Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

Ekotoxikologické testy s obojživelníky

Klára Hilscherová
RECETOX- Přírodovědecká fakulta MU Brno

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

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.

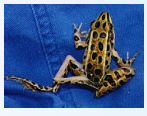
Předpokládané příčiny poklesu počtu obojživelníků v přírodě:

- vyšší citlivost k znečištění prostředí (transdermální přenos)
- změny klimatu a změny mikroprostředí (reprodukce)
- introdukce predátorů
- imise a kyselé 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

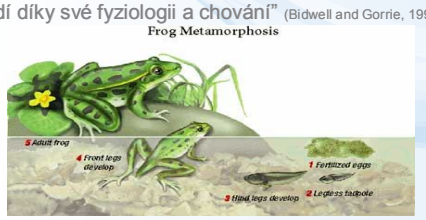
Malformace u obojživelníků
- celosvětový problém, souvisí se snižováním populací obojživelníků (Worldwide Amphibian Decline)
- 44 států USA, Kanada – malformovaní jedinci nalézáni přímo v prostředí (*Rana pipiens, Rana clamitans, Bufo americanus*, …)
- hlavní příčiny – UV-B záření
  - invaze parazity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



You created this PDF from an application that is not licensed to print to novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

Možný důvod: Kontaminanty

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



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

You created this PDF from an application that is not licensed to print to novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

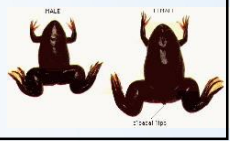
Frog Embryo Teratogenesis Assay: Xenopus (FETAX)

- 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

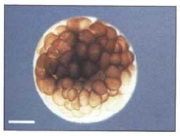
Modelový organismus - drápatka vodní (*Xenopus laevis*)

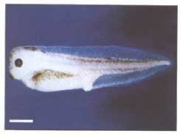
Studium vývojové, buněčné, molekulární biologie, využití v embryologii, fyziologii, toxikologii

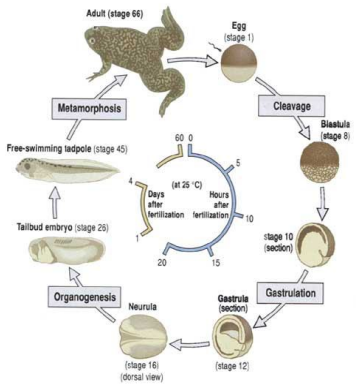
- dobrá znalost normálního vývoje, biologie a biochemie
- po celý život možnost odchovu v laboratoři
- schopné přijímat usmrcenou potravu
- akvatický způsob života larev i dospělců
- dospělci resistentní vůči chorobám
- možnost indukovaného získání embryí nezávisle na ročním období
- průhlednost larev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



Xenopus life cycle







Laboratorní chov

- Skleněné nebo plastové nádoby, výška aspoň 30cm
- voda - dechlorovaná nebo přírodní
  - výška hladiny 7-14cm
  - teplota 23±3°C, pH ≤ 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 vitamíny

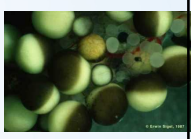
Průběh testu

Pracovní postup I

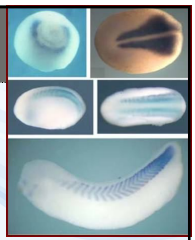
- ***Před založením testu***

- 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±2°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: ≥ 75% oplozených vajíček



Pracovní postup II



Založení testu

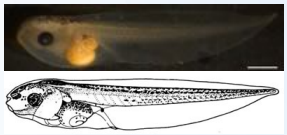
- 5 h po fertilizaci, nutné před započetím neurulace
- do Petriho misek po 20-25 oplozených vajíčkách + 10ml FETAX média + testovaná látka
- expozice různým koncentracím testovaných látek v standardním FETAX médiu: koncentrační řada, každá koncentrace ≥ 2misky
  negativní kontrola ≥ 4 misky
  pozitivní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

You created this PDF from an application that is not licensed to print to novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

Pracovní postup III

- ***Průběh testu***
  - teplota 24±2°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



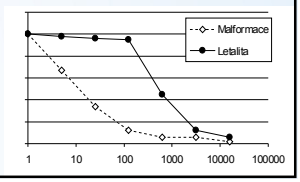
46.stádium

Vyhodnocení testu

po expozici standardně hodnocení embryotoxicity a teratogenity zkoumané látky:
letalita po 96h (**LC_{50}** - koncentrace způsobující 50% úhyn embryí)
% morfologických změn - malformací po 96 hod (**EC_{50}** - koncentrace způsobující malformace u 50% embryí)
inhibice růstu (**MCIG**) – minimální koncentrace způsobující inhibici růstu

