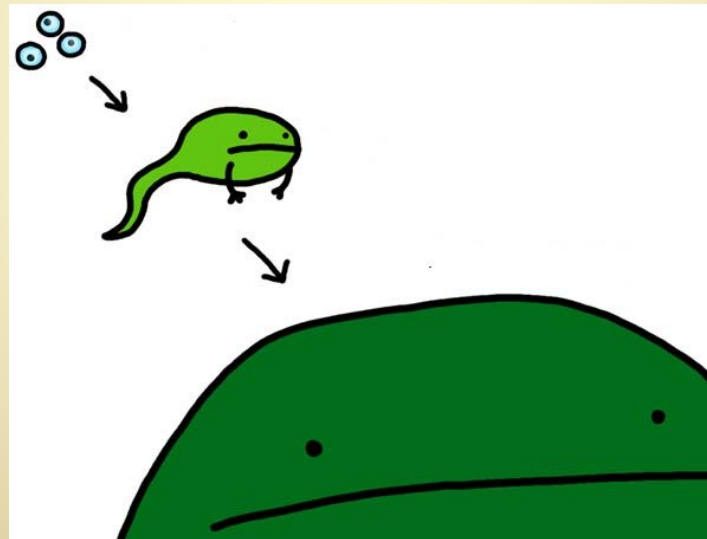


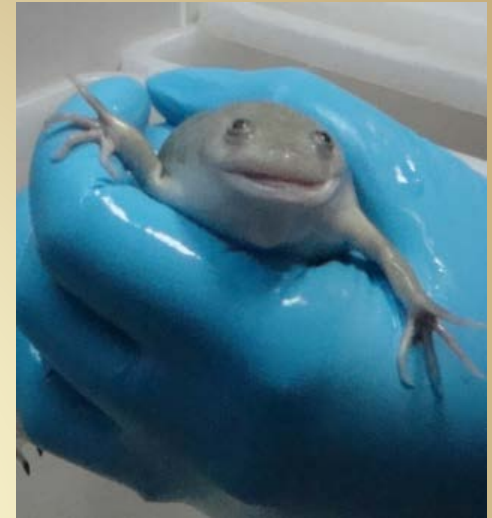
FETAX

Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus



Jitka Johnová - Alena Nekvapilová

- Akutní semistatický test embryotoxicity a teratogenity
- Využití embryí drápatky vodní (*Xenopus Laevis*)



- Test standardizovaný ASTM (*American Society for Testing and Materials*) – norma **ASTM E 1439-98**
- Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – *Xenopus*

Xenopus laevis

- Tradiční modelový organismus
– známá ontogeneze
- Výhradně akvatický druh
- Možnost
indukovat rozmnožování
- Nenáročný laboratorní chov
- Přirozený výskyt v Africe,
karnivorní predátoři (hmyz, korýši, ryby)





Sexuální dimorfismus u *Xenopus laevis*

Příprava na test

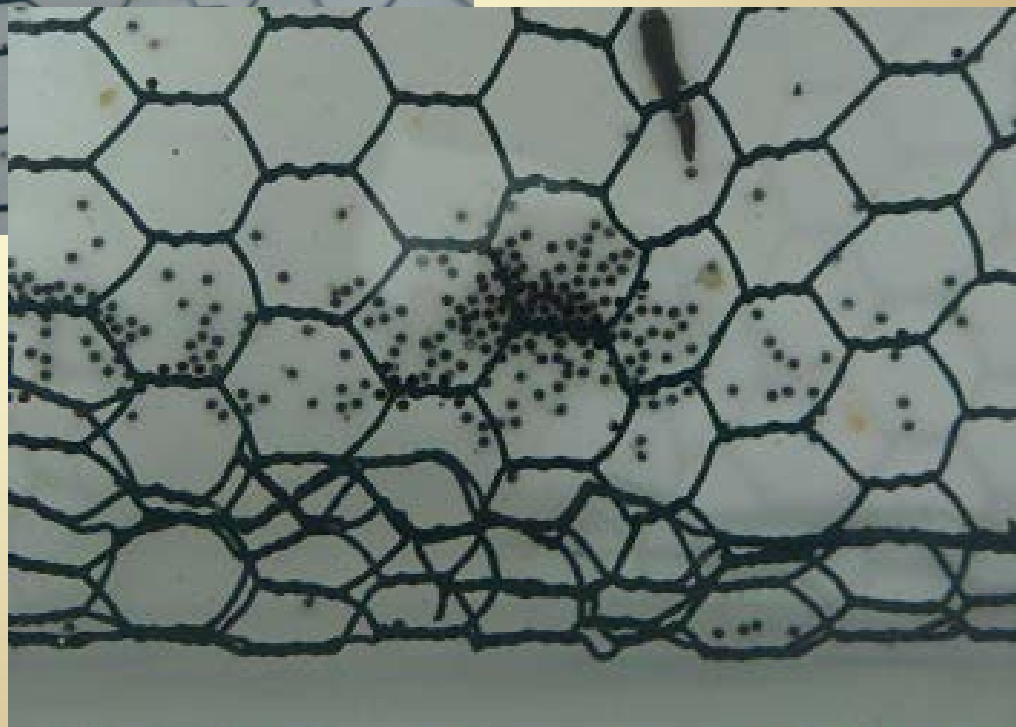
- Výběr vhodného páru (dospělí, min. 3 měsíce bez páření)
- Stimulace **choriogonadotropinem** do hřbetního lymfatického vaku (Pregnyl 5000)
- Umístění do pářicí kádě – FETAX médium, mřížka, termostat na 21-23 stupňů)
- Po 12 hodinách dochází ke kladení **500 – 2000 vajíček**

