

Качанов Д.А.¹, Бардаков М.О.¹, Лукин Е.Н.¹, Мкртчян Г.В.¹,
Газданова Н.В., Акопян К.А., Бадальянц Д.А.¹, Хачатрян А.В.А.¹, Шахназарян Р.Л.¹,
Арушанова Э.А.² DOI 10.25694/URMJ.2020.07.30

Сравнительный обзор возможностей использования *Danio rerio* (Zebrafish) в качестве модельного объекта в доклинических исследованиях

¹ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург; ²ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Kachanov D.A., Bardakov M.O., Lukin E.N., Mkrtchyan G.V., Gazdanova N.V., Akopyan K.A., Badalyantc D.A., Khachatryan A.V.A., Shakhnazaryan R.L., Aryshanova E.A.

Comparative overview of the possibilities of using *Danio rerio* (*Danio rerio*) as a model object in preclinical studies

Резюме

Danio rerio (Zebrafish) как модельный объект в доклинических исследованиях применяются в последние годы очень широко. Этому способствуют их морфологические, физиологические, биохимические, генетические и эмбриологические особенности, а также экономическая выгода и небольшие временные затраты на их разведение. Цель – обобщение имеющихся данных об использовании *Danio rerio* (Zebrafish) в доклинических исследованиях. Методы. В данной работе проведён мета-анализ отечественных и зарубежных статей о применении *Danio rerio* в токсикологических, фармакологических, эмбриологических и др. направлениях исследований. Результаты. *Danio rerio* (Zebrafish) могут использоваться во многих направлениях доклинических исследований лекарственных препаратов. Особенно интересно их применение для моделирования стресса новизны и экспериментальной депрессии. Выводы. *Danio rerio* представляют собой универсальный модельный объект, позволяющий экономически выгодно проводить исследования различных фармакологических препаратов, прежде чем они будут тестироваться на других моделях, в частности млекопитающих

Ключевые слова: *Danio rerio*, Zebrafish, модельный объект, доклинические испытания

Для цитирования: Качанов Д.А., Бардаков М.О., Лукин Е.Н., Мкртчян Г.В., Газданова Н.В., Акопян К.А., Бадальянц Д.А., Хачатрян А.В.А., Шахназарян Р.Л., Арушанова Э.А., Сравнительный обзор возможностей использования *Danio rerio* (Zebrafish) в качестве модельного объекта в доклинических исследованиях, Уральский медицинский журнал, №07 (190) 2020, с. 158- 162, DOI 10.25694/URMJ.2020.07.30

Summary

Danio rerio (Zebrafish) as a model object in preclinical studies has been widely used in recent years. This is facilitated by their morphological, physiological, biochemical, genetic and embryological peculiarities, as well as economic benefits and low time costs for their breeding. The aim - summarize the available data on the use of *Danio rerio* (Zebrafish) in preclinical studies. Methods In this paper, a meta-analysis of domestic and foreign articles on the use of *Danio rerio* in toxicological, pharmacological, embryological, and other areas of research has been carried out. Methods in this paper, a meta-analysis of domestic and foreign articles on the use of *Danio rerio* in toxicological, pharmacological, embryological, and other areas of research has been carried out. Results and discussion. *Danio rerio* (Zebrafish) can be used in many areas of preclinical drug research. Particularly interesting is their use for modeling novelty stress and experimental depression. Conclusion. *Danio rerio* is a universal model object, which makes it possible to carry out research of various pharmacological preparations in a cost-effective manner before they are tested on other models, in particular mammals

Keywords: *Danio rerio*, Zebrafish, model object, preclinical studies

For citation: Kachanov D.A., Bardakov M.O., Lukin E.N., Mkrtchyan G.V., Gazdanova N.V., Akopyan K.A., Badalyantc D.A., Khachatryan A.V.A, Shakhnazaryan R.L., Aryshanova E.A., Comparative overview of the possibilities of using *Danio rerio* (*Danio rerio*) as a model object in preclinical studies, Ural Medical Journal, No. 07 (190) 2020, p. 158 - 162, DOI 10.25694/URMJ.2020.07.30

Введение

На сегодняшний день достоверно известно, что тропические рыбки *Danio rerio* (Zebrafish) являются изученным и практичным модельным объектом доклинических исследований. Они имеют ряд преимуществ по сравнению с различными представителями данного класса и даже другими лабораторными животными, в частности грызунами. Благодаря детальной изученности эмбриогенеза, генома, морфологических особенностей и минимальности затрат на содержание Zebrafish может применяться в биологических, генетических, фармакологических исследованиях и скрининге при мутагенезе, оценке тератогенности и другого воздействия химических веществ.