- **Index teratogenity =** hodnota podílu 96h LC_{50} a 96h EC_{50}
  TI = LC_{50} / EC_{50}
- **TI > 1,5 indikace teratogenního potenciálu**

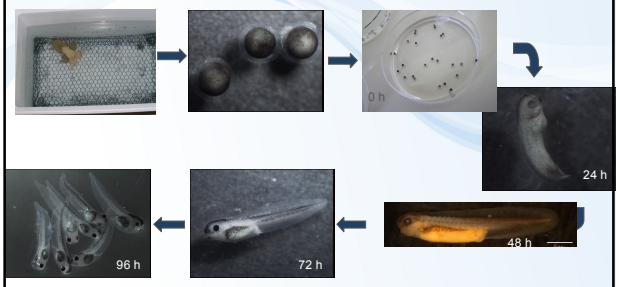
Další parametry:
- zpomalení vývoje
- inhibice růstu
- malformace orgánů
- biochemické markery
- změny chování



Hormonální stimulace dospělého páru

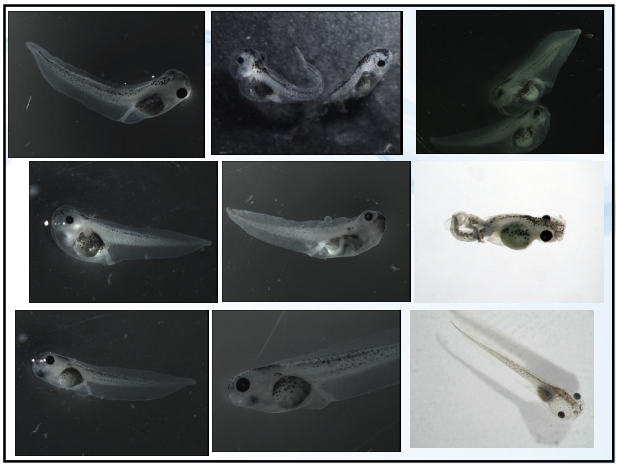
DESIGN TESTU

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
- Nasazeni čerstvě nalíhnutí pulci skokanů *Rana pipiens, R.sylvatika* (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.

You created this PDF from an application that is not licensed to print to novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

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 mikrojader v erytrocytech u larev po expozici látkám s potencionálním genotoxickým účinkem.
- Testy se liší použitým druhem modelového organizmu. 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 diferenciace gonád,
- v období sekundární pohlavní diferenciace a
- v dospělosti (narušením fyziologického chování)

Následkem předčasné metamorfózy vznikají extrémně malí jedinci, neschopní reagovat na změny přírodních podmínek, s omezenou možností živit 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 látce, lépe simulující přírodní podmínky
- embrya nasazena do testu ve stádiu střední blastuly až časné 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±2°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

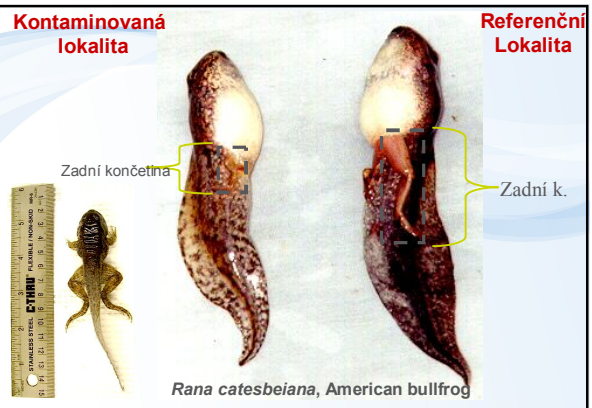
***Xenopus* metamorphosis Assay (XEMA)**

- 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.
- Doplňujícím vyšetřením může být ještě histologické vyšetření štítné žlázy

Kontaminovaná lokalita | **Referenční Lokalita**



Rana catesbeiana, American bullfrog

Photo courtesy of Dr. James Carr

You created this PDF from an application that is not licensed to print to novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

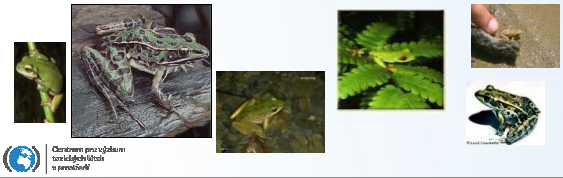
Testy endokrinní disrupce obojživelníků

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 látce.
- Pozitivní kontrola 17β-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???**

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

You created this PDF from an application that is not licensed to print to novaPDF printer (http://www.novapdf.com)