

УДК 611.08

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ПРЕСНОВОДНОЙ РЫБЫ ДАНИО РЕРИО В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

А.В. Зуб, В.Л. Загребин, И.А. Дворяшина, А.В. Терентьев

*ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии*

В статье представлен литературный обзор отечественных и зарубежных исследований, отражающих возможность использования биологической модели *Danio rerio* (Zebrafish, зебрафиш) в доклинических исследованиях. Приведены данные использования биомодели в токсикологии, а также для определения тератогенного и эмбриогенного воздействия токсических веществ, в том числе некоторых лекарственных препаратов, на человека. Описывается использование зебрафиш в моделировании депрессии и стресса, гипо- и гипертиреозного состояния, сахарного диабета и в репродуктивных технологиях. Отмечена доказанная эффективность применения *Danio rerio* в доклинических исследованиях и в моделировании ряда болезней человека. Обобщены данные протеомных исследований белкового состава клеток зебрафиш с возможностью определить токсический эффект на молекулярном уровне.

Ключевые слова: биологическая модель, доклинические исследования, данио рерио, зебрафиш, токсикология.

DOI 10.19163/1994-9480-2020-1(73)-10-13

THE POSSIBILITY OF USING THE BIOLOGICAL MODEL OF FRESHWATER FISH DANIO RERIO IN PRECLINICAL RESEARCH

A.V. Zub, V.L. Zagrebin, I.A. Dvoryashina, A.V. Terentev

*FSBEI HE «Volgograd State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation,
Department of histology, embryology, cytology*

The article presents a literary review of domestic and foreign studies that reflect the possibility of using the biological model of *Danio rerio* (Zebrafish) in preclinical research. Data on the use of the toxicology Biomodel, determination of toxic and teratogenic effects of embryogenic substances, including certain medications, are presented. The use of zebrafish in modeling depression and stress, hypo- and hyperthyroidism, diabetes mellitus and in reproductive technologies is described. The proven effectiveness of the use of *Danio rerio* in preclinical studies and in modeling a number of human diseases is noted. The data of proteomic studies of the protein composition of cells are summarized zebrafish with the ability to determine the toxic effect at the molecular level.

Key words: biological model, preclinical studies, *Danio rerio*, zebrafish, toxicology.

Доклинические исследования – это исследование болезней человека с использованием экспериментальных моделей на животных. Накоплен достаточно большой опыт использования биологических моделей крыс, мышей, собак, кроликов – все они имеют свои плюсы и минусы. Выбор биомодели определяется степенью схожести с организмом человека. Необходимо отметить, что ни одна биологическая модель не может в точности воссоздать модель болезни у человека. Основная цель доклинических исследований направлена на решение лишь некоторых задач: открыть новые свойства вещества, определить токсические свойства действующего вещества и лекарственной формы, изучить фармакологическую активность

действующего вещества. Особую актуальность приобретает использование биологических моделей – менее затратных, информативных, достаточно изученных и описанных.

Danio rerio (Zebrafish, зебрафиш) – сравнительно маленькая, пресноводная тропическая рыбка, имеющая продолговатую форму тела, окрас от светло-серебристого с ярко желтыми полосами, до темно серебристого цвета чешуи с желто-зелеными полосами вдоль тела. Взрослая особь, обитающая в естественных условиях, имеет длину тела до 8 см, выращенная в искусственных условиях – до 5–6 см. Естественным ареалом обитания являются реки и ручьи Индии, Бангладеша, Непала. Рыбка ведет стайный образ жизни, преимущественно

в верхних слоях водоема. Половозрелость наступает в 5–8 месяцев. Продолжительность жизни в неволе до 3 лет, в естественных условиях 5–6 лет. На ранних этапах развития различия между полами незначительны. С 5 месяцев самцы отличаются от самок более вытянутым телом, насыщенным окрасом, а самки имеют округленное брюшко и бледный окрас. Сезонность в размножении не выражена, оптимальными условиями для нереста можно считать параметры: летом от +21 до +25 °С, зимой от +18 до +23 °С, жесткость воды 10, рН от 6 до 7.

