

### DANIO RERIO (ZEBRAFISH) КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА С ЦЕЛЬЮ БИОИНДИКАЦИИ В РАДИОБИОЛОГИИ

А. А. Ливанова<sup>1</sup>, Т. А. Есин<sup>1</sup>, И. В. Ильичев<sup>2</sup>, А. В. Завирский<sup>1</sup>, А. И. Ракин<sup>1</sup>, В. Ю. Кравцов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, г. Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Военно-инновационный технополис «ЭРА», г. Красногорск, Московская обл., Россия

### DANIO RERIO (ZEBRAFISH) AS A MODEL FOR RADIOBIOLOGICAL RESEARCH

A. A. Livanova<sup>1</sup>, T. A. Esin<sup>1</sup>, I. V. Ilyichev<sup>2</sup>, A. V. Zavirsky<sup>1</sup>, A. I. Rakin<sup>1</sup>, V. Yu. Kravtsov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> S. M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Company of Military-Innovative Technopolis "ERA", Krasnogorsk, Moscow region, Russia

#### Резюме

**Цель:** анализ возможности применения рыб *Danio rerio* как лабораторной тест-системы для оценки эффектов ионизирующего излучения с помощью эритроцитарного микроядерного теста.

**Материалы и методы:** 6 групп рыб (n = 120) подвергались воздействию рентгеновского излучения в дозах 0, 10, 20, 30, 40, 50 Гр для вычисления показателя полулетальной дозы LD<sub>50/30</sub>. 9 групп рыб (n = 27) подвергались воздействию рентгеновского излучения в дозах 0 (контроль), 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0, 8,0 Гр для построения предварительной дозозависимой кривой встречаемости микроядер в эритроцитах периферической крови.

**Результаты:** полулетальная доза (LD<sub>50/30</sub>) для *Danio rerio* была подсчитана и оказалась равной 24,9 Гр. Значения частот встречаемости микроядер в эритроцитах *Danio rerio* носили дозозависимый характер. Достоверно отличные от контроля показатели частоты встречаемости микроядер были обнаружены при облучении рыб в дозах 4,0, 6,0 и 8,0 Гр.

**Заключение:** рыбы *Danio rerio* характеризуются крайней радиорезистентностью, в связи с чем мы предполагаем возможность их использования в радиобиологии в качестве тест-системы для оценки эффективности факторов, индуцирующих мутагенное воздействие ионизирующего излучения (1 рис., 1 табл., библи.: 11 ист.).

**Ключевые слова:** биоиндикация, *Danio rerio*, *in vivo* модель, модельный организм, радиобиологическая модель, Zebrafish.

Статья поступила в редакцию 08.04.2020 г.

#### Summary

**Objective:** to estimate the possibility of using *Danio rerio* (Zebrafish) as a test system for assessing the effects of ionizing radiation using an erythrocyte micronuclei test.

**Materials and methods:** 6 groups of fish (n = 120) were exposed to X-rays in doses of 0, 10, 20, 30, 40, 50 Gy to calculate semi-lethal dose (LD<sub>50/30</sub>). 9 groups of fish (n = 27) were exposed to X-ray at doses of 0 (control), 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0 Gy for constructing a dose-dependent curve of the occurrence of micronuclei in peripheral blood red blood cells.

**Results:** the semi-lethal dose (LD<sub>50/30</sub>) for *Danio rerio* was calculated (24.9 Gy). The frequencies of micronuclei in the erythrocytes of *Danio rerio* were dose-dependent. Significant data of the frequency of occurrence of micronuclei were found when fish were irradiated at doses of 4.0, 6.0 and 8.0 Gy.

**Conclusion:** *Danio rerio* fish are characterized by extreme radioresistance, thereby we suggest the prospect of their use in radiobiology as a lab test system for assessing the effectiveness of factors that induce mutagenic effects of ionizing radiation (1 figure, 1 table, bibliography: 11 refs).

**Key words:** bioindication, *Danio rerio*, *in vivo* model, model organism, radiobiological model, Zebrafish.

Article received 08.04.2020.

