

Biotest med *Acartia tonsa*

**- screening af hormonlignende og andre
specifikt toksiske stoffer -**

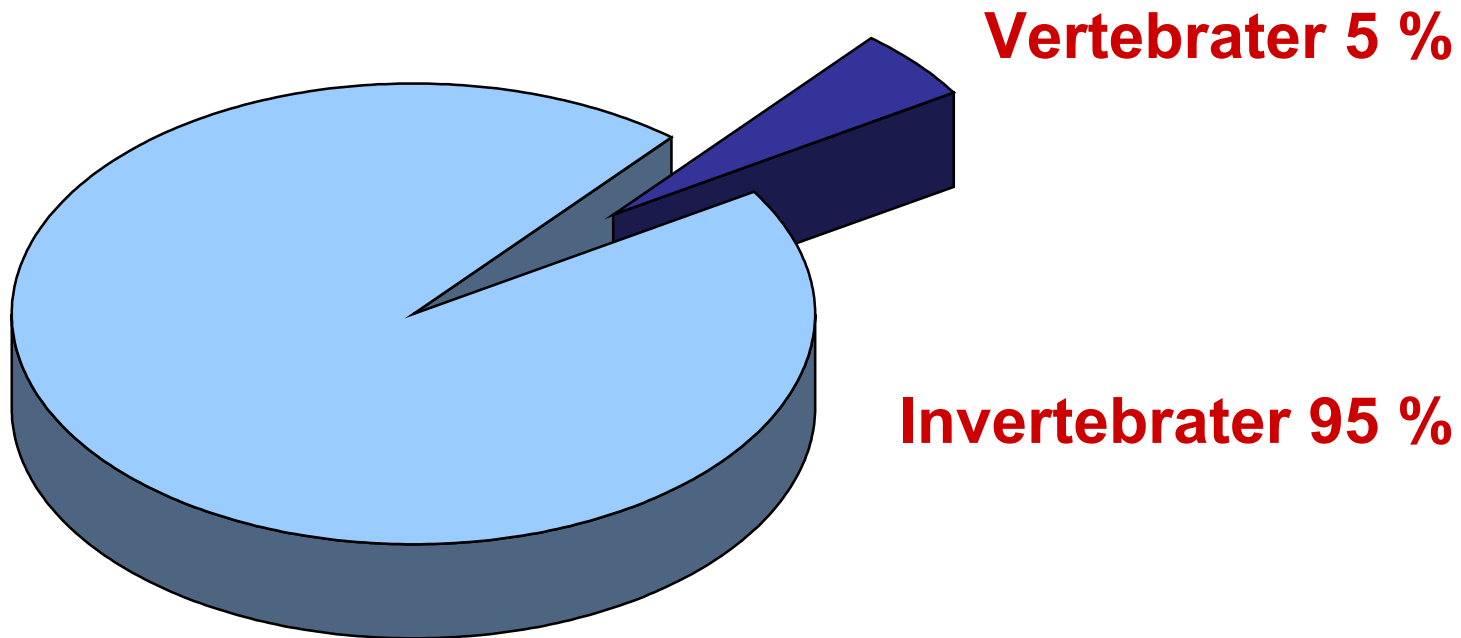
Leah Wollenberger, Jane Bergstrøm og K. Ole Kusk

**Miljø & Ressourcer DTU
Danmarks Tekniske Universitet**

Samarbejde med:

**Henrik R. Andersen og Bent Halling-Sørensen, Danmarks Farmaceutiske Højskole
Magnus Breitholtz og Bengt-Erik Bengtsson, Stockholms Universitet, Sverige
Laurence Dinan, Exeter University, United Kingdom**

Fordeling af dyrearter



Formål:

Udvikling af en biotest med copepoder til screening af kemikalier med specifikt toksiske effekter, f.eks. hormonlignende stoffer

- **Identifikation af testparameter, som er relateret til udvikling og reproduktion i krebsdyr og som er sensitive overfor hormonlignende stoffer**
- **Udvikling af en screening test, der anvender disse testparameter**

Acartia tonsa



hun

han

Acartia tonsa - udvikling



Copepodit

Nauplius

12 stadier

6 nauplius-stadier

6 copepodit-stadier

Hver overgang mellem stadierne er knyttet til en hudskifte.