В современных доклинических испытаниях большую популярность получает биомедицинская модель тропической рыбки *Danio rerio* (Zebrafish). Детально описанный эмбриогенез: важной особенностью этой биологической модели можно считать прозрачные эмбрионы, которые позволяют изучать тератогенез различных веществ [13]. Быстрые этапы развития – через 3 дня после оплодотворения начинает функционировать сердечно-сосудистая система, нервная система, а на 4-й день образуется половозрелый малек, способный к питанию и передвижению [18].

В связи с нарастающим антропогенным загрязнением водоемов *Danio rerio* получили широкое распространение как тест-система качества очистки водоемов. Описано токсическое воздействие графена на организмы. Графен – это прочный, легкий, электропроводящий материал углеродной модификации. Изучению токсического воздействия этого вещества на организм человека посвящено исследование [23]. В статье описывается морфология повреждения жабер *Danio rerio* при воздействии графена: гиперплазия жабер и начальные проявления некроза. В печени выявлено неравномерное распределение гепатоцитов, с периферическим расположением ядер, начальные проявления некроза.

Для изучения острой токсичности используют эмбрионы, мальки, половозрелых особей *Danio rerio*. Так, в исследовании «Evaluation of Chronic Nanosilver Toxicity to Adult Zebrafish» Roberta Pecoraro [20] говорится о том, что при изучении острой токсичности на рыбках этого вида учитывается только концентрация вещества в воде, а точное количество поглощенного соединения не определяется, следующей особенностью использования этой биомодели в токсикологии, как приоритетной, авторы называют эмбрионы зебрафиш, поглощающие токсические соединения из воды через кожу и жабры, а после 7 суток развития поглощение происходит через рот [15]. Абсорбция, распределение, метаболизм и экскреция веществ только начинают подробно изучаться [5].

Danio rerio активно используется и в качестве биологической модели депрессии и стресса. Методика следующая: рыбок, пребывающих в одной стае, по двое перемещают в другой сосуд. Учитывается

поведенческая особенность этого вида рыб: ведут стайный образ жизни, а при разделении пар или отделении от стаи проявляется тревожное и агрессивное друг к другу поведение, что формирует доминантно-подчинительные отношения. Сначала их помещают в сосуд с фармакологическим препаратом (селективным ингибитором обратного захвата серотонина), а затем переносят в отдельный аквариум, оценивают положение тела в пространстве и траекторию движения в воде, проявление агрессии друг к другу [3, 8]. Проведенное исследование показало, что рыбки могут использоваться в качестве модельного объекта для изучения депрессии, исследование менее затратно по сравнению с применением других экспериментальных животных, а сам эксперимент стресса и депрессии занял неделю.

Заболевания щитовидной железы являются серьезными для всех возрастных групп, особенно для детей. Гипо-гипер-состояния щитовидной железы влекут за собой серьезные заболевания. Блаженко А.А., Качанов Д.А., Прошин С.Н. изучали влияние гипо-гипертиреоидного состояния на развитие личинок рыбок на примере применения пропилтиоурацила (0,5%-я субстанция), L-тироксина (0,1%-я субстанция). Получили следующие данные: летальность личинок и нарушение двигательной активности и кровообращения в группе личинок, подвергшихся воздействию 0,1%-го L-тироксина, составила 50 % (из 18 личинок), в этой группе было большее тератогенное воздействие уже на 2-е сутки, в группе с 0,5%-м пропилтиоурацилом – 25 % (из 18 личинок). Недостаточное, как и избыточное влияние гормонов щитовидной железы оказывает неблагоприятное влияние на состояние и развитие икринок *Danio rerio*, гипертиреоидное состояние сказывается больше на развитии и выживаемости икринок. Сам эксперимент занял всего неделю, что можно считать относительно коротким, но результативным исследованием, по сравнению с другими бимоделями [1].

Широкое применение биомодель зебрафиш получила для исследования и разработки лекарственных препаратов. Приоритетным можно считать изучение токсичности и канцерогенеза на данной биологической модели. В исследовании определялась летальная концентрация для 50 % популяции (LC50) 18 токсичных веществ, в том числе и некоторых лекарственных препаратов. Оказалось, что эмбрионы зебрафиш более чувствительны к токсическому действию, чем млекопитающие [19].