FETAX médium

Látka	Na 1,5L (20x konc)
NaCl	18,75 g
NaKCO ₃	2,88 g
KCl	0,9 g
CaCl ₂	0,45 g
CaSO ₄ .2H ₂ O	1,8 g
MgSO ₄	2,25 g



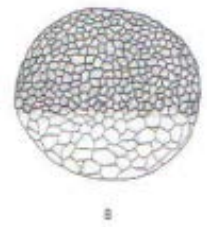
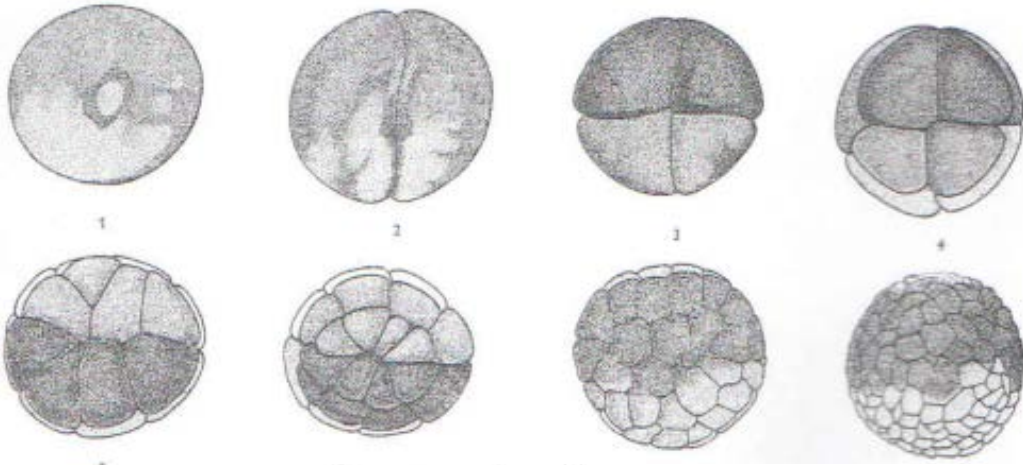
Amplexus



Snůška vajíček

Příprava na test II

- Vybrat kvalitní, oplodněná vajíčka (kulatý tvar, černý a bílý pól)
- Připravit koncentrační řadu testované látky, pro každou koncentraci **3 opakování** – každé opakování s vajíčky od jiného páru
- **5 hodin po oplodnění** (do ukončení stádia gastruly) přenést 25 vajíček na Petriho misku spolu s 10 ml FETAX média (**pH 7 – 7,6**) a testovanou látkou
- Negativní kontrola = FETAX médium, pozitivní kontrola teratogen **6 - aminonikotinamid**



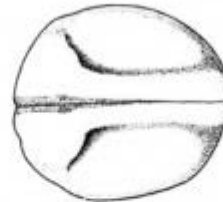
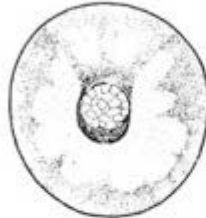
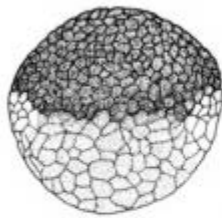
Xenopus laevis

Blastula

Gastrula

Neurula

Tadpole



NF9

NF12

NF18

NF37

7 hpf

13 hpf

20 hpf

53 hpf

hpf = hours post fertilization



17

18

19

15

13

14

XVIII. Tabuľka vývojových štádií *Xenopus laevis*

Expozice

- 96 hodin – do 46. vývojového stádia embryí
- Teplota 21 stupňů, denní světlo, pH expozičního roztoku 6,5 - 9
- Semistatický test - každých 24 hodin výměna média a odstranění uhynulých embryí
- Larvy se nekrmí
- Ukončení testu – fixace 3% roztokem formaldehydu



Vyhodnocení

- Pomocí binokuláru a mikroskopu se analyzuje délka těl larev a výskyt malformací (podle *Atlas of Abnormalities – A Guide for the Performance of FETAX*, Bantle et al. 1996)



