

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИНКУБАЦИОННЫХ СРЕД НА ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ДАНИО РЕРИО В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*

Н. В. БАРУЛИН, Я. А. ЯСЬКИНА, К. Л. ШУМСКИЙ

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»,
г. Горки, Республика Беларусь, 213407, e-mail: barulin@list.ru

(Поступила в редакцию 28.09.2020)

Цель работы заключалась в изучении влияния различных инкубационных сред на эмбриональное развитие данио рерио в эксперименте *in vivo*. Исследования выполнялись на базе кафедры ихтиологии и рыбоводства в 2020 г, в студенческой научно-исследовательской лаборатории «Физиология рыб». Нами было изучено влияние различных инкубационных сред на эмбриональное развитие модельного объекта данио рерио. Нами изучались такие показатели как: активность эмбрионов через 30 часов после оплодотворения, время достижения отдельных стадий эмбрионального развития, общая выживаемость эмбрионов, частота сокращения сердца и активность кровотока в хвостовой вене у эмбрионов. В результате проведенных исследований нами было установлено, что исследуемые инкубационные среды не оказывают достоверного влияния на эмбриональное развитие данио рерио, что свидетельствует о том, что для проведения рутинных работ по размножению модельного объекта данио рерио нет необходимости в использовании сложных инкубационных сред. Наиболее удобной инкубационной средой для эмбрионов рыб, исходя из проведенных исследований, являются среда № 1 и № 3. Однако, как показал наш длительный опыт воспроизводства данио рерио, качество и состав воды из артезианской скважины может меняться в зависимости от сезона года, наличия дождей и частоты чистки станции обезжелезивания, через которую проходит данная вода. Это является неудобным, особенно при проведении научных исследований, которые требуют многократной повторности, т. к. качество артезианской воды может колебаться от эксперимента к эксперименту, что может исказить результаты. Поэтому для проведения научных исследований при работе с эмбрионами данио рерио нами рекомендуется использовать среду № 3 (дистиллированная вода – 1 л + NaCl – 0,1 г/л, которая в значительной мере защищена от колебаний состава).

Ключевые слова: эмбрионы данио рерио, инкубационная среда.

The aim of this work was to study the effect of different incubation media on the embryonic development of zebrafish in an *in vivo* experiment. The research was carried out on the basis of Department of Ichthyology and Fish Farming in 2020, in the student research laboratory «Physiology of Fish». We have studied the effect of different incubation media on the embryonic development of model zebrafish object. We studied such indicators as: the activity of embryos 30 hours after fertilization, the time to reach individual stages of embryonic development, the overall survival of embryos, the frequency of heart contraction and the activity of blood flow in the tail vein in embryos. As a result of our studies, we found that the studied incubation media do not have a significant effect on the embryonic development of zebrafish, which indicates that there is no need to use complex incubation media to carry out routine work on the reproduction of model zebrafish object. The most convenient incubation medium for fish embryos, based on the studies carried out, are medium No. 1 and No. 3. However, as our long-term experience in reproduction of zebrafish has shown, the quality and composition of water from an artesian well can vary depending on the season, the presence of rains and the frequency of cleaning the iron removal station through which this water passes. This is inconvenient, especially when conducting scientific research that requires multiple repetitions. Artesian water quality can fluctuate from experiment to experiment, which can distort the results. Therefore, for scientific research when working with zebrafish embryos, we recommend using medium No. 3 (distilled water – 1 l + NaCl – 0.1 g / l, which is largely protected from fluctuations in composition).

Key words: zebrafish embryos, incubation medium.