Важным преимуществом использования *Danio rerio* в токсикологии можно считать прозрачные эмбрионы и большую чувствительность к токсическим веществам. В исследовании изучали 12 токсичных соединений на предмет эмбриотоксичности и тератогенного воздействия [20]. При идентификации нетератогенных соединений совпадение наблюдалось в 75 % случаев, а для тератогенных –

в 100 % случаев. При этом эмбрионы могут использоваться как для изучения общей токсичности, так и органотоксического действия. Эти результаты свидетельствуют о единых механизмах действия лекарств на различные органы у зебрафиш и млекопитающих [12].

Эмбрионы рыбок активно используются для изучения ангиогенеза и представляют интерес не только для изучения лекарственных препаратов на сосудистую стенку, но и изучения усиленного ангиогенеза для метастазирования опухоли [22]. Прозрачные эмбрионы могут использоваться для этих целей на живом организме. Сосуды эмбриона могут быть окрашены и изучены посредством микроскопии. Увидеть сосудистую систему можно с помощью флуоресцирующих микросфер, которые не проникают внутрь сосудов, но связываются с их поверхностью [14].

Детально изученный геном: 70 % сходства *Danio rerio* и человека позволяет использовать в генетических исследованиях [24]. Функциональные домены белков, такие, например, как АТФ-связывающие домены киназ, имеют 100%-ю идентичность с человеческими. Связывание лекарств часто происходит на функциональных доменах. Использование модели зебрафиш для исследования действия лекарств на человека в этой связи является возможным [10].

Описано токсическое действие некоторых лекарственных препаратов на зебрафиш с представлением экстраполяции результатов на млекопитающих: гентамицин в концентрации 5 мкМ, неомицин 10 мкМ, хинин 200 мкМ вызывают потерю волосковых клеток, дексаметазон в концентрации 324 мкМ – нефротоксичность и гепатотоксичность, метотрексат 454 мкМ – тератогенность, нефротоксичность, поражение желудочно-кишечного тракта [17]. При этом детально описаны механизмы и расширены знания: нитропруссид натрия в исследовании на зебрафиш показал выраженную периферическую вазодилатацию, аторвастатин – снижение синтеза холестерина, преднизолон – противовоспалительное действие [4].

Danio rerio используется как биомодель для изучения тестирования действия лекарств на локомоторную активность: клозапин (12,5–50 мкМ), флуоксетин (4,6 мкМ), мелатонин (0,01–100 мкМ) – как на человека, так и на рыбку оказывает седативный эффект [11, 16].

Протеомное исследование белкового состава клеток органа в данный момент времени позволяет определить токсический эффект на молекулярном уровне. Изучение изменений белкового состава под действием токсического вещества позволяет определить новые биомаркеры токсического стресса. В этой связи прозрачные эмбрионы зебрафиш, как биомодель в токсикологии, могут служить надежным чувствительным методом оценки токсичности. Продукты расщепления вителлогенинов, являющихся основными белками желтка, могут служить

индикаторами токсического стресса у эмбрионов зебрафиш [14].

Моделирование заболеваний человека на *Danio rerio* основывается на знании патогенеза болезни у человека. При этом в настоящее время ни одна из моделей болезни человека не может быть совершенной [9] и может основываться на применении вещества, провоцирующего то или иное заболевание [6]. Паркинсонизм у рыбок моделировали с применением нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин – разрушающего кластеры дофаминергических нейронов, который у зебрафиш и млекопитающих один и тот же.