Подбор оптимальной экспериментальной животной модели лежит в основе радиобиологического эксперимента и определяет возможность интерпретации результатов как на организм человека, так и на компоненты дикой природы. В радиобиологии в качестве экспериментальных животных наиболее часто используют млекопитающих [1], однако в последнее время все больше работ выполняется на рыбах *Danio rerio*. Выделяют следующие их преимущества, определяющие перспективу использования рыб *Danio rerio* в радиобиологии:

1. Высокая степень функциональной гомологии генома с геномом млекопитающих, и в частности человека [2–4].
2. Широкая распространенность в природе, а также легкое поддержание аквакультуры и уход [5].
3. Зародыши и мальки рыб *Danio rerio* полностью прозрачны [6].
4. Большое потомство. Одна пара взрослых особей *Danio rerio* дает 200–300 потомков [7].
5. Быстрое развитие. Большинство органов *Danio rerio* становятся различимыми спустя 72 ч после оплодотворения [8].
6. Высокая чувствительность эмбрионов к геноповреждающим агентам [9].
7. Наличие широкого ряда трансгенных линий *Danio rerio*.

Ввиду перечисленных преимуществ *Danio rerio* мы предположили перспективу использования этих рыб в радиобиологии. Целью данной работы является анализ возможности их применения как тест-системы для оценки воздействия ионизирующего излучения с помощью эритроцитарного микроядерного теста. В рамках этой цели были поставлены следующие задачи: подсчет полулетальной дозы ( $LD_{50/30}$ ) взрослых особей *Danio rerio*, а также построение кривой частоты встречаемости микроядер в их эритроцитах в зависимости от дозы облучения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования использовались пресноводные аквариумные рыбы *Danio rerio* мужского и женского пола. Для определения  $LD_{50/30}$  120 особей были разделены на 6 групп по 20 особей в каждой. Каждая группа была подвергнута воздействию рентгеновского излучения в дозах 0 (контроль), 10, 20, 30, 40 или 50 Гр с помощью рентгеновского аппарата «РУМ-17» с мощностью 0,31 Гр/мин. Для определения  $LD_{50/30}$  подсчитывали количество погибших в течение 30 сут со дня облучения особей в каждой группе. Расчет  $LD_{50/30}$  проводился с помощью компьютерной программы «Probit analysis».

Для определения встречаемости микроядер в эритроцитах периферической крови 9 групп рыб ( $n = 27$ ) были подвергнуты воздействию рентгеновского излучения в дозах 0 (контроль), 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0, 8,0 Гр. После облучения особи возвращались в условия аквакультуры. Через 72 ч после облучения кровь из хвостовой вены забирали путем обрезания хвостового плавника и наносили на чистое предметное стекло, распределяя ровным слоем, затем фиксировали в 96%-ном этиловом спирте в течение 25–30 мин до полного высушивания. Затем мазки окрашивались азур II эозином по методу Романовского. В каждой мазке светомикроскопически подсчитывали 3000 эритроцитов, после чего вычисляли среднее значение частоты встречаемости микроядер каждой группы. Статистическая обработка данных для проверки достоверности отличий частот встречаемости микроядер от контроля проводилась с помощью *t*-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В группах рыб, подвергнувшихся воздействию рентгеновского излучения в разных дозах для подсчета  $LD_{50/30}$  наблюдались следующие показатели смертности: при облучении в дозе 0 Гр — нет погибших (контрольная группа); 10 Гр — нет погибших; 20 Гр — 3 погибших; 30 Гр — 17 погибших; 40 Гр — 19 погибших; 50 Гр — 20 погибших особей. В целом, наблюдался дозозависимый эффект: при увеличении дозы количество погибших особей увеличивалось. Показатель  $LD_{50/30}$  вычисленный по итогам наблюдения погибших особей в пяти группах, оказался равен 24,91 Гр.

