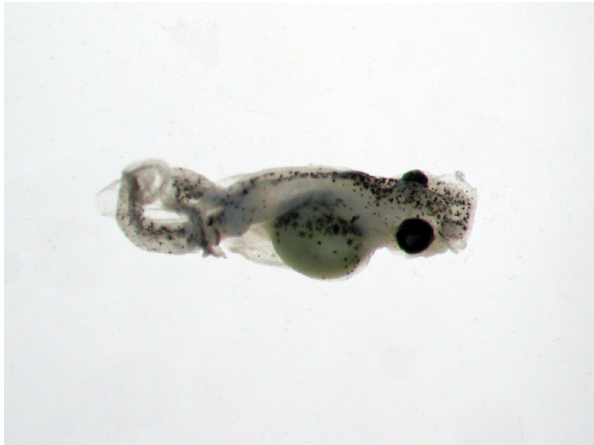
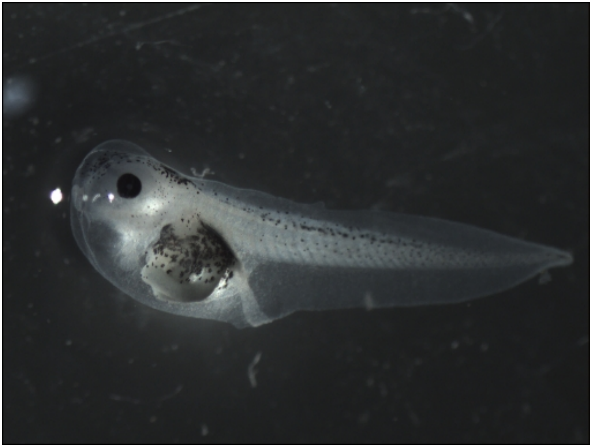
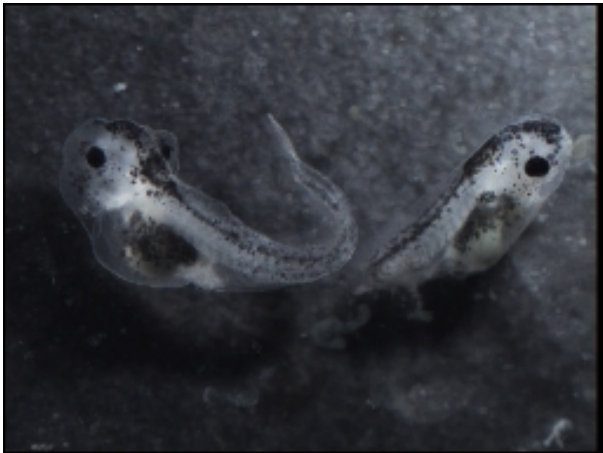
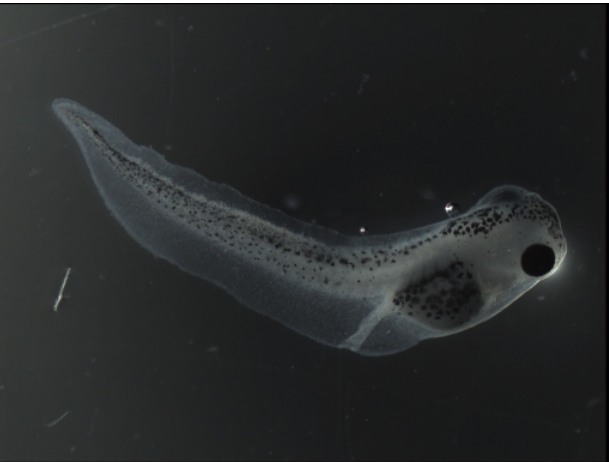
↳ amplexus → oplozená vajíčka – nasazení do Petriho misek



↳ fixace v 3 % formaldehydu → hodnocení malformací, měření délky embryí



↳ zamražení na -80°C → tkáňový homogenát pulců použit pro biochemická stanovení



ASTM Int'l Amphibian Toxicity Test - ASTM E2591-07 - Guide for Conducting Whole Sediment Toxicity Tests with Amphibians

