

ВЛИЯНИЕ СВИНЦА НА РАЗВИТИЕ ЭМБРИОНОВ И ЛИЧИНОК РЫБОК ДАНИО

Т.М. Шалахметова^{ID}, А.М. Тленшиева*^{ID}

Казахский национальный университет имени Аль-Фараби, Алматы, Казахстан

*arshynmuratkyzy@gmail.ru

Аннотация. Ранние стадии развития водных организмов, включая рыб, по своей природе уязвимы к воздействию свинца (Pb) и других загрязняющих воду металлов. Однако сообщения о пагубном воздействии экологически значимых уровней Pb ограничены. С этой целью мы подвергали эмбрионы старых рыбок Данио рерио (*Danio rerio*) через 2,5 ч после оплодотворения (часа) воздействию ряда концентраций Pb, охватывающих экологически значимые уровни (10µM; 20µM; 40µM; 60µM), до 120ч. Воздействие негативно повлияло на развитие и выживаемость эмбрионов рыбок данио, вызвав смертность, связанную с коагуляцией эмбрионов, в зависимости от концентрации. При 24 hpf самый высокий уровень воздействия (60µM Pb) приводил к нарушению активности эмбрионов, характеризующемуся снижением активности всплесков и количества движений, совершаемых эмбрионами в минуту. При 72 hpf все эмбрионы вылупились во всех концентрациях воздействий. Наблюдалось морфологические аномалии и повышение экспрессии мРНК. Эти результаты свидетельствуют о том, что содержание Pb в пределах экологически значимых уровней может быть вредным для развивающихся рыбок данио.

Ключевые слова: зебрафиш; свинец; тяжелый металл; эмбриология; ген экспрессия.

Введение

Тяжелый металл Pb является еще одним основным токсичным металлом, источником которого является окружающая среда в результате естественных процессов и неправильного обращения с отходами. В течение последних 100 лет свинец использовался исключительно в красках, консервировании, производстве игрушек, пестицидов, свинцовой дроби и в качестве добавки к газам [1]. В Соединенных Штатах использование свинца во многих продуктах было запрещено с 1970-х годов, однако свинец продолжает загрязнять нашу окружающую среду и содержится в пыли, уличной грязи, почве, воде и продуктах питания [2]. Существующие источники свинца воздействие включает прошлые выбросы этилированного бензина, накапливающегося в почве, заброшенные промышленные объекты, плавильные производства, старые дома с этилированной краской и свинцовыми трубами, а также импортные игрушки [3]. Кроме того, загрязнению свинцом могут способствовать различные домашние хобби, в том числе керамика и витражи. Поскольку свинец использовался во всем мире и в таких огромных количествах, уменьшить его содержание в нашей окружающей среде невозможно. Хроническое воздействие низких концентраций свинца является распространенной проблемой для здоровья, и острое отравление свинцом все еще может иметь место, особенно среди социально-экономических групп, находящихся в неблагоприятном положении, и в развивающихся странах, где отсутствуют политика и экологические нормативы. Воздействие Pb в процессе развития связано с изменениями в поглощении незаменимых металлов и молекул в головном мозге, усилением таупатии и патологии, подобной болезни Альцгеймера, уменьшением количества молекул с плотными соединениями и изменением дифференцировки нейронов [4].

Модель рыбки данио стала особенно популярной в лабораторных условиях, учитывая ее генетическое и эмбриологическое сходство с позвоночными высшего порядка, включая человека [5]. Рыбки данио имеют высокую степень гомологии с геномом человека и таким образом, моделирование заболеваний человека у рыбок данио в настоящее время является обычным явлением. С токсикологической точки зрения рыбки данио особенно полезны,