Введение

Эмбрионы рыб все чаще используются в качестве модели в биомедицинских исследованиях и (эко) токсикологии. Согласно 3R (замена, сокращение и уточнение экспериментов на животных [1]), эмбрионы рыб рассматриваются как методы замены или усовершенствования, поскольку на этих стадиях развития, вероятно, будет меньше или совсем не будет боли, страданий или длительного вреда [2]. В частности, эмбрионы данио (*Danio rerio*) достигли высокой популярности, основанной на уникальном наборе свойств (простоте ухода, небольшом размере, высокой плодовитости, быстром развитии, оптической прозрачности эмбриона, способности подвергаться генетическому и химическому скринингу, и обширной литературной базе). В дополнение к прямым генетическим подходам доступен большой набор методов, от трансгенеза до целевого нокаута генов, все из которых вносят вклад в исследование функции генов в контексте интактного организма [3–5]. Учитывая, что к настоящему времени создано более 5000 мутантных и трансгенных штаммов рыб данио, модель рыбы данио может внести значительный вклад в наше понимание функции генов в глобальном масштабе. Однако стало ясно, что потенциал моделей мелких рыб выходит далеко за рамки областей клеточной биологии и генетики развития [6]. Например, модели данио рерио используются в исследованиях поликистоза почек, сердечной аритмий, кардиомиопатий и миопатий скелетной мускулатуры, врожденных пороков сердца, анемии, переработки холестерина, глаукомы, рака (особенно меланомы и лейкемии), зависимости, регенерации тканей, нарушений слуха, дегенерации нервной системы и сетчатки, а также инфекционных заболеваний [4, 7, 8]. Ключевым преимуществом модели эмбрионов данио рерио

по сравнению с обычными моделями, такими как мыши и крысы, является возможность проведения крупномасштабных скринингов [3]. Поскольку токсикологические испытания на млекопитающих являются дорогостоящими, требуют много времени и вызывают серьезные этические проблемы, существует острая необходимость в разработке альтернативных моделей. Рыба данио с ее маленьким прозрачным зародышем – гораздо более дешевая модель для систематического тестирования токсикологического и тератологического воздействия химических веществ, чем млекопитающие [9]. Использование эмбрионов рыбок данио обеспечивает альтернативный подход к тестированию по принципу «весь организм» [10].

Использование модельных объектов данио рерио в медико-биологических и сельскохозяйственных исследованиях является новым направлением для Беларуси. В этой связи важным является апробация международных протоколов проведения исследования на этих объектах. Большую перспективу данио рерио имеют при изучении искусственного воспроизводства рыб, поскольку оно имеет значение в технологии производства посадочного материала в промышленных условиях. В этом технологическом этапе особое значение имеет подготовка производителей к нересту, его физиологическое состояние, а также качество посадочного материала, на которое в значительной степени влияет успех инкубации эмбрионов [11–15].

В последнее время существуют дискуссии о наиболее подходящих инкубационных средах, используемых при содержании эмбрионов данио рерио, которые различаются между собой по составу и методике приготовления.

Цель нашей работы заключалась в изучении влияния различных инкубационных сред на эмбриональное развитие данио рерио в эксперименте *in vivo*.

Основная часть

Исследования выполнялись на базе кафедры ихтиологии и рыбоводства в 2020 г., в студенческой научно-исследовательской лаборатории «Физиология рыб» (научный руководитель лаборатории – Н. В. Барулин).

В качестве объектов исследований использовали эмбрионы (в т.ч. свободные) данио рерио дикого типа. Эмбрионы рыб получались от индивидуального нереста (1 самец – 1 самка). Самец и самка накануне вечером, отсаживались в 3-литровый лоток – нерестовик (лоток предназначенный для нереста, имеющий нерестовый субстрат), в котором имелась прозрачная перегородка, отделяющая самца от самки. Лоток находился на общем водоснабжении водой из вивария. Температура воды при нересте составляла 27 °С. Утром, в 9.00, перегородка убиралась, через 10–15 минут происходило начало естественного нереста. После извлечения эмбрионов из лотка-нерестовика (в 11.00), они промывались от загрязнений (чешуя от производителей, остатки фекалий, мертвые (неоплодотворенные) икринки) и помещались в инкубационную среду. Инкубацию эмбрионов осуществляли в 90 мм полистирольных чашках Петри, которые помещались в охлаждаемые инкубаторы с системой охлаждения и нагревания ST 5 SMART (Pol-Еко-Аparatura, Польша) или ХТ 3/40 (ЗАО «Пять океанов», Беларусь) в зависимости от цели эксперимента. Температура инкубации эмбрионов составляла 27,5 °С. Вода в чашках Петри ежедневно подменялась тестируемой инкубационной средой.

