

УДК: 615.9-07:615.31:577.118:639.3.034

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.1.99

ДЕХОРИОНИЗАЦИЯ ЭМБРИОНОВ *Danio rerio* ДЛЯ ОЦЕНКИ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ОРГАНОМИНЕРАЛЬНЫХ ХЕЛАТНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Полистовская П.А. – канд. биол. наук., доц. кафедры биохимии и физиологии; Карпенко Л.Ю. – д-р биол. наук, проф., зав. каф. биохимии и физиологии; Махнин И.А.* – асп. 1-го года обучения, асс. кафедры биохимии и физиологии; Ажикина О.Ю. – асп. 2-го года обучения.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины»

*ilya.makh@mail.ru

Ключевые слова: токсикология, *Danio rerio*, дехорионизированные эмбрионы, хелатные комплексы

Keywords: toxicology, *Danio rerio*, dehorionized embryos, chelated complexes

Финансирование: Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда 23-76-01042, <https://rscf.ru/project/23-76-01042/>

Поступила: 19.01.2024

Принята к публикации: 25.03.2024

Опубликована онлайн: 02.04.2024



РЕФЕРАТ

Одним из основных вопросов при работе с эмбрионами рыб является пропускная способность хориона. Считается, что тяжелые металлы тоже могут блокироваться хорионом. В контексте изучения острой токсичности органоминерального хелатного комплекса, содержащего в своем составе такие металлы как железо, марганец, медь, цинк, кобальт, требуется модификация стандартных тестов. Возможным подходом при изучении влияния хориона на результаты острой токсичности, может стать удаление хориона (дехорионизация). Целью исследования было сравнение чувствительности дехорионизированных эмбрионов при оценке острой токсичности органоминеральных хелатных комплексов. Исследования проводили на кафедре биохимии и физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургского государственного университета ветеринарной медицины». Объектом исследования служили эмбрионы *Danio rerio*. Для получения икры родительские пары ссаживали в нерестовые отсадники. Дехорионизацию проводили механическим способом на 24 hpf (стадия фарингулы). После дехорионизации эмбрионы переносили в покрытые агарозой лунки 24-луночных планшетов, заполненные 2 мл раствора на лунку. В ходе исследования было изготовлено было 15 концентраций исследуемого БАД, различающихся в 2,0 раза (64...0,0039 г/л). Рабочие концентрации готовили путем разведения БАД средой Е3. Были получены результаты сравнения чувствительности де- и недехорионизированных эмбрионов при оценке острой токсичности органоминеральных хелатных комплексов. Показано, что LC_{50} исследуемого препарата для недехорионизированных эмбрионов составляет 3,754 г/л, для дехорионизированных эмбрионов LC_{50} составляет 2,326 г/л. Данные свидетельствуют о том, что удаление хориона приводит к увеличению токсичности препарата для эмбрионов *Danio rerio*.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

На сегодняшний день *Danio rerio* (Zebrafish) это общепризнанная модель для биомедицинских и экотоксикологических исследований [1]. Тест-модель широко используется для тестирования безопасности химических веществ, таких как лекарственные препараты, пестициды и другие промышленные химикаты [2]. Это связано с тем, что они имеют высокую чувствительность к различным токсическим веществам, и их ответ на экспозицию может быть легко измерен [3]. Преимуществами *Danio rerio* как экспериментальной модели являются небольшие размеры, высокий коэффициент рождаемости, недорогое содержание и быстрое развитие [4].

Одним из основных вопросов при работе с эмбрионами рыб является пропускная способность хориона. Было показано, что хорион способен задерживать соединения массой свыше 3 кДа [5]. Предполагается, что полимеры и поверхностно-активные вещества также могут блокироваться хорионом, поскольку сравнение острой токсичности для эмбрионов и элеутероэмбрионов, показало более высокую чувствительность у элеутероэмбрионов [6]. Считается, что тяжелые металлы тоже могут блокироваться хорионом [7]. В контексте изучения острой токсичности органоминерального хелатного комплекса, содержащего в своем составе такие металлы как железо, марганец, медь, цинк, кобальт, требуется модификация стандартных тестов.

