

исследованные группы рыб отличаются между собою. Охарактеризованы особенности активности неферментативного звена системы антиоксидантной защиты в крови карпов в процессе онтогенеза.

THE DYNAMICS OF ACTIVITY OF NON ENZYMATIC LINK IN THE SYSTEM OF ANTIOXIDANT PROTECTION IN CARPS' BLOOD OF NESVICH ZONAL TYPE IN THE PROCESS OF ONTOGENESIS

I. Osoba, I. Grytsyniak

The comparative analysis of state of non enzymatic link in the system of antioxidant protection of one and two years old scaled and framed carps' sera blood of nesvich zonal type have been carried out. In the beginning of vegetation period the contents of retinol in the blood of one year old fish was in track quantity and according to the contents of tocopherol the groups of fish which are under investigation are different between each other have been determined. Have been characterized peculiarities of the activity of non enzymatic link in the system of antioxidant protection in carps' blood in the processes of ontogenesis.

УДК 597-1.044:628.394

ВИКОРИСТАННЯ ЕМБРІОНІВ *DANIO RERIO* У ТОКСИКОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

В.О. Черепнін

Інститут рибного господарства НААН

*Висвітлені основні сучасні методи використання *Danio rerio* для токсикологічних досліджень*

В Європі на даний час зареєстровано близько 100 тис. хімічних сполук, що мають комерційне застосування [1]. Згідно з новим законодавством ЄС [2] всі хімічні сполуки (як ті, що вже використовуються, так і ті, що проходять сертифікацію), сировина для їх отримання та проміжні продукти, щорічний об'єм виробництва яких перевищує 1000 кг, підлягають перевірці на токсичність. Під ці вимоги підпадають приблизно 30 тис. сполук.

Для дослідження їх токсичності Організація з економічного партнерства і розвитку (OECD) рекомендує використання відповідних модельних організмів та ряд біологічних тестів. Ці методики поділяються на гострі (96 год) та хронічні (14 діб). Смертність організмів у ході досліду є досить невизначеним інтегральним показником і залежить від концентрації і токсичності речовин, що перевіряються.

Запропоновані тести є доволі малоінформативними, позаяк дають змогу

визначити смертельну концентрацію, але нічого не говорять про механізм дії токсиканта. Крім того, проведення експериментів на дорослих тваринах спричиняє багато нарікань з погляду біоетики. Тому основною метою дослідників було створення такої методики, яка б дала можливість проводити оперативне тестування з визначенням механізму токсичного впливу на молекулярному рівні без використання дорослих тварин [3]. Очевидні переваги тест-систем *in vitro* включають короткі експозиції і обмежену кількість біологічного матеріалу. Проте неможливість екстраполювати на хребетних тварин результати, отримані при тестуванні на безхребетних організмах, потребувала вдосконалення існуючих методик біотестування.

Токсикологічні дослідження з використанням ембріонів данію (*Danio (Brachydanio) rerio*) почались уже досить давно [4]. Використання її як успішної моделі відоме з початку нового тисячоліття. На сьогодні це загальновизнана

модель для досліджень у царині біології і медицини.

Danio (Brachydanio) rerio в природних умовах мешкає у прісних водах східної частини узбережжя Індії і була описана ще у 1822 р. Вперше до Європи ця рибка потрапила у 1905 р. і швидко набула неабиякої популярності серед акваріумістів завдяки простоті умов утримання і відтворення. Зацікавлення вчених вона викликала в зв'язку з пошуками оптимальної хребетної моделі для біотестування, оскільки результати отримані при використанні таких традиційних об'єктів, як комахи (плодова мушка дрозофіла), ракоподібні (дафнії), рослини (деякі водорості) не могли адекватно інтерпретуватись щодо подібності впливу токсичних агентів на життєдіяльність інших організмів. Методики біотестування з використанням гризунів часто виявляються малоприматними в зв'язку з низькою пропускною здатністю, складністю і високою вартістю. При застосуванні до гризунів ембріотоксикологічних тестів справа погіршується відносно великими термінами вагітності і обмеженою кількістю приплоду.

Використання у подібних дослідженнях ембріонів даніо виявляє низку переваг порівняно з іншими методиками:

- ембріони її легкопроникні для низькомолекулярних сполук, що можуть бути внесені безпосередньо до інкубаційного контейнера;
- прозорий хоріон дає змогу вести спостереження за розвитком ембріона;
- ікринка розвивається досить швидко і за 4 доби перетворюється на вільно плаваючий ембріон;
- через 3 доби після запліднення в ембріона функціонують кровоносна і нервова системи;
- на різних стадіях розвитку ембріона доступне вивчення елементарних тканин, диференціації органів та їх функціонування;
- при дослідженні гострої токсичності (LD_{50}) можливе паралельне проведення спостережень за смертністю і тератогенним впливом сполук що досліджуються [5].