В исследованиях по влиянию различных инкубационных сред на эмбриональное развитие данио рерио использовали следующие среды для инкубации: среда № 1 (вода из артезианской скважины – 1 л); среда № 2 (технологическая вода из вивария, в котором проводился нерест данио рерио – 1 л); среда № 3 (дистиллированная вода – 1 л, NaCl – 0,1 г/л); среда № 4 (вода из артезианской скважины – 1 л, метиленовый синий – 0,001 г/л); среда № 5 (дистиллированная вода – 1 л, NaCl – 2,94 г/л, KCl – 0,13 г/л, CaCl₂ × 2H₂O – 0,49 г/л, MgSO₄ – 0,81 г/л); среда № 6 (дистиллированная вода – 1 л, NaCl – 2,94 г/л, KCl – 0,13 г/л, CaCl₂ × 2H₂O – 0,49 г/л, MgSO₄ – 0,81 г/л, метиленовый синий – 0,001 г/л).

Объем инкубационной среды в каждой чашке Петри составлял 40 мл. В каждую чашку Петри помещались по 50 экз. эмбрионов.

Снимки эмбрионов и личинок, а также видеозаписи их активности осуществляли при помощи биологического микроскопа (планахроматический объектив 4×/0,13) и камеры для микроскопа Basler acA2040-55uc. Захват изображений осуществляли при помощи ПО pylonViewer.

Для анализа физиологического состояния эмбрионов и личинок использовали ПО DanioScore от компании Noldus. С помощью данного ПО регистрировали активность эмбрионов (длительность активности, количество толчков, длительность бездействия); частоту сердечных сокращений у свободного эмбриона и активность кровотока в хвостовой вене).

Исследования выполнялись в трехкратной повторности. При описании стадий эмбрионального развития использовали ресурс ZFIN [16].

Для статистической обработки использовали статистическую программу R с пакетами RCommander, corrplot и др. [17].

Результаты влияния различных инкубационных сред на активность эмбрионов данно рерио через 30 часов после оплодотворения представлены в табл. 1. Средняя суммарная взрывная активность эмбрионов через 30 часа после оплодотворения колебалась в интервале $3,29 \pm 0,71 - 5,79 \pm 0,79$ % от общего времени наблюдения. Средняя неактивность эмбрионов через 30 часов после оплодотворения колебалась в интервале $94,21 \pm 0,79 - 96,71 \pm 0,71$ % от общего времени наблюдения. Среднее количество движений за 1 минуту находилось в интервале $4,81 \pm 1,15 - 5,17 \pm 1,45$. Разницы между исследуемыми группами были недостоверными.

Таблица 1. Результаты влияния различных инкубационных сред на активность эмбрионов данно рерио через 30 часов после оплодотворения, $M \pm m$, $n=10$

Показатель	Номер инкубационной среды					
	1	2	3	4	5	6
Взрывная активность, %	$4,39 \pm 0,74$	$3,29 \pm 0,71$	$5,11 \pm 0,68$	$4,54 \pm 0,61$	$5,79 \pm 0,79$	$3,89 \pm 0,79$
Неактивность, %	$95,61 \pm 0,74$	$96,71 \pm 0,71$	$94,89 \pm 0,68$	$95,46 \pm 0,61$	$94,21 \pm 0,79$	$96,11 \pm 0,79$
Количество движений / мин	$4,81 \pm 1,15$	$5,11 \pm 2,01$	$4,54 \pm 0,98$	$4,97 \pm 1,21$	$5,17 \pm 1,45$	$5,57 \pm 1,76$

Для изучения влияния различных инкубационных сред на скорость эмбрионального развития, или время наступления отдельных стадий, нами осуществлялось регистрация наступления следующей стадий эмбрионального развития (рис. 1): стадия 64 бластомеров (7 стадия эмбрионального развития), стадия 50 % обрастания бластодермой (17 стадия), стадия 20–25 сомитов (27 стадия), стадия фарингулы /пигментации глаз (30 стадия), стадия выклева эмбриона из оболочки (34 стадия). Выбор данных стадий был обусловлен тем, что их наступление происходило в рабочее время, что являлось удобным для их регистрации.