поскольку их развитие очень хорошо охарактеризовано и все стадии токсикологическая оценка может быть проведена внутриутробно. Особое токсикологическое значение для модели имеет то, что у них развиваются органы, специфичные для преобразования токсинов, такие как печень, на очень ранней стадии их развития. Они также имеют одни и те же метаболические пути в печени и цитохром P450 (CYP). Гены, большинство из которых являются прямыми ортологами человеческих CYPs [6]. Таким образом, рыбки данио могут предоставить информацию, которую невозможно было бы получить с помощью других моделей, и знания о механизмах токсичности для развития необходимы. редки [7]. Поскольку геном рыбок данио был секвенирован, флуоресцентных трансгенных рыбок данио относительно легко сконструировать, и они хорошо визуализируются в оптически прозрачном эмбрионе рыбок данио. Поскольку рыбки данио быстро взрослеют, можно оценить трансгенерационные последствия воздействия токсинов [8]. С экотоксикологической точки зрения рыбки данио широко использовались для изучения тяжелых металлов, химических веществ, разрушающих эндокринную систему, и стойких органических загрязнителей [9]. Экспрессия CYP1A1. Считается, что CYP1A1 является основным внепеченочным ферментом, участвующим в метаболизме канцерогенов. Следовательно, многочисленные исследования изучали характер экспрессии CYP1A1 во внепеченочных тканях, которые в значительной степени подвергаются воздействию канцерогенов окружающей среды, таких как легкие [10]. Здесь мы исследуем, воздействие свинца при разных концентрация для определения выживаемость и определения экспрессию гена CYP1A при разных дозах эффекта.

Материалы и методы

В эксперименте использовались особи, достигшие половой зрелости и достигшие длины 4 см. Рыб содержали в 15-литровых аквариумах с естественным освещением, насыщенностью около 80% кислорода и обычный средний уровень pH 6,5-8. Идеальная температура для разведения зебрафиша - 25-28°C. Рацион состоял из сухого корма, дополненного витаминами и живыми ракообразными семейства А. Для предотвращения грибковых инфекций при каждой замене воды добавляли капли метиленового синего. Для обработки рыб добавляли 5 мл раствора на каждые 10 л аквариумной воды. Самцов содержали отдельно от самок и содержали в одном аквариуме только во время нереста. Чтобы метод ZFET работал должным образом, яйцеклетки должны быть быстро распределены по чашкам Петри, и на момент распределения они должны находиться на стадии зиготы (оплодотворенные яйцеклетки) [10]. Эмбрионы распределяли по 20 штук в подготовленные чашки Петри диаметром 90 мм, которые уже содержат растворы. Эмбрионы белого амура подвергали воздействию сублетальных концентраций PbSO₄ (10µM; 20µM; 40µM; 60µM). Каждые 12 часов наблюдались изменения.

Выживаемость [%] = (Количество жизнеспособных личинок при 144 личинках в час × 100) / Количество вылупившихся личинок

Для сравнения была распределена часть яиц в контрольной отфильтрованной воде. Стереомикроскоп Leica DMLB2 и Micros MC20 использовались для записи и фотографирования каждого процесса развития. Прозрачный хорион эмбрионов и прозрачная оболочка мальков позволяют наблюдать за их развитием даже по истечении 72 часов.

Скорость вылупления [%] = (Количество оплодотворенных яиц × 100) / Количество вылупившихся личинок

Общая РНК была выделена из личинок (n=15) с помощью мини-набора RNeasy (cat.nos.Cat. № / ID: 74004). Очистку тотальной РНК из клеток, тканей и дрожжей (Qiagen) проводили в соответствии с инструкциями производителя, а синтез кДНК осуществляли с использованием обратной транскрипции (iScript™ Reverse Transcription Supermix, BioRad). Количественную ПЦР в реальном времени (qRT-ПЦР) проводили с помощью набора SybrGreen master mix (CW0659, CoWin Biosciences, Цзянсу, Китай) с использованием StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Уолтем, Массачусетс, США) Последовательности

праймеров тестируемых генов приведены в таблице 1. Мы рассчитали относительные уровни экспрессии каждого гена с помощью метода $2^{-\Delta\Delta CT}$ и нормализовали их в соответствии с относительной экспрессией β -актина.

Таблица 1. Праймеры, используемые в ПЦР в реальном времени

Gene name	Forward primers (5' → 3')	Reverse primers (3' → 5')
β - actin	TGTGTGACTTCCTGTGTTGGT	GCCACCTACAACACCCAGTTT
CYP1A	TACGCATCCCATCTCTCCCA	GGAAACCAGTCCCCCAACAG

Результаты

Выживаемость зебрафиша во время эмбрионального и раннего личиночного развития в контрольных условиях составила 97% и при воздействия Pb в 10 μ M и 20 μ M не показало существенного различия. А в концентрации 40 μ M $p < 0,01$ и самый значимый показатель для выживаемости зебрафиша было 60 μ M с разницей $p < 0,05$ значительно снижали эти показатели в зависимости от концентрации (рисунок 1).