Крім того, *Danio rerio* активно вивчала біологічна наука в найширших її аспектах протягом останніх десятиліть. Ця рибка

була першим видом хребетних, геном якого було прочитано. Завдяки цьому факту вона стала одним з улюблених об'єктів у царині молекулярної генетики і біології розвитку [6].

Оцінюючи можливість використання даніо як прогностичну модель для оцінки ембріотоксичності і безпеки застосування ліків, перевірено 12 сполук, для яких було визначено величину LD_{50} , а також (використовуючи протокол візуальної оцінки) відхилення в розвитку ембріонів [7].

Результати порівнювали з тератогенністю цих сполук у дослідах на ссавцях. При визначенні нетератогенних сполук ідентичні ефекти спостерігались у 75% випадків, а для тератогенних — у 100% [8].

Ембріони даніо використовують для визначення як загальної, так і специфічної токсичності щодо органів і тканин. Отримані результати свідчать, що дія деяких хімічних сполук, зокрема ліків, на різні органи у даніо і ссавців є тождною [9].

Цікавим у науково-практичному плані є той факт, що більшість генів у даніо мають гомологи у людини, а деякі функціональні домени білків, як наприклад АТР-сполучні домени кіназ, — стовідсоткову ідентичність. Позаяк сполучення деяких хімічних речовин, зокрема ліків, часто відбувається на функціональних доменах, використання даніо як модельного об'єкта у прогнозуванні їх дії на людину є досить обґрунтованим [10].

Завдяки протеомним методам стало можливим проводити реєстрацію токсичних ефектів на молекулярному рівні в реальному часі, аналізуючи білковий склад клітин тканин і органів даніо. Ці методи в останні роки були значно спрощені завдяки використанню аналітичної мас-спектрометрії при ідентифікації білків. Зміни у білковому складі після впливу токсикантів допомагають визначити нові діагностичні стресові маркери. Наприклад, продукти розщеплення основних білків жовтка — вітелогенінів можуть слугувати індикаторами токсичного стресу в ембріонів даніо [11].

Використовуючи молекулярно-генетичні методи стало можливим оцінювати вплив тератогенних речовин у підгостро-

му діапазоні. Нова методика отримала назву *молекулярного тератогенного тесту Danio rerio* (MolDarT) [12, 13].

Цей нескладний тест із залученням ПЦР-аналізу в реальному часі дає змогу визначити дію токсикантів за їх впливом на мРНК як проміжну ланку між геном і білком. Порівняння дослідних і контрольних груп ембріонів — визначити наявність впливу токсиканта на кількість мРНК і відповідно експресію гена. Було встановлено, що ген *vitellogenin 1*, експресія якого вже була достатньо вивчена, може слугувати біомаркером для естрогеноподібних речовин. Він кодує протеїни запасного жовтка ембріонів риб, і його активність регулюється ендогенними естрогенами. Зазвичай цей механізм задіяний лише у статевозрілих самок, проте такий ефект може спостерігатися і у самців при наявності естрогенів чи естрогеноподібних речовин у навколишньому середовищі. Експресія гена вітелогеніну впевнено детектується в період 48–120 год після запліднення.

Було встановлено, що такі речовини, як протизаплідний оральний гормон етилестрадіол і бісфенол А (наймасовіший естрогеноподібний забруднювач водного середовища, який використовується у виробництві полікарбонатних пластмас) стимулюють активність гена *vitellogenin 1* залежно від концентрації і часу його експозиції [14].

MolDarT є універсальним модульним тестом, який можна застосовувати за умови використання відповідних генетичних маркерів. Швейцарські дослідники зараз пропонують такі відпрацьовані генетичні тести:

- тест на естрогеноподібні речовини (ген *vitellogenin 1*);
- імунотоксикологічний тест (ген активації перекомбінації);
- тест на важкі метали (ген *metallothionein 2*);
- токсичність поліциклічних ароматичних вуглеводнів і діоксинів (генне кодування ароматази для цитохрому P450).

Ці тести виконуються швидко і дешево, потребують незначної кількості

клітинного матеріалу і можуть бути використані для аналізу речовин невідомого складу з метою оцінки можливих ризиків [15]. Крім використання у екотоксикології, данію все частіше використовують у фармакогеноміці [16].