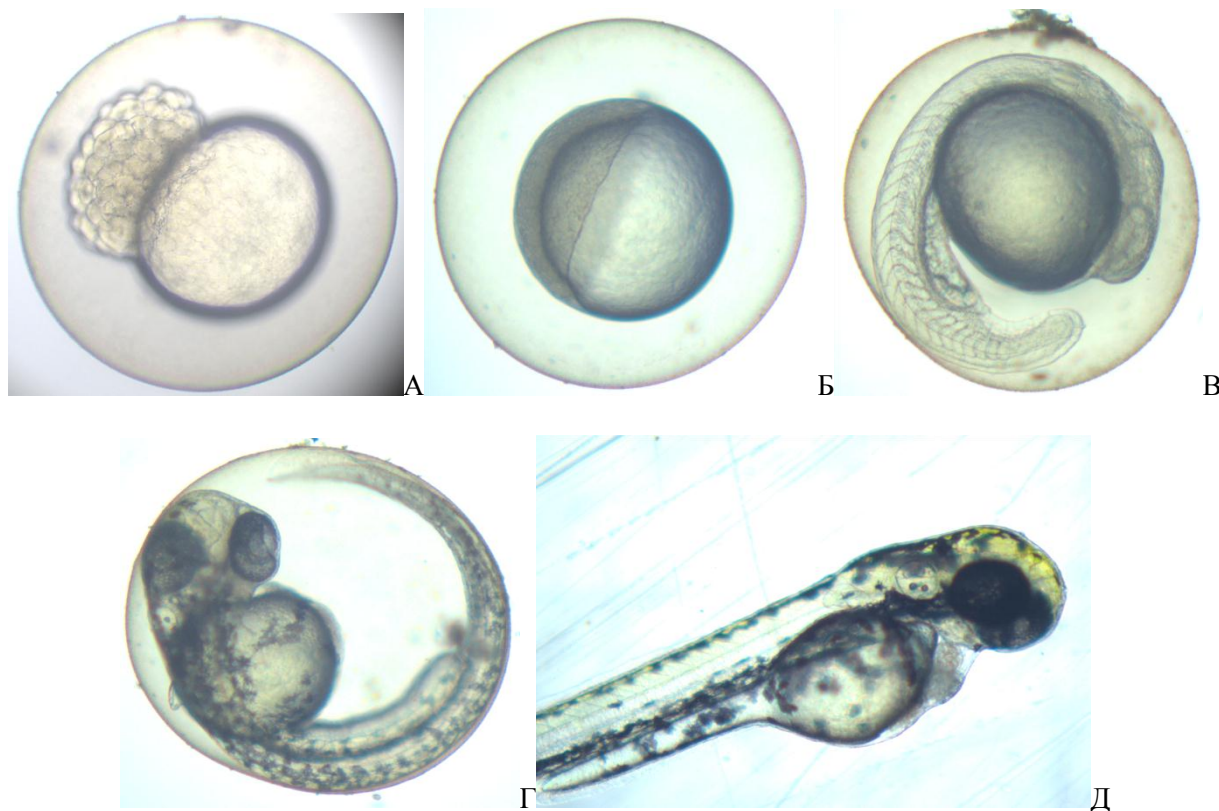


Рис. 1. Внешний вид эмбриона данно рерио на 7 стадии эмбрионального развития (А, стадия 64 бластомеров), на 17 стадии (Б, стадия 50% обрастания бластодермой), на 27 стадии (В, стадия 20-25 сомитов), на 30 стадии (Г, стадия фарингулы /пигментации глаз), на 34 стадии (Д, стадия выклева эмбриона из оболочки). Планахроматический объектив $4 \times / 0,13$. Камера для микроскопа Basler acA2040-55uc

Наступление 7 стадии эмбрионального развития происходило в среднем через 3 часа, 17 стадии – через 8 часов, 27 стадии – через 32,7 часа, 30 стадии – через 54,7 часа, 34 стадии – через 81,5 часа после оплодотворения. Достоверных различий между исследуемыми группами не обнаружено (табл. 2).

Таблица 2. Результаты влияния различных инкубационных сред на время достижения отдельных стадий эмбрионального развития данио рерио

Номер стадии	Номер инкубационной среды					
	1	2	3	4	5	6
7	3	3	3	3	3	3
17	8	8	8	8	8	8
27	32	34	33	31	34	32
30	56	54	55	54	54	55
34	80	84	82	81	83	79

Средняя общая выживаемость эмбрионов за весь период инкубации находилась в пределах $61,3 \pm 1,25$ - $64,5 \pm 1,45$ %, при этом достоверных различий между исследуемыми группами мы не обнаружили (рис. 2).