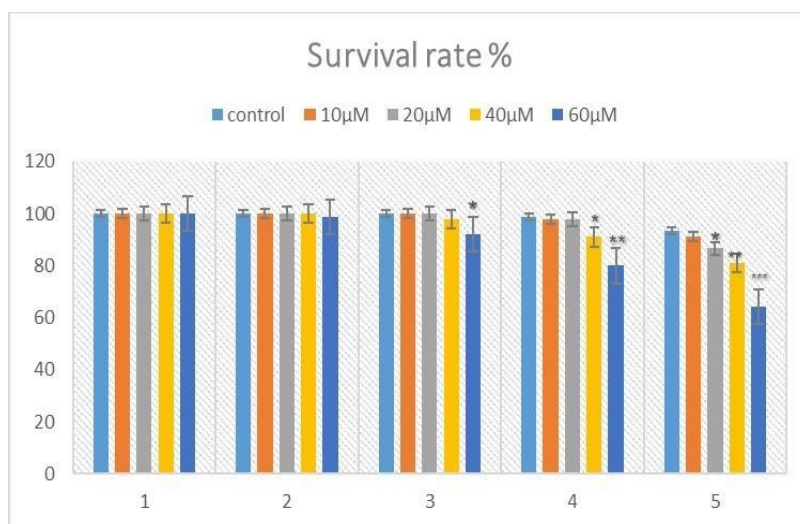


Рисунок 1. Выживаемость эмбрионов/личинок рыбок данио при воздействии PbSO₄ (N=20; 3 раза повторно). (среднее значение $\pm$ S.D., ANOVA, HSD-тест Тьюки, разные буквенные надстрочные индексы указывают на достоверные различия при $p < 0,05$). * * 1-32 ч.; 2-48 ч.; 3-72 ч.; 4-96 ч.; 5-120 ч.;

Таблица 2. Влияние различных концентраций Pb на скорость вылупления эмбрионов показано 57ч.и 72ч. Значения представляют собой средний ответ ($\pm$ SD) из трех повторений, разные буквенные индексы указывают на значимые различия при $p \leq 0,05$, односторонний ANOVA с последующим тестом Тьюки.

Воздействие	32 hpf	57 hpf	72 hpf
Control	0,00 $\pm$ 0,00	61.3 $\pm$ 2,06 ^a	100 $\pm$ 0,00
10 μ M	0,00 $\pm$ 0,00	54.3 $\pm$ 1.0 ^a	100 $\pm$ 0,00
20 μ M	0,00 $\pm$ 0,00	51.5 $\pm$ 1.5 ^a	100 $\pm$ 0,00

40 μ M	0,00 $\pm$ 0,00	24.0 $\pm$ 2.0 ^b	100 $\pm$ 0,00
60 μ M	0,00 $\pm$ 0,00	1,19 $\pm$ 1.5 ^c	100 $\pm$ 0,00

Мы оценили скорость вылупления после оплодотворения до 72 ч (рис. 1). В контрольных условиях 61,3 % эмбрионов вылупились через 57 часов после оплодотворения. Самый низкий процентильность вылупления было в 60 μ M. В результате все эмбрионы во всех концентрациях вылупились через 72 часа.



Рисунок 2. “Хорион” представляет эмбрионы, которые все еще находятся в своем хорионе и вылупились при 57 hpf.

Морфологические аномалии у личинок зебрафиша при 120ч. были зарегистрированы для каждой особи, количественно сведены в рисунке 2 и показаны (примеры) на рис. 2. Процент аномальных личинок в контрольных группах составил около 91,65 %. А во второй группе эксперимента 10 μ M 63,35% нормальной процентность личинок и 11,65 процент в загнутый вверх и вниз хвост. На 20 μ M 55% нормальная морфологическая развития и остальной процент заняли аномалий такие как: загнутый вверх и вниз хвост, едема, вниз изогнутый рыб. В 40 μ M нормальный морфологическая развития сотовляло 45 процентность и самая большая аномалия было 16,7 процент верх изогнутый хвост. А самый мальый показатель по нормальной развитий сотовляло 31,65% в 60 μ M и 21,7% показало едема.