Endokrin regulering af hudskifte

Tre vigtige hormongrupper:

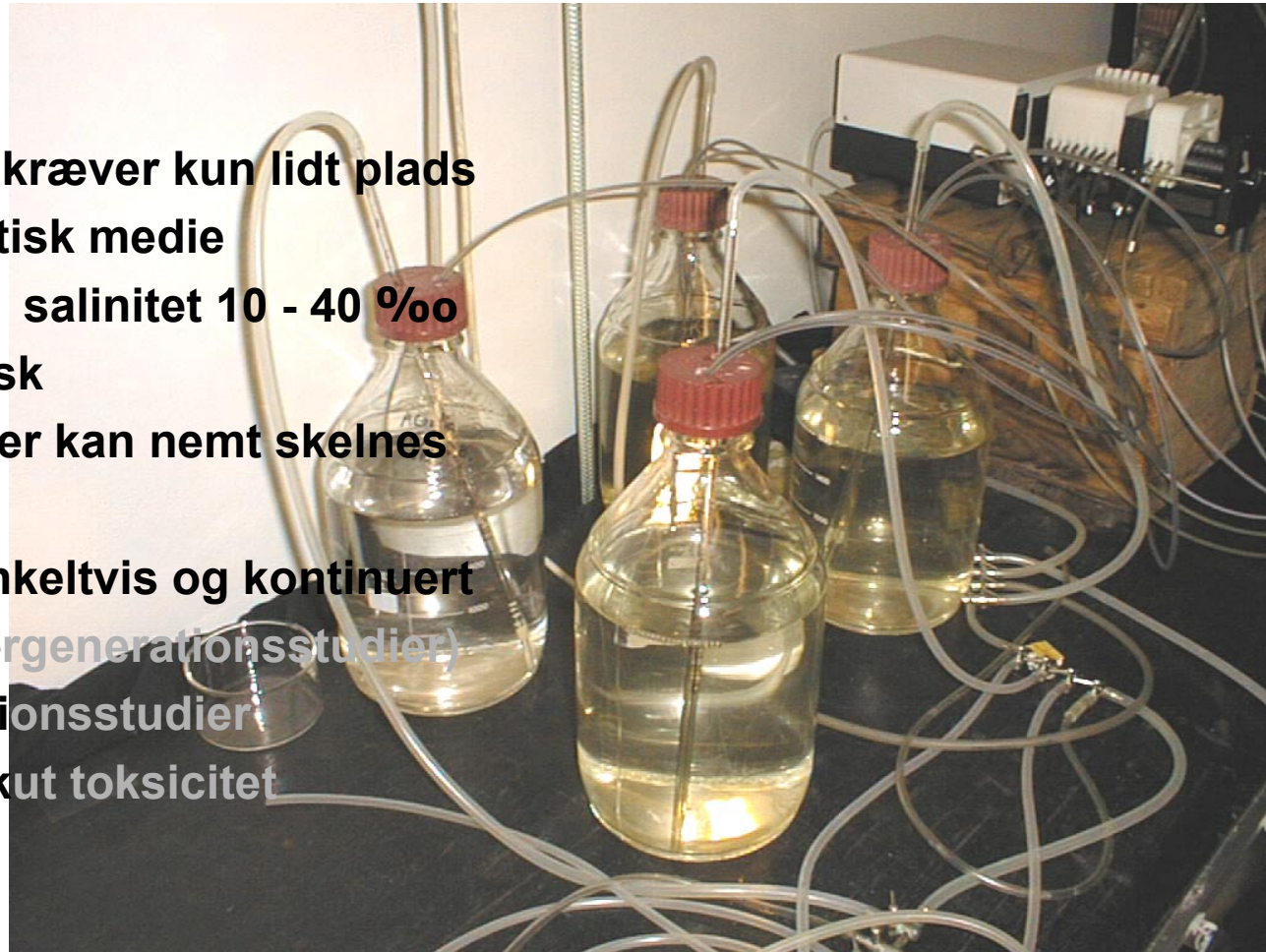
- Ecdysteroider (hudskiftehormon)
- Neuropeptider (overordnet styring)
- Juvenil hormoner (morfologiskift)