Цель данного исследования - обобщение имеющихся данных об использовании Zebrafish в доклинических исследованиях, установление их преимуществ и недостатков в конкретных лабораторных испытаниях и дальнейших перспективах работы с данным модельным объектом.

Материалы и методы

В работе был проведен мета-анализ данных зарубежных и отечественных статей (за период 2014-2018 гг.), посвященных использованию *Danio rerio* в различных доклинических исследованиях.

Результаты и обсуждение

Danio rerio (Zebrafish) – маленькая пресноводная тропическая рыбка, населяющая преимущественно реки и ручьи Пакистана, Индии, Бангладеша, Непала, Мьянмы и Бутана. Zebrafish, хорошо известная любителям аквариумных рыб, широко применяется в лабораторных исследованиях. *Danio rerio* имеет продолговатую форму тела, основной тон окраски - серебристый с ярко синими и желто-зелеными полосами. Взрослые особи, обитающие на воле, достигают длины 6-7 см, аквариумные обитатели - 5 см. Zebrafish ведут стайный образ жизни (не менее 7-10 рыбок), большую часть времени держатся в верхних и средних слоях воды. В неволе живут около трех лет.

Главными достоинствами этой рыбки является наличие прозрачного эмбриона, который позволяет в полной мере наблюдать стадии эмбриогенеза. Данная особенность нашла применение в изучении тератогенного, канцерогенного и других влияний различных химических и лекарственных веществ на *Danio rerio*, что проявляется в нарушении этапов развития зародыша или формировании морфологических аномалий развития. Помимо этого, Zebrafish обладает высокой плодовитостью и быстрым периодом созревания эмбрионов. Через 3 дня после оплодотворения у него начинается функционировать сердце, кровеносная и нервная системы. На

четвертые сутки происходит формирование малька, способного к самостоятельному питанию и движению. Эта особенность позволяет ускорить процесс исследования и минимизировать затраты в виде средств и времени [4].

Также стоит отметить, что на настоящее время проведено детальное изучение генома *Danio rerio*. Отмечается, что у Zebrafish имеется 70% гомологии с геномом человека, что позволяет их использовать как прекрасную модель для генетических исследований [4].

Сходные биохимические процессы с млекопитающими вновь подтверждают целесообразность использования *Danio rerio* как модели доклинических исследований.

Использование *Danio rerio* в качестве индикаторов загрязнения водоемов

И взрослые особи, и эмбрионы *Danio rerio* могут служить тест-объектами для оценки эффективности гигиенической очистки водоемов в связи с их нарастающим антропогенным загрязнением.

В исследовании Jequeline P. Souza и соавт. особый интерес уделялся токсическому действию графена на организмы, в связи с широкой распространённостью его применения в области биомедицины. В результате проведенных экспериментов в морфологии жабер была выявлена гиперплазия жаберных клеток, являющаяся исходом предшествующего некроза, а также присутствие в них активных форм кислорода. В печени также наблюдались неравномерное распределение гепатоцитов в ткани, нарушение периферического расположения ядер, вакуолеобразование и наличие некротических изменений клеток органа [1].

Исследование Е. О. Аристархова показало, что Zebrafish являются более чувствительными к комплексному воздействию загрязняющих веществ в исследуемых водоемах. Спустя 12 часов от начала эксперимента, в большей степени чем у других рыб, у *Danio rerio* наблюдалось усиление векторного движения и снижение активности поедания корма. [2]

Модельный объект для постановки стресса и депрессии

В настоящее время Zebrafish также активно используются в качестве опытной модели для постановки стресса новизны и экспериментальной депрессии с последующим воздействием препаратов разных фармакологических групп [3, 4]. Для постановки стресса новизны используют следующую методику: *Danio rerio* помещают сначала в мерный стакан с растворенным фармакологическим веществом (или просто с чистой водой), а затем — в просмотрный аквариум на 6 минут, где автоматически регистрируются траектория движения, длина пути, число перемещений в верхнюю часть аквариума, время пребывания в нижней части аквариума, число и время

паттерна «фризинг» (обездвиживание) за каждую минуту эксперимента. В ответ на новизну помещения *Danio rerio* реагируют погружением на дно, увеличением фризинга и снижением числа перемещений в верхнюю половину аквариума. Так, например, на фоне введения феназепам число и время паттерна «фризинг», а также время пребывания в нижней части аквариума снижались более чем в 2 раза по сравнению с контрольной группой и проявлялся дозозависимый эффект. Тест стресса новизны является высоко чувствительным для изучения тревожно-фобических реакция у *Zebrafish*, и поэтому данная модель может использоваться для изучения поведенческой фармакологии [3].