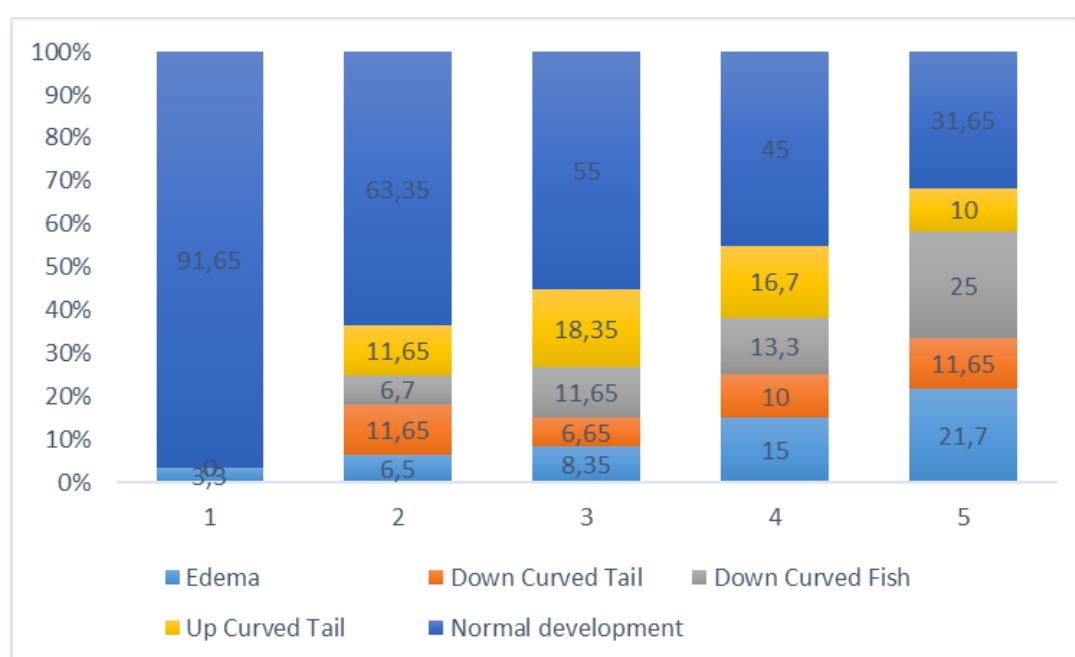


Рисунок 3. Примеры изображений, представляющих все проанализированные фенотипы при 120 ч. Эмбрионы с дефектом “без фенотипа”, также называемые “нормальными” эмбрионами (А), не имеют никакого фенотипа. “Мертвый” фенотип (В) показан как полностью некротизированный, отсутствие плавательного пузыря (С-10 мкм) В “Загнутом вниз хвосте” (D-20 мкм), хвост явно ориентирован вниз по сравнению с горизонталью. “Изогнутая книзу рыба” (Е -40 мкм) и “Изогнутый вверх хвост” (F-60 мкм) - это два слегка отличающихся фенотипа. При фенотипе “Отек” (G-60 мкм) отек обычно окружает переднебрюшинную часть рыбы. У эмбриона с “изогнутым вверх хвостом” имеется искривление на спине (что-то вроде лордоза/ К), тогда как у фенотипа с “изогнутым вверх хвостом” искривление расположено на хвосте.



Чрезмерное воздействие свинца влияют на сокращений сердцебиение рыба зебрафиша. В этом эксперименте мы также на 120 часов развития зебрафиша мы смогли посчитать количество сердцебиение. Результаты анализа показано в рисунке 4. Контрольная группа за минуту 156 ударов в минуту и самый большой концентрации свинца было 108 ударов в минуту.



Рисунок 4. Частота сердечных сокращений личинок рыбок данио через 120 часов после оплодотворения (N=10). (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, ANOVA, критерий Тьюки HSD, разные буквенные верхние индексы указывают на значительные различия при $p < 0,05$).

Сравнение уровней экспрессии CYP1A гена детоксикации 40 и 60 μM показало, что уровни экспрессии были значительно выше по сравнению с другими группами, чем у 10 и 20 μM ($P < 0,05$; рисунок 4).