Fordele

- Ukompliseret at dyrke, kræver kun lidt plads
- Dyrkbar i et fuldt syntetisk medie
- Tolererer 15 - 23 °C og salinitet 10 - 40 ‰
- Optræder ikke kanibalisk
- Nauplier og copepoditter kan nemt skelnes
- Kønnet reproduktion
- Æg (25-50/d) lægges enkeltvis og kontinuert
- Kort generationstid (flergenerationsstudier)
- Ring størrelse populationsstudier
- ISO-standardmetode akut toksicitet

Ulemper

- På grund af den ringe størrelse (ca. 1 mm) og den lave vægt (tørvægt 5µg/dyr) er *Acartia* uegnet til ekstraktion af steroidhormoner
- Manglende viden om copepoders hormonsystemer



Test parametre

Letal

Generel toksicitet

- Akut effekt (overlevelse) 48 timer LC_{50}
- Æg-klækning og initial larveoverlevelse (3 døgn)

Akut

Hudskifte-hormon- relaterede

- Larveudvikling (5 døgn EC_{50}) og -overlevelse

Subkronisk

Kønshormon-relaterede

- Æg produktion (antal æg/hun * d)
- Kønsdifferentiering (0-14 døgn)
- Kønsmodning målt ved starttidspunkt for æg-produktion

Integrerede hormon-effekter

- Livscyklustest - overlevelse, udvikling, reproduktion (ca. 4 uger)

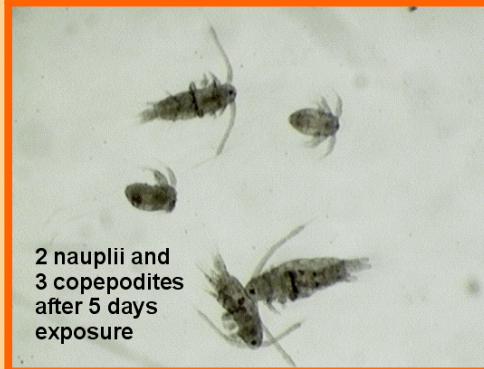
Kronisk

Subletal

Test med *Acartia tonsa*

Larval development test

Eggs produced during 24 h



20 ± 0.5 °C
low light intensity
photoperiod 12 h : 12 h
semistatic, with feeding

Endpoint:

$$\text{LDR} = \frac{\text{number of copepodites}}{\text{nauplii} + \text{copepodites}}$$

Acute toxicity test

Adults aged 14 d



ISO - Standard
 20 ± 0.5 °C
Darkness
Static test, no feeding

Endpoint:

Death

EC₅₀

$$\text{ACR} = \frac{\text{LC}_{50}}{\text{EC}_{50}}$$

LC₅₀

Industrikemikalier og Pesticider med endokrine effekter

- Nonylphenol
- Oktylphenol
- NPEO₁₀
- NPAC
- Bisphenol A
- Vinclozolin
- TBT
- p,p-DDE
- Methoprene
- Fenoxycarb

Reference-stoffer

- Diethylphthalate
- K₂Cr₂O₇
- 3,5 DCP
- 3,4 DCA

Naturlige hormoner

- 17-β-østradiol
- Estron
- Progesteron
- Testosteron
- 20-Hydroxyecdysone
- Ponasterone A
- Juvenile Hormon III

Syntetiske hormoner

- Ethynilestradiol
- DES
- Flutamid
- Hydroxyflutamid
- ICI 182, 780
- Cyproterone acetat
- Tamoxifen

Videre stofgrupper

- Syntetiske moskus stoffer
- Bromerede flammehæmmere

Hvilke stoffer hæmmer larveudviklingen i *A. tonsa* ved subletale koncentrationer?