Для создания экспериментальной депрессии может использоваться и другая модель, заключающаяся в разлучении особей *Danio rerio* по парам в ограниченном пространстве. Данная модель может являться перспективной для изучения уже существующих психоактивных веществ, а также в доклинических исследованиях новых препаратов [4].

Оценка токсичности фармакологических препаратов различных групп

В исследовании *Silvia Ribeiro* и соавт. эмбрионы *Danio rerio* подвергались воздействию препаратов разных фармакологических групп: диклофенака, пропранолола, симвастатина и сертралина. Оценивалось их токсическое воздействие на эмбрионы *Zebrafish*. При оценке влияния диклофенака на эмбрионы наблюдались значительные изменения в развитии: рост аномальных клеток, нарушение стадии эпиболии в развитии зародыша, а также отклонения в формировании желточного мешка. Наиболее существенные нарушения развития были отмечены при концентрации препарата 12,5 мг/л. Число успешно пройденных стадий эпиболии в развитии зародыша уменьшилось с 91% до 82,5% при увеличении концентрации диклофенака с 1,25 до 12,5 мг/л.

При воздействии пропранолола в концентрации 12,5 мг/л выявлялось развитие перикардального выпота, аномалий развития плавников, резко увеличивалась смертность эмбрионов с 32 по 80 часы исследования.

Сертралин в концентрации 10 мг/л приводил к смерти всех эмбрионов к 80 часам исследования. Также было показано значительное снижение успешных стадий эпиболии в развитии зародыша по сравнению с контролем (с 90% до 67,5 %).

Симвастатин оказался самым токсичным из исследуемых препаратов. Концентрация 5 мг/л оказалась смертельной для всех эмбрионов с 32 по 80 часы исследования.

В концентрации до 500 мкг/л данный препарат вызывал увеличение количества аномальных эмбрионов с нарушениями зрения, развития хвоста и желточного мешка, а также в полости перикарда рыбок развивался выпот.

Исследование показало, что эмбрионы *Danio rerio* могут использоваться как модель в проведении доклинических исследований по оценке токсичности различных новых фармацевтических препаратов [5].

В работе К.В. Золотарева и соавт. взрослые рыбы *Danio rerio* в течение 4 суток подвергались действию Cd и Cu, концентрации которых были равны ПДК(5 мкг/л для обоих ионов) и сублетальным концентрациям(6,4 мг/л для кадмия и 80 мкг/л для меди). Исследование действия ионов тяжелых металлов на протеом проводилось методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии.

По итогам эксперимента были найдены маркеры токсического действия Cd и Cu на печень и сердечную мышцу (таблица 1) [6].

Модель для создания транспортных лекарственных систем

Danio rerio активно используются для разработки новых транспортных лекарственных систем, которые в дальнейшем помогут в лечении различных заболеваний. В частности, весьма актуальным является моделирование опухоли головного мозга *Zebrafish* с последующей ее терапией с помощью доксорубина и паклитаксела, встроенных в экзосому [8].

Модель оценки влияния наркотических веществ

Danio rerio могут служить прекрасными тест-объектами для моделирования влияния наркотических

Таблица 1. Маркеры токсического воздействия Cd и Cu на печень и сердечную мышцу, установленные при проведении исследований на *Danio rerio*

Ткань	Маркеры	
	Cd	Cu
Печень	Сульфотрансфераза 3 семейства 2, фермент защитного и гидрофилизирующего действия	Eif2s1, субъединица 1 фактора 2 инициации трансляции генов. Образует комплекс с ГТФ и иницирующей т-РНК
	Секреторная фосфолипаза A2, Са-зависимый фермент гидролиза фосфолипидов	Stat3, сигнальный белок-активатор транскрипции генов.
сердце	НАДН-ДГ(убихинон)	Шаперонин класса 2
		Селенопротеин J, белок антиоксидантного действия.