Возможным подходом при изучении влияния хориона на результаты острой токсичности, может стать удаление хориона (дехорионизация) [8]. На сегодняшний день разработаны два способа удаления хориона *Danio rerio*: химический (например, с помощью проназы – смеси протеиназ *Streptomyces griseus*); механический (с помощью пинцетов или препаровальных игл) [9-10]. Таким образом целью исследования было сравнение чувствительности дехорионизированных эмбрионов при оценке острой токсичности органоминеральных хелатных комплексов.

сов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Исследования проводили на кафедре биохимии и физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургского государственного университета ветеринарной медицины». Объектом исследования служили эмбрионы *Danio rerio*. Родительские пары (n=10) содержались в аквариумах, при интенсивность света 300–330 лк; фотопериод: 14 часов свет/10 часов темнота. Температура воды поддерживалась на уровне $28 \pm 0,5$ °С. Кормление взрослых особей осуществлялось 2 раза в день (сухие гранулы корма Tetra Min Granules - ежедневно; 1 раз в 3 дня креветки (*Artemia sp.*)).

Родительские пары ссаживали в нерестовые отсадники и оставляли до получения икры. После нереста, икру сортировали (выбрасывали неоплодотворенные яйцеклетки) и промывали средой ЕЗ (состав среды см. Таблицу 1), после чего пересаживали в 24-х луночные планшеты (по одной икринке в каждую лунку).

Исследовали органоминеральный хелатный комплекса (ООО “Хеламакс”, Россия). Действующая основа биологически активной добавки (далее БАД): комплекс глицина с микроэлементами (Fe, Mg, Mn, Cu, Zn, Co, Se, I). Микроэлементный состав хелатного комплекса представлен в таблице 2.

Хелатный комплекс (многокомпонентная субстанция) представлял собой раствор темно-коричневого цвета, без запаха, хорошо растворимый в воде и нерастворимый в органических растворителях, pH раствора БАД - 6,7

В ходе исследования было изготовлено было 15 концентраций исследуемого БАД, различающихся в 2,0 раза (64...0,0039 г/л). Рабочие концентрации готовили путем разведения БАД средой ЕЗ.

Дехорионизацию проводили механическим способом на 24 hpf (часов после оплодотворения, стадия фарингулы) [8,10]. После дехорионизации эмбрионы переносили в покрытые агарозой лунки 24-луночных планшетов, заполненные 2

мл раствора на лунку.

Планшеты во время испытаний были закрыты прозрачными крышками во избежание испарения. Исследования проводили в статических условиях.

Икру распределяли в лунки планшетов в следующем количестве (в соответствии с OECD №236):

20 икринок на один планшет для каждой испытуемой концентрации;

20 икринок в качестве контроля среды ЕЗ на один планшет (отрицательный контроль);

20 икринок в качестве положительного контроля на один планшет (3,4-DCA4 мг/л);

4 икринки в среде ЕЗ в качестве внутреннего контроля в планшете на каждую концентрацию

Эмбрионы инкубировали при температуре 28,5°C. Развитие дехорионизированных эмбрионов проверяли через 24, 48, 72 и 96 часов после дехорионизации, т.е. через 48, 72, 96 и 120 часов после

оплодотворения [10]. Данные сравнивали с недехорионизированными эмбрионами. Условия инкубации недехорионизированных эмбрионов были аналогичны описанным ранее условиям.

Наблюдения проводили под стереомикроскопом (МБС-10М, Россия), в ходе которых фиксировали следующие патологии: отсутствие спонтанных движений, деформацию эмбрионов, отсутствие сердцебиения, другие нарушения развития сердечнососудистой системы, общая задержка развития, задержка пигментации, формирования отека (отек перикарда, отек желточного мешка).

Определяли следующие показатели: % погибших дехорионизированных и недехорионизированных эмбрионов, максимальную концентрацию, не вызывающую гибель во время проведения испытания; минимальную концентрацию, вызывающую 100 % гибель во время проведения испытания; значение LC50 через 96 ч с 95 % доверительным интервалом.