Частота встречаемости микроядер, обнаруженных в эритроцитах периферической крови облученных рыб разных групп (0 (контроль), 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0, 8,0 Гр), представлена в табл. 2. Статистически достоверные отличия частоты встречаемости микроядер от контрольной группы оказались характерными для групп рыб, облученных в дозах 4,0, 6,0, 8,0 Гр. Предварительная калибровочная кривая, отражающая зависимость частоты встречаемости микроядер от дозы ионизирующего излучения, представлена на рис. 1. Форма кривой соответствует линейно-квадратичному уравнению:  $y = 0,0354x^2 - 0,2237x + 0,7969$ , где  $Y$  — значение частоты встречаемости микроядер (промилле);  $X$  — доза (Гр).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученное значение полулетальной дозы  $LD_{50/30}$  а также низкие значения частоты встреча-

Таблица 1

Частота встречаемости микроядер в эритроцитах периферической крови рыб, подвергнувшихся воздействию рентгеновского облучения в разных дозах

| Доза (Гр) | Частота встречаемости микроядер (промилле) ± MD |
|-----------|---|
| 0,0       | 0,44 ± 0,07                                     |
| 0,5       | 0,67 ± 0,09                                     |
| 1,0       | 0,56 ± 0,08                                     |
| 1,5       | 0,58 ± 0,07                                     |
| 2,0       | 0,33 ± 0,06                                     |
| 3,0       | 0,56 ± 0,08                                     |
| 4,0       | 1,000 ± 0,09*                                   |
| 6,0       | 1,50 ± 0,16*                                    |
| 8,0       | 1,56 ± 0,13*                                    |

Примечание. \* —  $p < 0,05$ .

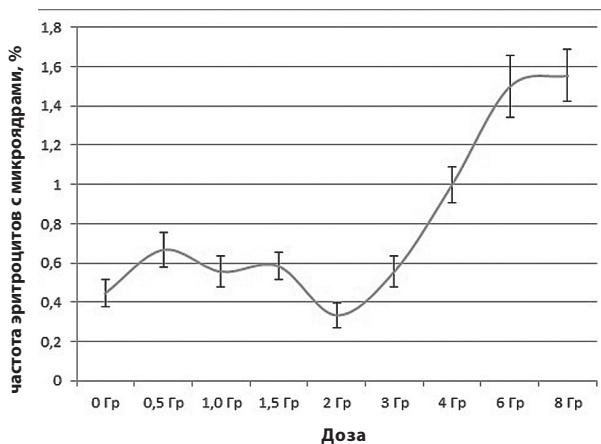


Рис. 1. Калибровочная кривая зависимости частоты встречаемости микроядер в эритроцитах периферической крови *Danio rerio* при воздействии рентгеновского излучения в разных дозах