препаратов на организм *Danio* и дальнейших способов его фармакологической корректировки. Именно это сумели доказать в своем исследовании Eric J. Mercero, Shelby L. Poitra, Ana Espinoza и соавторы.

При измерении электрокардиограммы подверженных воздействию кокаина рыбок *Danio rerio* наблюдалось увеличение ЧСС в колоколообразной зависимости от дозы. Максимальное увеличение проявлялось при дозировке 5 мг/л у большинства рыб в сравнении с базовой частотой. Также стоит отметить, что при воздействии более высоких доз у *Zebrafish* регистрировалась брадикардия.

На основании проделанной работы была введена закономерность о том, что влияние кокаина на частоту сердечных сокращений обладает дозозависимым эффектом. Это в очередной раз подтверждает использование *Danio rerio* в качестве модельной системы для изучения влияния наркотических веществ [9].

Использование эмбрионов *Danio rerio*

Эмбрионы *Zebrafish* являются хорошей моделью для оценки влияния различных веществ на развитие и стимуляцию ооцитов.

В ранее проведенных экспериментах было показано, что для стимуляции овуляции у костистых рыб, как и других позвоночных необходимы эйкозаноиды (ПГF2α или ПGE2).

В исследовании М.Н.Скоблиной и соавт. впервые было показано, что достижения дефинитивного размера окруженные фолликулярными оболочками ооциты *Danio rerio*, созревшие *in vitro* под влиянием прогестерона, овулируют в результате их обработки ПГF2α и полостной жидкостью карпа (ПЖК).

В проведенных опытах при обработке фолликулов *Zebrafish* прогестероном и ПГF2α (5 мкг/мл) после оплодотворения дробилось от 57 до 92% овулировавших ооцитов и от 17 до 61% из них достигало стадии вылупившейся личинки.

В результате воздействия на фолликулы 20% ПЖК, содержащей ПГF2α, было выявлено, что проценты овулировавших ооцитов *Danio rerio*, стимулированных прогестероном и ПЖК и прогестероном и простагландином у трех из четырех самок не отличаются достоверно [7].

Доинформационное исследование нуклеоспермата натрия («Вирутер») на эмбрионах *Danio rerio* показало, что при добавлении данного препарата в экспериментальные лунки с эмбрионами происходит их более эффективное развитие благодаря активации системы врожденного иммунитета с дальнейшим развитием комплекса регулируемых цитокинами провоспалительных и противовоспалительных сигналов [10].

Можно сделать вывод о том, что ооциты *Zebrafish* являются перспективной моделью для исследования роли различных соединений на процессы созревания клеток и овуляции.

Исследования гормонопрепаратов

Заболевания щитовидной железы относятся к числу наиболее распространенных нарушений в работе эндокринной системы. Нарушения ее функции встречаются

часто, как у детей, так и у взрослых. Недостаток синтеза и секреции гормонов в раннем возрасте ведет к задержке роста, соматическим нарушениям и олигофрении (кретинизму), в более старшем возрасте – к замедлению обмена веществ (микседеме). С использованием рыбок *Danio rerio* можно проводить оценку влияния гипо- и гипертиреоидного состояния на развитие и выживаемость икринок до появления личинок, регистрируя при этом кровообращение, пигментацию зоны глаз, появление или отсутствие различных аномалий в развитии формы тела [11].

Использование *Danio rerio* для моделирования болезни человека

В ходе большого количества исследований у *Danio rerio* были идентифицированы гены, связанные с болезнями человека. К таким заболеваниям относятся болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофической склероз, мышечная дистрофия, лейкемия, тромбоз, кардиомиопатия, диабет и др. Для моделирования на *Danio rerio* этих заболеваний используют различные подходы. Так, например, нейротоксин – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин, применяется для моделирования паркинсонизма у рыбок, так как механизм действия этого соединения, связанный с разрушением дофаминергических нейронов, у *Danio rerio* и млекопитающих один и тот же [12].