- hodnocení sedimentů a podmáčených půd (mokřady) z potenciálně kontaminovaných lokalit, kde jsou obojživelníci důležitými druhy
- měří účinky biodostupné frakce
- Nasazení čerstvě nalíhnutí pulci skokanů *Rana pipiens*, *R. sylvatica* (stadium 23-25), možno i drápatka
- larvy krmeny
- 10 d kontaktní test se sedimentem
- 300 ml kádinky – 100 ml sedimentu, 175 ml vody
- Sledované parametry: přežívání, růst - subletální parametry (délka, šířka těla)

AMPHITOX

soubor toxikologických testů k odhadu rizik letálních a subletálních účinků testované látky pro obojživelníky (Herkovits et Pérez-Coll, 2003).

Modelový organizmus - vývojová stádia ropuchy *Bufo arenarum*.

AMPHITOX zahrnuje:

akutní test toxicity (AMPHIACU)

chronický test toxicity (AMPHICRON)

test na časných vývojových stádiích (AMPHIEMB)

Výsledné hodnoty : LC50, NOEC (nejvyšší koncentrace testované látky, která nezpůsobila žádné pozorovatelné účinky) a TI (teratogenní index).

Výhoda testu AMPHITOX : umožňuje přesně stanovit období, ve kterém vykazuje testovaná látka nejsilnější účinky na modelový organizmus.

Testy genotoxicity

MN – test a Jayletův test

- Metody pro zjišťování genotoxicity xenobiotik pomocí obojživelníků : Xenopus Mikronucleus Assay (MN–test) a Jayletův test (Békaert et al., 1999; Zoll-Moreux et Ferrier, 1999).
- Princip: sledování zvýšeného počtu mikrojadra v erytrocytech u larev po expozici látkám s potencionálním genotoxickým účinkem.
- Testy se liší použitým druhem modelového organismu. MN–test pracuje s larvami drápatky vodní (*Xenopus laevis*), Jayletův test je upraven pro použití larev ocasatých obojživelníků – žebrovníka (*Pleurodeles waltl*) nebo axolotla (*Ambystoma mexicanum*).
- Jayletův test na ocasatých obojživelnících se ve Francii využívá jako standardní metoda pro určování genotoxicity látek a je zpracován do podoby metodiky French Standard NF (AFNOR T90-325, 1992).
- MN–test s drápatkami má stejnou senzitivitu jako Jayletův test na ocasatých obojživelnících a tudíž jsou oba testy vhodné pro posuzování genotoxicity.



Testy odhalující narušení endokrinního systému obojživelníků

Endokrinní disruptory (ED's) jsou xenobiotika narušující endokrinní systém živočichů.

U obojživelníků působí ED's na několika úrovních:

- v embryonálním a larválním období,
- při metamorfóze
- v období diferenciaci gonád,
- v období sekundární pohlavní diferenciaci a
- v dospělosti (narušením fyziologického chování)

Následkem předčasné metamorfózy vznikají extrémně malí jedinci, neschopní reagovat na změny přírodních podmínek, s omezenou možností žít se větší potravou a s nízkými energetickými rezervami. Některé ED's ovlivňují regulační systém pohlavních steroidů. Pokud takové ED's působí na populaci larev v období vývoje gonád, dochází ke změně poměru pohlaví.

Testy endokrinní disrupce obojživelníků

Testy metamorfózy a vývoje

Cíl: prokázat, zda zkoumaná látka ovlivňuje rychlost metamorfózy.

Čtrnáctidenní test metamorfózy

- dle metodiky U. S. EPA Endocrine Disruptor Screening and Testing Committee (EDSTAC) T I. – *Frog metamorphosis assay* (Federal Register, 1998).

- obdobný test **Metamorphosis Climax Assay** (OECD 46, 2004).

Do testu jsou nasazeny larvy drápatky vodní (*Xenopus laevis*) ve vývojovém stadiu 60, tzn. těsně před dosažením metamorfózy.

Larvy jsou po celou dobu testu (14 dnů) vystaveny expozici zkoumané látky.

Sledované parametry: stádium vývoje a průběh metamorfózy.

Doplňkové údaje: výška ocasního lemu, délka ocásku, těla a pánevních končetin.