Kriterium ACR > 10

Tre kategorier af endokrint aktive stoffer

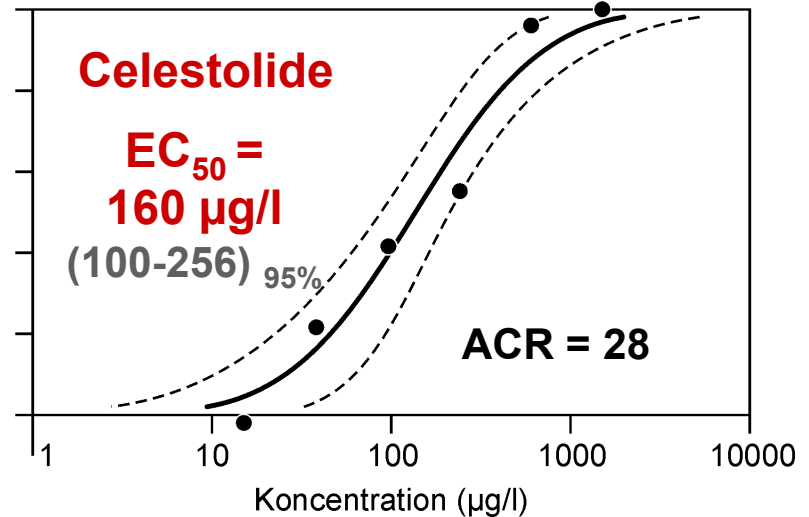
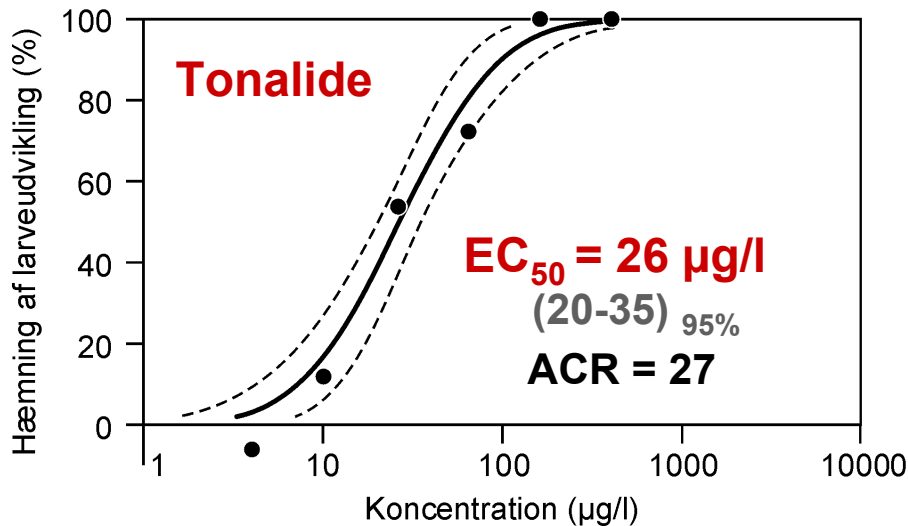
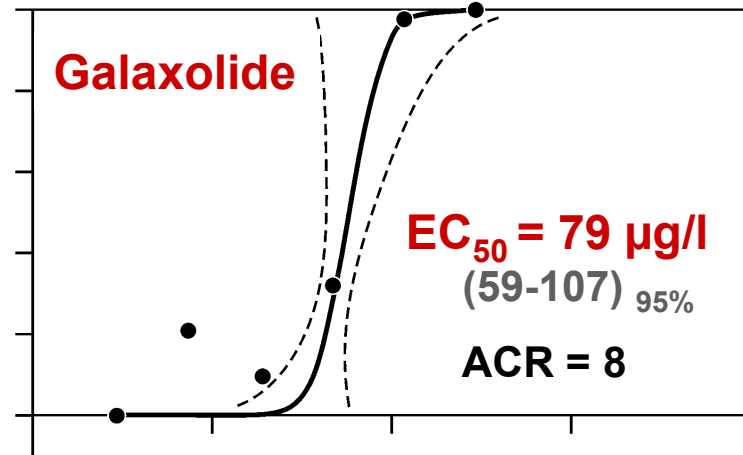
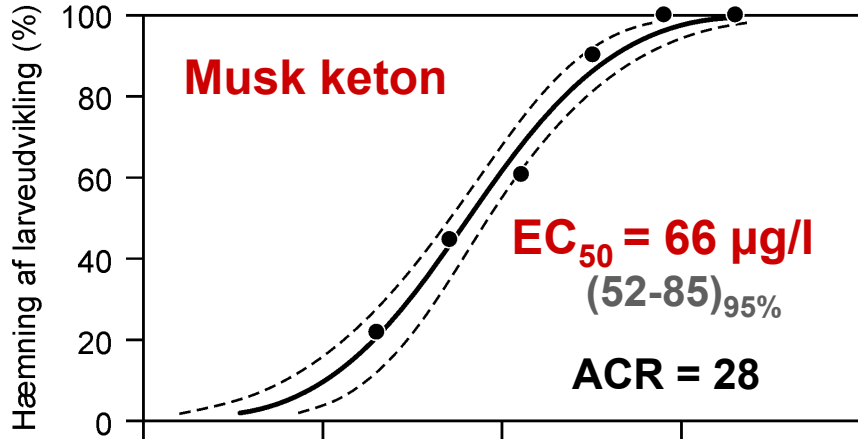
- Xeno-østrogener
- Androgen receptor antagonist
- Juvenil hormoner