Заключение

В настоящее время большое количество лабораторий всего мира используют *Zebrafish* в своих исследованиях. Эти небольшие рыбки обладают несомненными преимуществами перед грызунами: относительно невысокая стоимость работ, небольшие временные затраты и простота в разведении. Данный модельный объект способствует не только созданию новых лекарственных препаратов, но и позволяет на основе созданных моделей болезней человека более подробно изучать их патогенез, а также влияние на органы и системы. Модель *Danio rerio* не заменяет классических модели млекопитающих, она может первым этапом доинформационных исследований, перед тем как они будут проведены, в частности, на грызунах. ■

Качанов Дмитрий Александрович – заведующий лабораторией кафедры фармакологии и фармации, студент 6-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО СЗГМУ имени И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург; *Бардаков Максим Олегович* – студент 6-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО СЗГМУ имени И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург; *Лукин Евгений Николаевич* – студент 6-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО СЗГМУ имени И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург; *Мкртчян Генрих Витальевич* – студент 6-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО СЗГМУ имени И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург; *Газданова Никазлла Владимировна* – студент 6-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО СЗГМУ имени И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург; *Акопян Карина Артуровна* – студент 6-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО СЗГМУ имени И.И. Мечникова Минздрава

России, Санкт-Петербург; **Бадальян Диана Артуровна** – студент 6-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО СЗГМУ имени И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург; **Хачатрян Андре-Вардан Араикович** – студент 6-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО СЗГМУ имени И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург; **Шахназарян Рубен Людвигович** – студент 6-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО

СЗГМУ имени И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург; **Арушанова Эмма Арташеговна** – студент 6-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург. Автор, ответственный за переписку: Качанов Д.А. Тел.: +79817592081. E-mail: Dmitrii.Kachanov@szgmu.ru. г. Санкт-Петербург, Пискаревский пр-т, 47.

Литература:

1. J.P. Souza et al. // *Aquatic Toxicology*. – V. 186 – 2017. – P. 11-18.
2. Е. О. Аристархова. Экспресс-оценка токсичности вод поверхностных источников водоснабжения с использованием рыб *Danio rerio* // *Рыбохозяйственная наука Украины*. – 2017. - №3
3. Шабанов П.Д., Лебедев В.А., Лебедев А.А. и соавт. Влияние стресса новизны на поведенческие ответы *Danio rerio* и оценка дозозависимых эффектов анксиолитиков бензодиазепинового ряда на примере феназепам. // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2017. – Т. 15. - №3. – С. 57-63. doi: 10.17816/RCF15357-63
4. Качанов Д.А. Сравнительный анализ влияния селективных ингибиторов обратного захвата серотонина на поведение *Danio rerio* в условиях экспериментальной депрессии. // *Мечниковские чтения-2018: материалы Всероссийской научно-практической студенческой конференции с международным участием*. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И. И. Мечникова. – 2018. – С. 636-637.
5. Silvia Ribeiro, Tiago Torres, Rosario Martins et al. Toxicity screening of Diclofenac, Propranolol, Sertraline and Simvastatin using *Danio rerio* and *Paracentrotus lividus* embryo bioassays. // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2015. – P. 67-74
6. Золотарёв К.В., Беляева Н.Ф., Михайлова М.В. и соавт. Поиск маркеров токсического действия CD2+ и Cu2+ методом протеомного профилирования печени и сердца *Danio rerio*. // *Биотехнология и медицина*. – 2015.
7. Скобкина М.Н., Минин А.А. Гормональная индукция созревания и овуляции *in vitro* овоцитов Данио рерио (*Danio rerio*) и получение яйцеклеток, способных к оплодотворению и развитию. // *Онтогенез*. – 2016. – Т. 47. - №5. – С. 314-319
8. Yang, T., Martin, P., Fogarty, B. et al. *Pharm Res* (2015) 32: 2003. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1593-y>
9. 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. – P.1-6. - DOI: 10.1016/j.cbpc.2015.03.007.
10. Блаженко А.А., Качанов Д.А., Прошин С.Н. Доклиническое исследование нуклеоспермата натрия на модели *Danio rerio*. // *Мечниковские чтения-2018: материалы Всероссийской научно-практической студенческой конференции с международным участием*. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И. И. Мечникова. – 2018. – С. 630-631.
11. Блаженко А.А., Качанов Д.А., Прошин С.Н. Исследование гормонопрепаратов на модели *Danio rerio* (Zebrafish). // *Мечниковские чтения-2018: материалы Всероссийской научно-практической студенческой конференции с международным участием*. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И. И. Мечникова. – 2018. – С. 633-634.
12. Беляева Н.Ф. и соавт. Зебрафиш как модель в биомедицинских исследованиях. // *Биомедицинская химия*. – 2010. – Т. 56.- №.1. – С-120-131.