В умовах неможливості застосування протеоміки і методів токсигеноміки, можливе використання більш звичних гострих і хронічних тестів на ембріонах данію для оцінки токсичних ефектів. Такі тести допомагають визначити не лише смертність, а й порушення розвитку ембріонів, тератогенність токсикантів.

Цікаві результати були отримані при оцінці токсичного впливу тонких плівок, які утворюються на плоских непроникних поверхнях у міських умовах і мають у своєму складі *n*-алкани, поліхлоровані ароматичні вуглеводи і поліхлоровані дифеніли. Виконані експерименти показали, що інкубація ікри данію в екстракті з вказаних плівок, призводила до летальних наслідків, а у випадку використання розчинів зі зниженою концентрацією, було виявлено істотний вплив цих сполук на серцево-судинну діяльність та нервову систему [16].

На законодавчому рівні для біологічного тестування якості води вже передбачається використання ембріонів данію [17].

Варто зауважити, що для успішного використання описаних методів серйозну увагу треба приділяти генетичній однорідності при розведенні плідників данію. Неприпустиме використання ембріонів невизначеного походження і рівня гетерозиготності, бо результати токсикологічних досліджень можуть бути значно спотворені.

Аналізуючи наведену вище інформацію, можна дійти висновку про значний розвиток методів протеоміки, токсигеноміки і фармакогеноміки. На особливу увагу заслуговує той факт, що використовуючи порівняно недорогі та доступні експресметоди, вже зараз можливе визначення вмісту важких металів, діоксинів і токсичних гормоноподібних речовин у природних водах, кормах і товарній рибі.

ЛІТЕРАТУРА

1. <http://ecb.jrc.it/esis/>
2. http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_intro.htm

3. Schweigert N. (2001): How can the degree of pollutant impact on a stream be documented? *Eawag News* 51. — P. 10–12.
4. Thomas R.J. (1975): The toxicologic and teratologic effects of $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol in the Zebrafish embryo // *Toxicology and Applied Pharmacology*. — Vol. 32, Issue 1. — P. 184–190.
5. Nagel R. (2002): DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* — a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex-Alternativen zu Tierexperimenten* 19. — P. 38–48.
6. The Zebrafish: Genetics, Genomics and Informatics (2004) // Elsevier Acad. Press. — Vol. 77. — 686 P.
7. Seng W.L. (2007): *Toxicologist*, 96 (Suppl.), 145.
8. McGrath P., Li Chun-Q. (2008): *Drug Discov // Today*. — 13. — P. 394–401.
9. Kari G., Rodek U., Dicker A.P. (2007) *Clin. Pharmacol. Therapeut.* — 82. — P. 70–80.
10. Goldsmith P. (2004): *Curr. Opinion in Pharmacol.* — 4. — P. 504–512.
11. Gundel U. et al (2007): *Proteomics*. — 7. — P. 4541–4554.
12. Muncke J., Eggen R.I.L. (2006): Vitellogenin 1 mRNA as an early molecular biomarker for endocrine disruption in developing zebrafish (*Danio rerio*) // *Environmental Toxicology and Chemistry*. — 25 (10). — P. 2734–2741.
13. Muncke J., Junghans M., Eggen R.I.L. (2007): Testing estrogenicity of known and novel (xeno-)estrogens in the MolDarT using developing zebrafish (*Danio rerio*) // *Environmental Toxicology*. — 22 (2). — P. 185–193.
14. Sumpter J.P., Jobling S. (1995): Vitellogenesis as a bio-marker for estrogenic contamination of the aquatic environment // *Environmental Health Perspectives*. — 103. — P. 173–178.
15. *Eawag News: Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology* (2008) June, 64e, 1–36.
16. Беляева Н.Ф. и др. (2010): Зебрафиш как модель в биомедицинских исследованиях // *Биомедицинская химия*. — Т. 56. — Вып 1. — С. 120–131.
17. Федеральное агентство по рыболовству. Приказ от 4 августа 2009 г. № 695. Об утверждении методических указаний по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения.
18. <http://tramabourtz.info/>

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭМБРИОНОВ *DANIO RERIO* В ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

В.А. Черепнин

Освещены основные современные методы использования *Danio rerio* для токсикологических исследований.

USE OF EMBRYOS OF A *DANIO RERIO* IN TOXICOLOGICAL RESEARCHES

V. Cherepnin

The basic modern methods of use of a *Danio rerio* for toxicological researches are considered.