Andre stoffer

- 3,4-DCA
- PBDEs
- Syntetiske moskus stoffer

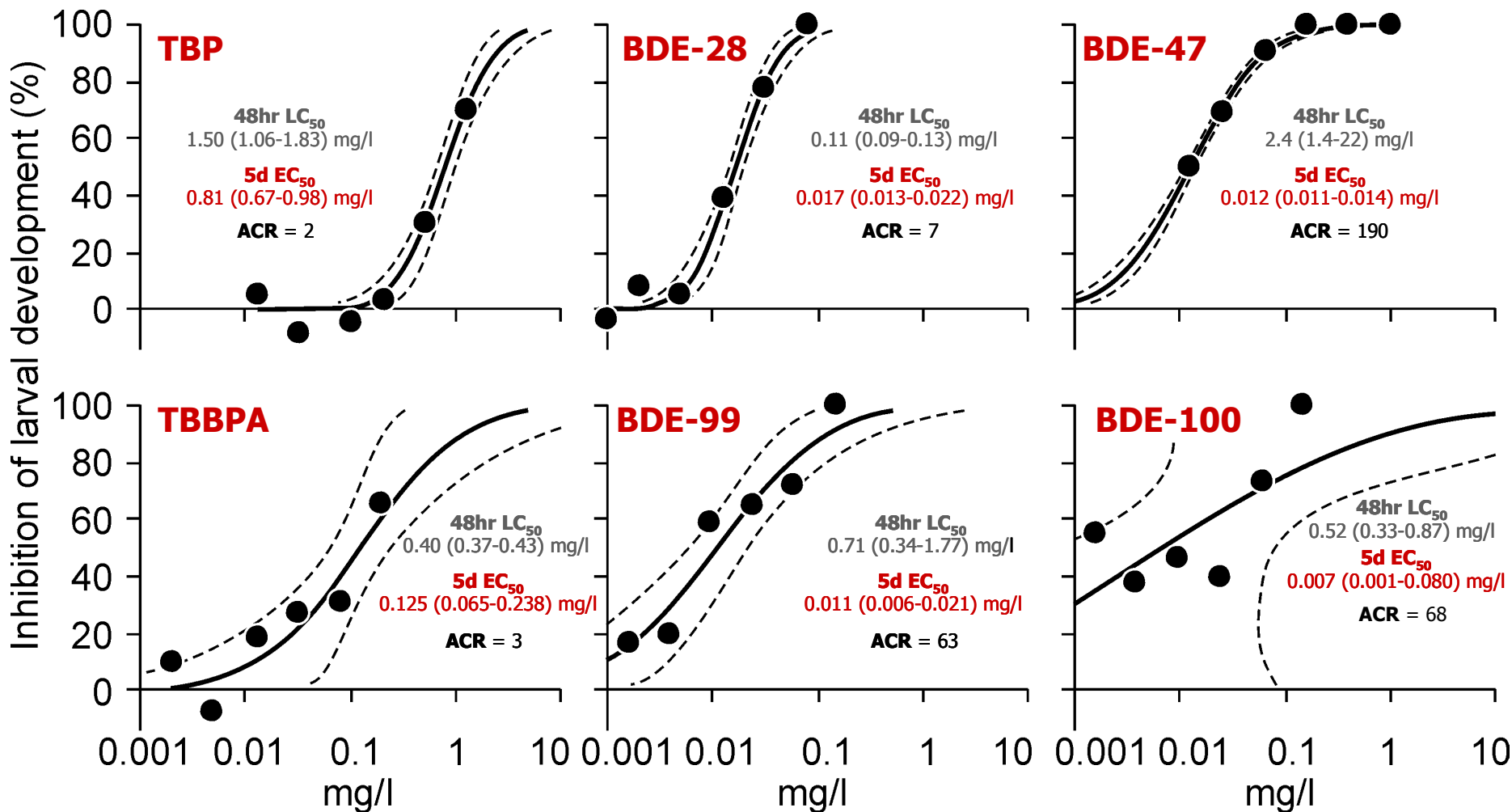
Syntetiske moskus stoffer

Hæmning af larveudviklingen i *A. tonsa*