Výsledek testu: hodnota IC_{50} , což je koncentrace testované látky, která způsobí u 50 % larev inhibici metamorfózy.

Testy endokrinní disrupce obojživelníků

Testy metamorfózy a vývoje

Sedmdesátidenní test metamorfózy

- Výhoda: prodloužená expozice larev zkoumané látky, lépe simulující přírodní podmínky
- embrya nasazena do testu ve stádiu střední blastuly až časně gastruly, medium FETAX
- embrya nejprve umístěna v objemu 100 ml media, pátý den přemístěna do skleněných akvárií do objemu 8 litrů testované látky
- každých 72 hodin výměna 50% expozičního média
- od pátého dne larvy denně krmeny
- 12ti hodinová fotoperioda a teplota vody $24\pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Sledovány teplota, kyslík a pH, množství amoniaku.
- Po 70ti dnech ukončení - stanoveno vývojové stádium
- **Sledované parametry:** stádium vývoje a průběh metamorfózy.
- **Doplňkové údaje:** výška ocasního lemu, délka ocásku, těla a pánevních končetin.
- **Výsledek testu:** 5 d LC50, 70 d LC50, IC50 (koncentrace testované látky, která způsobí u 50 % larev inhibici metamorfózy).

Testy endokrinní disrupce obojživelníků

Xenopus metamorphosis Assay (XEMA)

- OECD test guideline draft (2008)
- pro testování endokrinní disrupce
- do testu se nasazují pulci drápatek ve vývojovém stádiu 48-50.
- Pozitivní kontrola hormon tyroxin (T4).
- Po 28 dnech vyhodnocena celková tělesná délka larev, délka ocásků a dosažená vývojová stádia.

Xenopus Limb Bud Assay (OECD 46, 2004)

- screeningový test pro látky, které mohou vyvolat abnormální vývoj končetin zkoumané látce jsou vystavena embrya drápatky od stádia blastuly.
- délka testu se řídí rychlostí vývoje pánevních končetin (v rozmezí 45 až 60 dní).
- Posuzuje se výskyt malformací pánevních končetin a přežití larev.
- Doplnujícím vyšetřením může být ještě histologické vyšetření štítné žlázy

**Kontaminovaná
lokalita**

**Referenční
Lokalita**



Zadní končetina



Zadní k.

***Rana catesbeiana*, American bullfrog**

Photo courtesy of Dr. James Carr

Testy endokrinní disrupce obojživelníků

Sledování sexuálního vývoje

- Vlivem ED's dochází k poruchám vývoje gonád – mění se poměr počtu samců a samic a také se objevuje intersex – tzn. současná přítomnost ovarií i testes u jednoho jedince
- Larvy drápatky *Xenopus laevis* jsou od stáří pěti dnů vystaveny působení testované látky.
- Pozitivní kontrola 17 β -estradiol a dihydrotestosteron.
- Po ukončení metamorfózy (po 78 dnech) se u každého jedince provádí histologické vyšetření gonád a svalu *m. dilatator laryngis* - jeho velikost patří mezi druhotné pohlavní znaky u drápatky vodní. U samců je tento sval vyvinut mohutněji. Při působení xenobiotik s androgenními účinky se *m. dilatator laryngis* zvětšuje.

Většina obojživelníků je chráněna = omezené využití pro výzkum a EB... registrace nových látek.. FETAX, QSAR

Kromě skokana hnědého všichni obojživelníci žijící v České republice chráněni zákonem č. 114/1992 Sb. o ochraně přírody a krajiny a zařazeni na seznam kriticky ohrožených, silně ohrožených nebo ohrožených druhů v příloze III. vyhlášky Ministerstva

životního prostředí č. 395/1992 Sb.





Budoucí směřování?



- **hledání nových modelů nezávislých na přírodě**
- **způsob příjmu a osud toxikantů:** - místa degradace, místa kumulace
- **studium subletálních efektů:** endokrinní disrupce, malformace, imunosuprese
- **jaké jsou důsledky (a interpretace) rozdílnosti indukce CYPs u obojživelníků a savců???**
 - **je nižší indukce obecná, nebo selektivní pro určité látky???**
 - **je to obecný princip vyšší citlivosti na znečištění???**