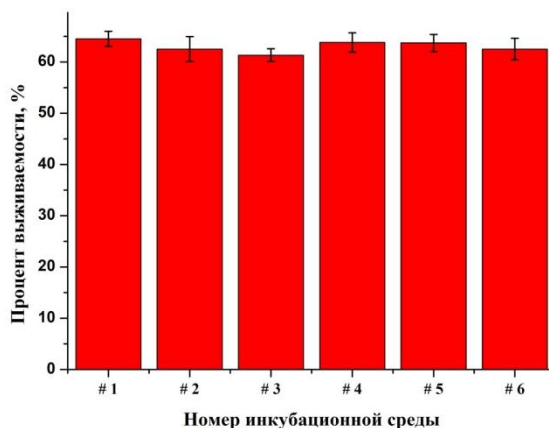


Рис. 2. Результаты влияния различных инкубационных сред на общую выживаемость эмбрионов данио рерио в период инкубации

Общая выживаемость и скорость эмбрионального развития не всегда могут являться основными показателями, характеризующими состояние эмбриона в период эмбрионального развития под влиянием различных внешних факторов. Для более углубленного анализа физиологического состояния эмбрионов нами измерялись основные кардиологические показатели эмбрионов данио рерио после выклева. Частота сердечных сокращений у эмбрионов исследуемых групп находилась в пределах $2,2 \pm 0,16$ – $2,6 \pm 0,15$ ударов сердца за 1 секунду. Достоверных отличий обнаружено не было. Активность кровотока в хвостовой вене у эмбрионов исследуемых групп находилась в пределах $35,26 \pm 4,25$ – $37,56 \pm 5,64$ %. Достоверных отличий также обнаружено не было.

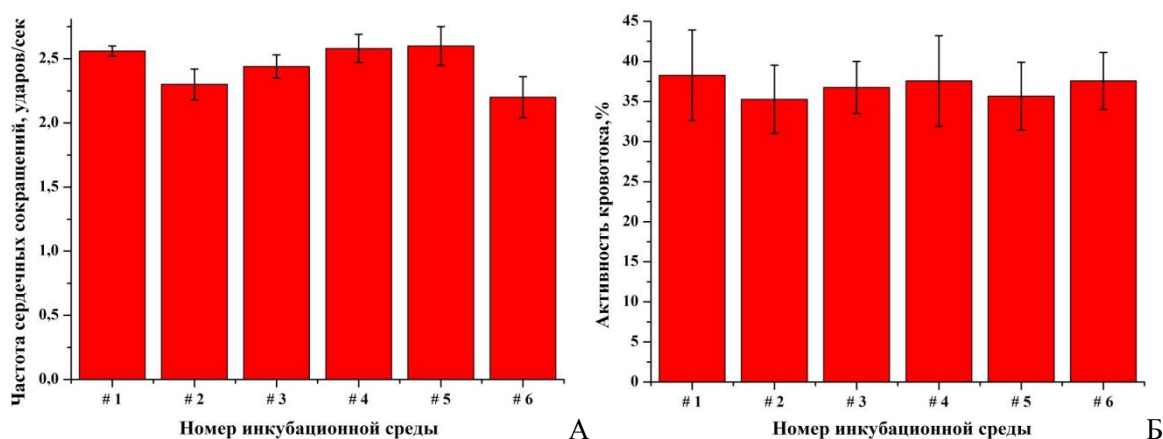


Рис. 3. Результаты влияния различных инкубационных сред на кардиологические показатели свободных эмбрионов на 34 стадии развития (А – частота сокращения сердца, Б – активность кровотока в хвостовой вене)

Заключение

Нами было изучено влияние различных инкубационных сред на эмбриональное развитие модельного объекта данио рерио. Нами изучались такие показатели, как активность эмбрионов через 30 часов после оплодотворения, время достижения отдельных стадий эмбрионального развития, общая выживаемость эмбрионов, частота сокращения сердца и активность кровотока в хвостовой вене у эмбрионов.

В результате проведенных исследований нами было установлено, что исследуемые инкубационные среды не оказывают достоверного влияния на эмбриональное развитие данио рерио, что свидетельствует о том, что для проведения рутинных работ по размножению модельного объекта данио рерио нет необходимости в использовании сложной инкубационной среды (например, среда № 5 и 6). Также необходимо отметить, что добавление метиленового синего в инкубационную среду не вызвало какого-либо достоверного влияния на эмбриональное развитие. Данный краситель используется в аквакультуре и аквариумистике для подавления развития сапролегнии в период инкубации. Однако в данном исследовании мы не изучали влияние метиленового синего на дальнейшее развитие данио рерио. Поэтому мы не рекомендуем использовать какие-либо красители в составе инкубационных сред. Вместо этого мы рекомендуем более тщательно осуществлять ручной отбор мертвых эмбрионов в период инкубации. Использование технологической воды вивария как основной инкубационной среды, или в составе инкубационных сред является непрактичным, т. к. наличие большого количества биогенных элементов способствует более активному развитию сапролегниоза.