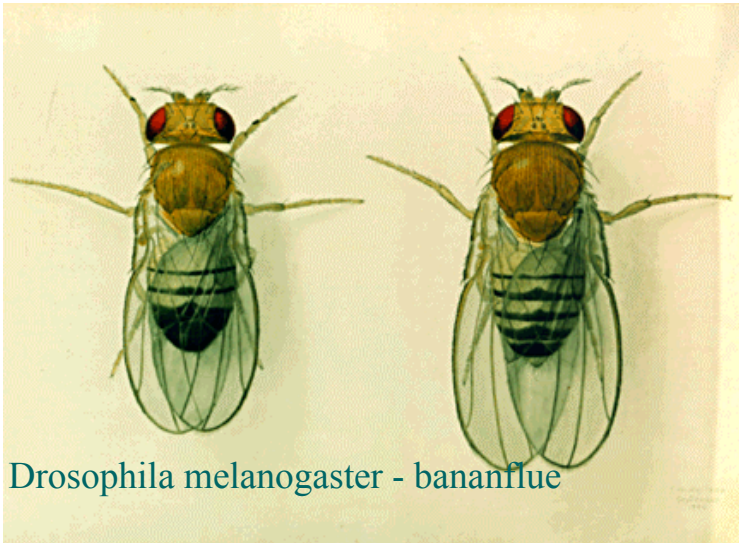


Bromerede Flammehæmmere

Hæmning af larveudvikling i *A. tonsa*



Ecdysteroid aktivitet (1)