Сахарный диабет является одной из серьезных проблем в современной диабетологии, встречающаяся как в терапевтической (сахарный диабет 2-го типа), так и педиатрической практике (сахарный диабет 1-го типа). Высокий рост распространенности в популяции и ранняя инвалидизация от сахарного диабета приводит к дальнейшему изучению патогенеза заболевания и созданию лекарственных препаратов противодиабетической группы. В регуляции метаболизма глюкозы инсулином у зебрафиш и млекопитающих есть много общего. Основные белки – участники инсулинсигнальной системы – структурно и функционально близки к таковым у млекопитающих [21]. Предполагается использовать экспрессию фосфоенолпируваткарбоксикиназы – фермента одного из этапов глюконеогенеза, у зебрафиш и у человека его транскрипция контролируется как глюкагоном, так и инсулином. Эти знания помогут совершенствовать антидиабетические препараты [2].

Механизмы апоптоза имеют много общего у человека и зебрафиш – идентифицировано семь каспаз, четыре гена апоптоза, десять участвующих в процессе апоптоза киназ – связанных с апоптозом. Именно индукция апоптоза является важным механизмом эффективной противоопухолевой терапии [7].

Для изучения веществ на развитие и стимуляцию ооцитов также могут использоваться эмбрионы зебрафиш. В исследовании М.Н. Скоблиной и соавт. впервые было показано, что достигшие дефинитивного размера окруженные фолликулярными оболочками ооциты *Danio rerio*, созревшие *in vitro* под влиянием прогестерона, овулируют в результате их обработки ПГФ2α и полостной жидкостью карпа [27].

Danio rerio может использоваться как биологическая модель для изучения воздействия наркотических веществ фармакологической коррекции дозы. Запись электрокардиограммы подверженных воздействию кокаина рыбок *Danio rerio* показало увеличение ЧСС в колоколообразной зависимости от дозы. Максимальное увеличение – при дозировке 5 мг/л у большинства рыб в сравнении с базовой частотой. При воздействии более высоких доз у зебрафиш регистрировалась брадикардия [28].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время биомодель *Danio rerio* позволяет использовать зебрафиш в качестве недорогой альтернативы исследований вместо грызунов и других лабораторных животных. Накоплен достаточно большой объем знаний по развитию рыбки, ее геному и подходам к экспериментальному моделированию различных патологических состояний.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Блаженко А.А., Качанов Д.А. / Blazhenko A.A., Kachanov D.A. Исследование гормоновпрепаратов на модели danio rerio (zebrafish) / Issledovanie gormonopreparatov na modeli danio rerio (zebrafish) [The study of hormonal drugs on the model danio rerio (zebrafish)] // Мечниковские чтения – 2018: материалы Всероссийской научно-практической студенческой конференции с международным участием / Mechnikovskie chteniya – 2018: materialy Vserossiyskoj nauchno-prakticheskoy studencheskoj konferencii s mezhdunarodnym uchastiem [Mechnikov Readings – 2018: materials of the All-Russian Scientific and Practical Student Conference with international participation]. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова. – С. 630.

2. Скобкина М.Н., Минин А.А. / Skobkina M.N., Minin A.A. Гормональная индукция созревания и овуляции in vitro овоцитов Данио рерио (*Danio rerio*) и получение яйцеклеток, способных к оплодотворению и развитию / Gormonal'naja indukcija sozrevanija i ovuljacii in vitro ovocitov Danio rerio (*Danio rerio*) i poluchenie jajcekletok, sposobnyh k oplodotvoreniju i razvitiju [Hormonal induction of in vitro maturation and ovulation of oocytes of *Danio rerio* and production of eggs capable of fertilization and development] // Онтогенез / Ontogenez [Ontogenesis]. – 2016. – Т. 47 (5). – С. 314–319.

3. Abreu M.S., Giacomini A.C., Koakoski G., Oliveira T.A., Gusso D., Baldisserotto B., Barcellos L.J. Effects of waterborne fluoxetine on stress response and osmoregulation in zebrafish // Environmental Toxicology and Pharmacology. – 2015. – № 40 (30). – P. 704–707.

4. Barros T.P., Alderton W.K., Reynolds H.M., Roach A.G., Berghmans S. Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery // Br. J. Pharmacol. – 2008. – Aug., № 154 (7). – P. 1400–13. doi: 10.1038/bjp.2008.249. Epub 2008 Jun 16.