Наиболее удобной инкубационной средой для эмбрионов рыб, исходя из проведенных исследований, являются среда № 1 и № 3. Однако, как показал наш длительный опыт воспроизводства данио рерио, качество и состав воды из артезианской скважины может меняться в зависимости от сезона года, а также наличия дождей и частоты чистки станции обезжелезивания, через которую проходит данная вода. Это является не удобным, особенно при проведении научных исследований, которые требуют многократной повторности, т.к. качество артезианской воды может колебаться от эксперимента к эксперименту, что может исказить результаты. Поэтому для проведения научных исследований при работе с эмбрионами данио рерио нами рекомендуется использовать среду № 3, которая в значительной мере защищена от колебаний состава. Также необходимо отметить, что концентрация NaCl может устанавливаться различной для каждой конкретной лаборатории.

ЛИТЕРАТУРА

1. Russell, W. M. S. The principles of humane experimental techniques / W. M. S. Russell, R. L. Burch. – London, UK: Methuen. – 1959.
2. EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to the aspects of the biology and welfare of animals used for experimental and other scientific purposes (EFSA-Q-2004-105) / EFSA J 2005. – Vol. 292. – P. 1–46.
3. Haffter, P. Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish. / P. Haffter, C. Nüsslein-Volhard // Int J DevBiol. – 1996. – Vol. 40. – P. 221–227.
4. Lieschke, G. J., Currie, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view / G. J. Lieschke, P. D. Currie // Nat Rev Genet. – 2007. – Vol. 8. – P. 353–367.
5. Skromne, I. Current perspectives in zebrafish reverse genetics: moving forward / I. Skromne, V. E. Prince // DevDynam. – 2008. – Vol. 237. – P. 861–82.
6. Nüsslein-Volhard C, Dahm R. Zebrafish: a practical approach / C. Nüsslein-Volhard, R. Dahm // USA: Oxford University Press. – 2002.
7. Shin, J. T. From zebrafish to human: modular medical models / J. T. Shin, M. C. Fishman // Annu Rev Genomics Hum Genet. – 2002. – Vol. 3. – P. 311–340.
8. Zon, L. I. In vivo drug discovery in the zebrafish / L. I. Zon, R. T. Peterson // Nat Rev Drug Discov. – 2005. – Vol. 4. – P. 35–44.
9. Zebrafish (Danio rerio) embryos as a model for testing proteratogens / S. Weigt [et al.] // Toxicology. – 2011. Vol. 281. – P. 25–36.
10. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations / U. Strähle [et al.] // Reproductive Toxicology. – 2012. – Vol. 33.2. – P. 128–132
11. Барулин, Н. В. Лазерное излучение как важный элемент технологии аквакультуры / Н. В. Барулин, М. В. Шалак, В. Ю. Плавский // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. – 2008. – № 3. – С. 82 – 85.
12. Барулин, Н. В. Рекомендации по воспроизводству осетровых рыб в рыбоводных промышленных комплексах с применением инновационных методов / Н. В. Барулин, В. Ю. Плавский, К. Л. Шумский, Л. О. Атрощенко, Е. Г. Новикова, С. В. Роговцов, М. С. Лиман – Горки : БГСХА, 2016. – 203 с.
13. Барулин, Н. В. Стратегия развития осетроводства в Республике Беларусь / Н. В. Барулин // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук. – 2017. – № 2. – С. 82–90.
14. Плавский, В. Ю. Влияние лазерного излучения инфракрасной области спектра на устойчивость молоди осетровых рыб к дефициту кислорода / В. Ю. Плавский, Н. В. Барулин // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2008. – №. 8–9. – С. 65–74.
15. Kostousov, V. G. Development of industrial fish culture in Belarus / V. G. Kostousov, N.V. Barulin. – p. 44 – 48 // Handbook: Recirculation technologies in indoor and outdoor systems; Edited by: Peter Lengyel [et al.]. – Szarvas, Hungary: Research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation, 2013. – 92 p.
16. https://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/hatch_stgs.html#Pec-fin
17. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. – 2017. – URL <https://www.R-project.org/>.