Drosophila melanogaster B₁₁-cell line assay
(Laurence Dinan, Exeter University, UK)

in vitro test med ecdysteroid responsive celler

➔ ecdysteroid agonistisk aktivitet

➔ ecdysteroid antagonistisk aktivitet

Ecdysteroider = steroidhormoner, der styrer udvikling og
reproduktion i arthropoder , 20-hydroxyecdysone

Ecdysteroid aktivitet (2)

Eksempel: Bromerede flammehæmmer

Screening af bromerede flammehæmmere for ecdysteroid agonistisk og antagonistisk aktivitet i *Drosophila melanogaster* B_{II} Cell *in vitro* assay.

Kemikalie	Agonist bioassay <i>Ecdysteroid aktivitet</i>	Antagonist bioassay <i>Anti-ecdysteroid aktivitet</i>
Tribromophenol	Nej	Nej
TBBPA	Nej	Nej
BDE-28	Nej	Nej
BDE-47	Nej	Nej
BDE-99	Nej	Ja (svag)
BDE-100	Nej	Ja (svag)
HBCDD	Nej	Nej

Sammenfatning

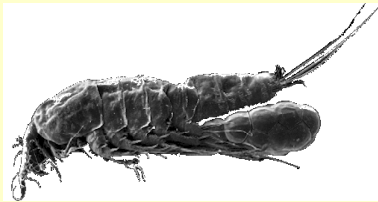
- En let udførbar, hurtig (5 døgn) og følsom biotest for subletale effekter på *A. tonsa* er blevet udviklet på vores laboratorium.
- Forsinket larveudviklingen i *A. tonsa* anses som en velegnet parameter for en præliminær test for kemikalier med specifikt toksiske egenskaber.
- Tre kategorier af endokrin aktive stoffer er potente hæmmere af larveudviklingen i *A. tonsa*: Xeno-østrogener, androgen receptor antagonist og juvenil hormoner.
- Syntetiske moskus stoffer er meget toksisk overfor *A. tonsa* med EC_{50} værdier mellem 25 og 150 $\mu\text{g/l}$.
- BFRs, især PBDEs, er meget toksisk overfor *A. tonsa* med EC_{50} værdier omkring 10 $\mu\text{g/l}$.
- BDE-99 og -100, som var de mest potente BFRs i *Acartia* testen, virker som ecdysteroid agonister og må derfor betragtes som endokrint forstyrrende i invertebrater.

Perspektiv

- Videregående forskning med invertebrater er nødvendig for at opklare den toksiske virkningsmåde af stoffer, for hvilke laboratorieforsøg og feltstudier peger på hormonforstyrrende effekter
- En kombination af in vitro screenings metoder og subkroniske biotests med copepoder kan være et lovende skridt i denne retning.
- Larveudviklingsteten anses at kunne danne grundlag for en subletal standardtestmetode med *A. tonsa*.
- I sammenligning med standardiserede testmetoder med andre krebsdyr er (sub)kroniske toksicitetstests meget følsomme og har derfor et lovende potentiale for anvendelse i risikovurderingen af miljøfremmede stoffer.

Tak for opmærksomheden!

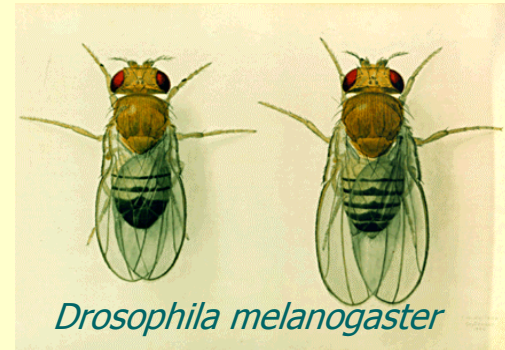
For interesserede: Poster P3.5
Bromerede Flammehæmmere
- Akvatisk Økotoxicitet-



Nitocra spinipes



Acartia tonsa



Drosophila melanogaster