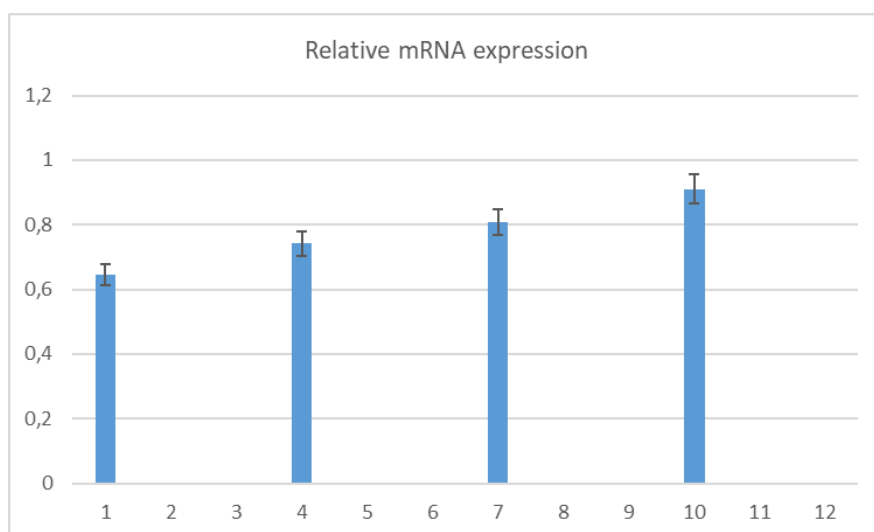


Рисунок 5. Изменения в относительной экспрессии мРНК (CYP1A) под действием PbSO_4 в контроле; 20 мкм; 40 мкм; 60 мкм при 120 ч. 1-контроль; 2-20 мкм; 3-40 мкм; 4-60 мкм;

Заключение

Свинец, растворенный в воде, представляет угрозу для водных организмов даже в самых незначительных количествах. Концентрации Pb в воде, которые ниже и находятся в пределах “допустимого предела” (Pb), могут быть вредны для жизни рыбок данио, особенно на ранних стадиях развития, о чем свидетельствует смертность, связанная с эмбриональной коагуляцией. Кроме того, наши тестовые концентрации ZFET позволили получить дополнительную информацию о концентрациях свинца в воде. Таким образом, мы проанализировали уровни экспрессии мРНК, распределение по активности различных концентраций свинца CYP1A, у

развивающихся личинок рыбок данио. В заключение, исходя из наших результатов, мы считаем, что рыба данио является подходящей моделью для использования в процессе разработки с токсичными метаболитами, и что метаболическая активность развивающихся рыбок данио нуждается в детальном выяснении для более точной оценки воздействия тяжелых металлов.

Конфликт интересов: Авторы не имеют конфликта интересов.

Литературы

1. Chen J. Developmental lead acetate exposure induces embryonic toxicity and memory deficit in adult zebrafish // *Neurotoxicol. Teratol.* -2012.— Vol. 79. – P. 727-747.
2. Bakkers J. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. // *Cardiovasc Res* - 2011.- Vol. 91:279–288. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr098>
3. Brox S. Metabolism of clofibric acid in zebrafish embryos (*Danio rerio*) as determined by liquid chromatography-high resolution-mass spectrometry // *Comp. Biochem. Physiol.* - 2016.- Vol.41: 21-33
4. Jönsson M., Basal E. and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced expression of cytochrome P450 1A, 1B and 1C genes in zebrafish // *Toxicol. Appl. Pharmacol* - 2007.-
5. Schneider, J. S., Lee, M. H., Anderson, D. W., Zuck, L. & Lidsky, T. I. Enriched environment during development is protective against lead-induced neurotoxicity // *Brain Res.* - 2001.- 896, 48–55.
6. Anderson, D. W., Mettil, W. & Schneider, J. S. Effects of low level lead exposure on associative learning and memory in the rat: Influences of sex and developmental timing of exposure // *Toxicol. Lett.* - 2016 - 246, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.01.011> .
7. Schweizer, M., Brilisauer, K., Triebkorn, R., Forchhammer, K., Kohler, " H.-R., How glyphosate and its associated acidity affect early development in zebrafish (*Danio rerio*). // *PeerJ.* - 2019-Vol. 7
8. Bambino K., Chu J. Zebrafish in toxicology and environmental health. *Curr Top Dev Biol.* - 2017- Vol.124:331–367. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.10.007>
9. Braunbeck T, Kais B, Lammer E, Otte J, Schneider K, Stengel D, Strecker R The fish embryo test (FET): origin, applications, and future // *Environ Sci Pollut Res.* - 2015- Vol.22:16247–16261. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3814-7>
10. Glass A.S., Dahm R. The zebrafish as a model organism for eye development // *Ophthalmic Res.* - 2004- 36:4–24. <https://doi.org/10.1159/000076105>
11. Troxel C.M. CYP1A induction by beta-naphthoflavone, Aroclor 1254, and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and its influence on aflatoxin B1 metabolism and DNA adduction in zebrafish
12. Otte J.C. Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*) // *Aquat. Toxicol.* - 2010- Vol.4- 45-56
13. Stoilov I., Jansson I., Sarfarazi M., Schenkman J.B. Roles of cytochrome p450 in development // *Drug Metabol Drug Interact.* - 2001- Vol. 18: 33-55.