5. Berghmans S., Butler P., Goldsmith P., et al. Zebrafish based assays for the assessment of cardiac, visual and gut function—potential safety screens for early drug discovery // J. Pharmacol Toxicol. Methods. – 2008. – Jul–Aug., № 58 (1). – P. 59–68. doi: 10.1016/j.vascn.2008.05.130.

6. Elo B., Villano C.M., Govorko D., White L.A. Larval zebrafish as a model for glucose metabolism: expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase as a marker for exposure to anti-diabetic compounds // J. Mol. Endocrinol. – 2007. – Apr., № 38 (4). – P. 433–40.

7. Eric J. Mercero, Shelby L. Poitra, Ana Espinoza, et al. The effect of cocaine on heart rate and electrocardiogram in *Danio rerio* // Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. – 2015. – № 1–6. DOI: 10.1016/j.cbpc.2015.03.007.

8. Fonseka T.M., Wen X.Y., Foster J.A., Kennedy S.H. Zebrafish models of major depressive disorders // J. Neurosci. Res. – 2016. – Jan., № 94 (1). – P. 3–14. doi: 10.1002/jnr.23639.

9. Gerhard G.S. Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research // Exp. Gerontol. – 2003. – Nov–Dec., № 38 (11–12). – P. 1333–41.

10. Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when // Curr. Opin. Pharmacol. – 2004. – Oct., № 4 (5). – P. 504–12.

11. Gündel U., Benndorf D., von Bergen M., Altenburger R., Küster E. Vitellogenin cleavage products as indicators for toxic stress in zebra fish embryos: a proteomic approach // Proteomics. – 2007. – Dec., № 7 (24). – P. 4541–54.

12. Kari G., Rodeck U., Dicker A.P. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery // Clin. Pharmacol. Ther. – 2007. – Jul., № 82 (1). – P. 70–80.

13. Kimmel C.B. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish // Developmental dynamics. – 1995. – 2032553'10.

14. Lam C.S., Korzh V., Strahle U. Zebrafish embryos are susceptible to the dopaminergic neurotoxin MPTP // Eur. J. Neurosci. – 2005. – Mar., № 21 (6). – P. 1758–62.

15. Langheinrich U. Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk // Bioassays. – 2003. – № 25. – P. 904–912.

16. Lieschke G.J., Currie P.D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view // Nat. Rev. Genet. – 2007. – May, № 8 (5). – P. 353–67.

17. Lockwood B., Bjerke S., Kobayashi K., Guo S. Acute effects of alcohol on larval zebrafish: a genetic system for large-scale screening // Pharmacol. Biochem. Behav. – 2004. – Mar., № 77 (3). – P. 647–54.

18. Menke A.L. Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish // Toxicologic Pathology. – 2011. – № 39. – P. 759–775.

19. Parnig C., Seng W.L., Semino C., McGrath P. Zebrafish: a preclinical model for drug screening // Assay Drug Dev. Technol. – 2002. – Nov., № 1. – P. 41–8.

20. Pecoraro R. Evaluation of Chronic Nanosilver Toxicity to Adult Zebrafish // Front Physiol. – 2017. – № 8. – P. 1011.

21. Santos N.M., Vale A., Reis M.I., Silva M.T. Fish and apoptosis: molecules and pathways // Curr. Pharm. Des. – 2008. – № 14 (2). – P. 148–69.

22. Serbedzija G.N., Flynn E., Willett C.E. Zebrafish angiogenesis: a new model for drug screening // Angiogenesis. – 1999. – № 3 (4). – P. 353–9.

23. Souza J.P., Baretta J.F., Santos F., Paino M.M., Zucolotto V. Toxicological effects of graphene oxide on adult zebrafish (*Danio rerio*) // Aquat. Toxicol. – 2017. – May, № 186. – P. 11–18. doi: 10.1016/j.aquatox.2017.02.017.

24. Zon L.I., Peterson R.T. In vivo drug discovery in the zebrafish // Nat. Rev. Drug. Discov. – 2005. – Jan., № 4 (1). – P. 35–44.

Контактная информация

Зуб Андрей Владимирович – ассистент кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: Andrey_zub@inbox.ru