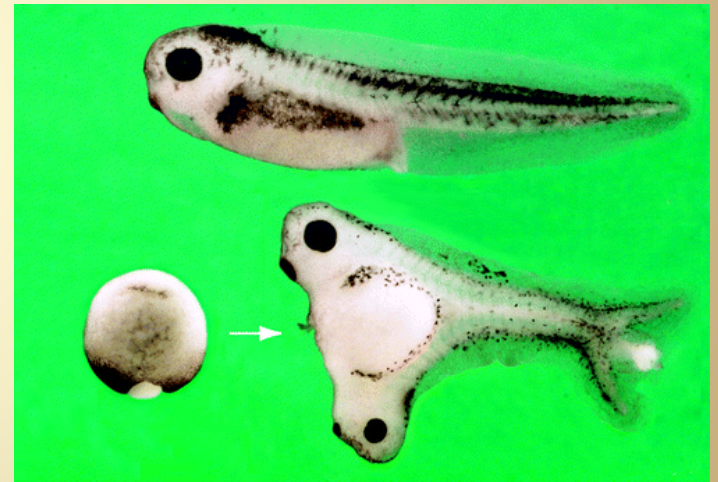
Vyhodnocení II

Standardní výstup dat:

- LC_{50} - koncentrace způsobující 50% úhyn embryí (případně LC_{10} , LC_{90} a jiné)
- EC_{50} - koncentrace způsobující malformace u 50% embryí (případně EC_{10} , EC_{90} a jiné)
- teratogenní index TI - hodnota podílu 96h LC_{50} a 96h EC_{50}
- MCIG - minimální koncentrace způsobující inhibici růstu (porovnání délky embrya (hlava-ocas) oproti kontrole)
- hodnocení vzniklých malformací (malformace vnitřních orgánů, očí, mozku; výskyt edémů; abnormální zakřivení páteře)

Teratogenní index

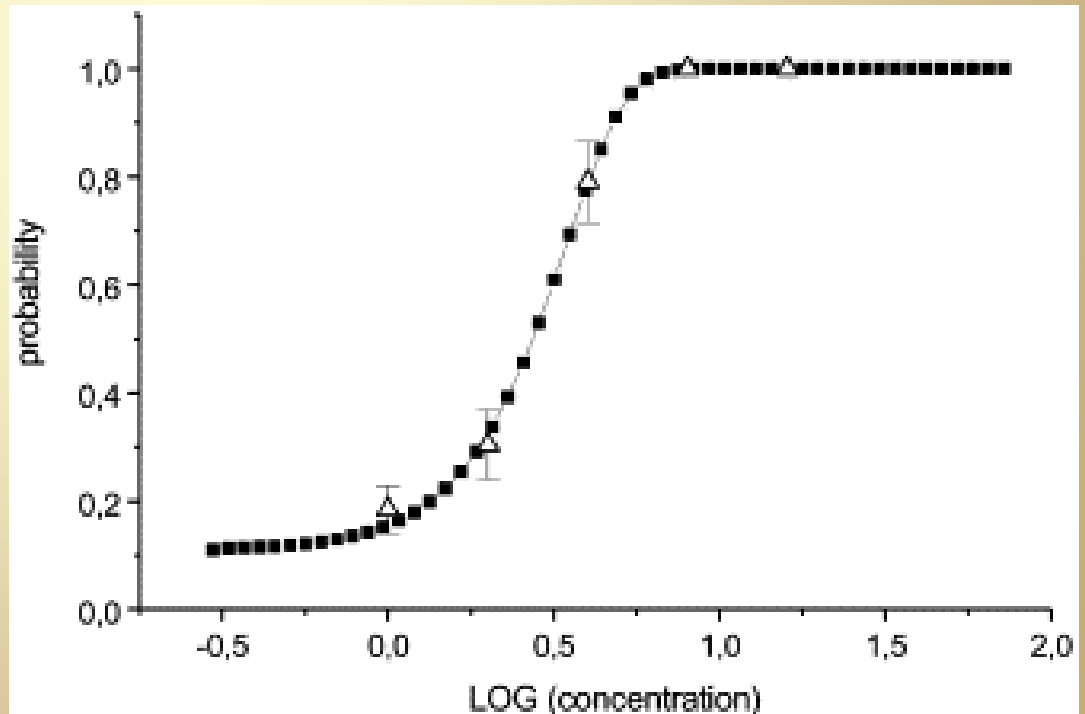
- $TI = LC_{50}/EC_{50}$
- hodnocení potenciálu látky způsobit teratogenní poškození
- $TI < 1,5$ = neteratogenní látka
- $3 < TI$ = silně teratogenní látka
- Čím vyšší TI a nižší MCIG, tím silnější teratogen



Hodnocení dat

- stanovení účinků expozice testovaných vzorků na inhibici růstu ve srovnání s negativní kontrolou = analýza rozptylu (ANOVA), Dunnet's test

- Hodnocení LC a EC – statistická probit analýza



FETAX - shrnutí

- Akutní, semistatický
- Ekotoxicita, embryotoxicita, teratogenita
- Čisté látky, směsi, vody, výluhy, sedimenty

+ Rychlý
+ Dobře standardizovaný
+ Snadný chov
testovacího organismu
+ Levný

- Pro naše prostředí
málo relevantní druh
(alternativně
Rana pipiens, *Bufo Americanus*)