ҚОРҒАСЫННЫҢ ЗЕБРА БАЛЫҒЫНЫҢ ЭМБРИОЛОГИЯЛЫҚ ЖӘНЕ ДЕРНӘСІЛДІК ДАМУЫНА ӘСЕРІ

Т.М. Шалахметова , А.М. Тленшиева* 

Аль-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті, Алматы, Қазақстан
*arshynmuratkyzy@gmail.ru

Аннотация. Су организмдерінің, оның ішінде балықтардың дамуының алғашқы кезеңдері қорғасынның (Pb) және басқа да суды ластайтын металдардың әсеріне өте осал. Алайда, Pb-ның экологиялық маңызды деңгейлерінің зиянды әсерлері туралы есептер шектеулі. Осы мақсатта біз ұрықтанғаннан кейін 2,5 сағаттан кейін (бірнеше сағаттан кейін) Ескі *Danio rerio* эмбриондарын қоршаған ортаның маңызды деңгейлерін (10 мкм; 20 мкм; 40 мкм; 60 мкм) қамтитын Pb концентрациясының диапазонына ұшыраттық, 120 сағатқа дейін. Экспозиция зебрабалық эмбриондарының дамуы мен тіршілігіне теріс әсер етіп, концентрациясына байланысты эмбрионның коагуляциясымен байланысты өлімді тудырды. 24 сағат кезінде экспозицияның ең жоғары деңгейі (60 мкм Pb) эмбриондардың белсенділігінің төмендеуіне әкелді, бұл жарылыс белсенділігінің төмендеуімен және эмбриондар минутына орындайтын қозғалыстар санымен сипатталады. 72 hpf кезінде барлық эмбриондар экспозицияның барлық концентрациясында жұмыртқадан шықты. Морфологиялық ауытқулар және мРНҚ экспрессиясының жоғарылауы байқалды. Бұл нәтижелер экологиялық маңызды деңгейлердегі Pb мазмұны зебрабалықтың дамуына зиянды болуы мүмкін екенін көрсетеді.

Түйін сөздер: зебрафиш; қорғасын; ауыр металл; эмбриология; ген экспрессия.

THE EFFECT OF LEAD ON THE DEVELOPMENT OF EMBRYOS AND LARVAE OF DANIO RERIO

T.M. Shalkhmetova , A.M. Tlenshiyeva* 

Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan
*arshynmuratkyzy@gmail.ru

Abstract. The early stages of development of aquatic organisms, including fish, are inherently vulnerable to the effects of lead (Pb) and other water-polluting metals. However, reports of harmful effects of environmentally significant Pb levels are limited. To this end, we exposed the embryos of old *Danio rerio* fish 2.5 hours after fertilization (hours) to a range of Pb concentrations covering environmentally significant levels (10 μ m; 20 μ m; 40 μ m; 60 μ m), up to 120h. Exposure negatively affected the development and survival of the embryos of danio fish, causing mortality associated with embryo coagulation, depending on concentration. At 24 hpf, the highest level of exposure (60 μ m Pb) led to impaired embryo activity, characterized by a decrease in burst activity and the number of movements performed by embryos per minute. At 72 hpf, all the embryos hatched in all exposure concentrations. Morphological abnormalities and an increase in mRNA expression were observed. These results indicate that the Pb content within ecologically significant levels may be harmful to developing danio fish.

Keywords: zebrafish; lead; heavy metal; embryology; gene expression.