емости микроядер даже при облучении в больших дозах указывают на крайнюю радиорезистентность рыб *Danio rerio*. Это сопоставимо с такими показателями у других представителей семейства: большого индийского карпа *Catla catla* (22,38 Гр) и золотой рыбки *Carassius auratus* (23 Гр) [10, 11]. Форма дозозависимой кривой демонстрирует, что статистически достоверные значения частот встречаемости микроядер наблюдались только при воздействии облучения в дозах 4,0 Гр и более. Это также указывает на крайнюю радиоустойчивость этих рыб. Учитывая это, мы предполагаем возможность использования *Danio rerio* в радиобиологии как лабораторных тест-систем для оценки эффективности факторов, индуцирующих мутагенное воздействие ионизирующего излучения, что может быть полезно при разработке агентов, стимулирующих действие лучевой терапии на клетки опухолей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Real A., Sundell-Bergman S., Knowles J. F., Woodhead D. S., Zinger I. Effects of ionizing radiation exposure on plants, fish and mammals: relevant data for environmental radiation protection. *J. Radiol. Prot.* 2004; 24 (4): 123.
2. Geiger G. A., Parker S. E., Beothy A. P., Tucker J. A., Mullins M. C., Kao G. D. Zebrafish as a "biosensor"? Effects of ionizing radiation and amifostine on embryonic viability and development. *Cancer research.* 2006; 66 (16): 8172–81.
3. Sanger Institute. Zebrafish genome project. Available at: [http://www.sanger.ac.uk/Projects/D\\_rerio/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/) (accessed 08.04.2020).
4. Howe K., Clark M. D., Torroja C. F., Torrance J., Berthelot C., Muffato M., Matthews L. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature.* 2013; 496 (7446): 498–503.
5. Avdesh A., Chen M., Martin-Iverson M. T., Mondal A., Ong D., Rainey-Smith S., Martins R. N. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. *Journal of Visualized Experiments.* 2012; 69: e4196.
6. Peng W. H., Lee Y. C., Chau Y. P., Lu K. S., Kung H. N. Short-term exposure of zebrafish embryos to arecoline leads to retarded growth, motor impairment, and somite muscle fiber changes. *Zebrafish.* 2015; 12 (1): 58–70.
7. Hoo J. Y., Kumari Y., Shaikh M. F., Hue S. M., Goh B. H. Zebrafish: a versatile animal model for fertility research. *Biomed. Res. Int.* 2016; 2016: 9732780. DOI: 10.1155/2016/9732780
8. Kimmel C. B., Ballard W. W., Kimmel S. R., Ullmann B., Schilling T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics.* 1995; 203 (3): 253–310.
9. Jarvis R. B., Knowles J. F. DNA damage in zebrafish larvae induced by exposure to low-dose rate -radiation: detection by the alkaline comet assay. *Mutation Research.* 2003; 542 (1–2): 63–9.
10. Anbumani S., Mohankumar M. N. Gamma radiation induced micronuclei and erythrocyte cellular abnormalities in the fish *Catla catla*. *Aquatic Toxicology.* 2012; 122–123: 125–32.
11. Driver C. J. Ecotoxicity literature review of selected Hanford site contaminants. 1994. Pacific Northwest Lab, Richland, WA, USA.

### УВЕДОМЛЕНИЕ

Авторы внесли равный вклад в данную работу и сообщают об отсутствии какого-либо конфликта интересов.

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Ливанова Александра Андреевна** — преподаватель, кафедра биологии, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6, конт. тел.: +7(950)0011550, e-mail: Alexandralivanova@mail.ru

**Есин Тимофей Алексеевич** — курсант, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6, конт. тел.: +7(953)3686908, e-mail: t.esin@mail.ru

**Ильичев Иван Владимирович** — оператор научной роты, Военный инновационный технополис «ЭРА», 143405, Россия, Московская обл., г. Красногорск, военный городок Павшина, д. 33/1

**Завирский Александр Владимирович** — майор мед. службы, преподаватель, кафедра токсикологии, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6, конт. тел.: +7(981)7951810

**Ракин Александр Ильич** — преподаватель, кафедра биологии, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6, конт. тел.: +79516883849, e-mail: rakinalex@gmail.com

**Кравцов Вячеслав Юрьевич** — заведующий кафедрой биологии, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6, конт. тел.: +7(960)2571546, e-mail: kvyspb@rambler.ru

### ACKNOWLEDGMENT

Authors contributed equally into this work and declare no conflict of interest.

### INFORMATION ABOUT AUTHORS

**Livanova Aleksandra A.** — Lecturer, Biology Department, S. M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, bld. 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044, cont. phone: +7(950)0011550, e-mail: Alexandralivanova@mail.ru

**Esin Timofei A.** — cadet, S. M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, bld. 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044, cont. phone: +7(953)3686908, e-mail: t.esin@mail.ru

**Ilyichev Ivan V.** — operator research company, Military Innovation Technopolis «ERA», 33/1, Pavshin military town, Moscow region, Krasnogorsk, Russia, 143405

**Zavirsky Aleksandr V.** — Major of Medical Service, Lecturer, Toxicology Department, S. M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, bld. 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044, cont. phone: +7(981)7951810

**Rakin Aleksandr I.** — Lecturer, Biology Department, S. M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, bld. 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044, cont. phone: +79516883849, e-mail: rakinalex@gmail.com

**Kravtsov Vyacheslav Yu.** — the Head of Biology Department, S. M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, bld. 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044, cont. phone: +7(960)2571546, e-mail: kvyspb@rambler.ru