Таблица 1 – Электролитный состав водной среды для культивирования эмбрионов [11]

NaCl	KCl	CaCl ₂	MgSO ₄
0,292 г/л	0,013 г/л	0,044 г/л	0,081 г/л

Таблица 2 – Микроэлементный состав исследуемого органоминерального хелатного комплекса [12]

Микроэлемент	Содержание г/л
Железо	20
Магний	8,9
Марганец	14
Медь	2,1
Цинк	18
Кобальт	0,24
Селен	0,24
Йод	0,52
Общее количество (сумма) элементов	64

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Проведено сравнение чувствительности дехорионизированных эмбрионов при оценке острой токсичности органоминеральных хелатных комплексов. Гибели эмбрионов в отрицательном и внутреннем контроле не наблюдалось. Смерть

эмбрионов в положительном контроле составила 95% – для дехорионизированных эмбрионов и 85% - для недехорионизированных эмбрионов. В качестве положительного контроля использовали ацетон, поскольку стандартное вещество используемое для теста (3,4-

дихлоранилин), проявляет свою токсичность в течение первых 24 часов развития [8].

Результаты экспериментов (таблица 3) показали, что при экспозиции эмбрионов в растворах с концентрациями органоминерального хелатного комплекса 16-64 г/л наблюдается гибель 100% эмбрионов.

Определена максимальная концентрация не вызывающая гибели во время проведения испытания, для недехорионизированных эмбрионов она составляет - 0,25 г/л; для дехорионизированных эмбрионов - 0,0625 г/л. Показана минимальная концентрация вызывающая 100% гибель во время проведения испытаний - 16 г/л для недехорионизированных и дехорионизированных эмбрионов.

Основываясь на результатах выживаемости эмбрионов *Danio rerio*, была рассчитана медианно-смертельная концентрация органоминерального хелатного комплекса. LC50 исследуемого препарата для недехорионизированных эмбрионов

составляет 3,754 г/л, в тоже время для дехорионизированных эмбрионов LC50 - 2,326 г/л. Полученные результаты, подтверждают необходимость проведения токсикологических тестов при оценке минеральных препаратов. Следует отметить, что токсичность минеральных компонентов была показана рядом других исследований. Например, было обнаружено, что применение солей меди, цинка и железа приводит к задержке скорости вылупления и вызывает различные пороки развития (отек желточного мешка, отек перикарда, кровоизлияния, сморщивание хориона и сколиоз) [13-16].

Кроме того, полученные нами данные, демонстрируют, что хорион способен задерживать компоненты органоминеральных хелатных комплексов. Нами показано, что удаление хориона приводит к увеличению токсичности препарата для эмбрионов *Danio rerio*. Подобные результаты согласуются и с другими авторами [8,10].

Таблица 3 – Выживаемость дехорионизированных и недехорионизированных эмбрионов *Danio rerio* при инкубации с различными концентрациями органоминерального хелатного комплекса

Концентрация г/л	Гибель дехорионизированных эмбрионов, %	Гибель недехорионизированных эмбрионов, %
64	100	100
32	100	100
16	100	100
8	75	65
4	55	50
2	50	40
1	35	25
0,5	25	10
0,25	10	0
0,125	5	0
0,0625	0	0
0,0312	0	0
0,0156	0	0
0,0078	0	0
0,0039	0	0
“+” контроль	95	85
“-” контроль	0	0

Примечание: “+” – положительный контроль (обработка ацетоном) “-” - отрицательный контроль (инкубация эмбрионов в среде E3).

ВЫВОДЫ/ CONCLUSION

Таким образом получены результаты сравнения чувствительности де- и недехорионизированных эмбрионов при оценке острой токсичности органоминеральных хелатных комплексов. Показано, что LC50 исследуемого препарата для недехорионизированных эмбрионов составляет 3,754 г/л, для дехорионизированных эмбрионов LC50 составляет 2,326 г/л. Данные свидетельствуют о том, что хорион способен задерживать компоненты органоминерального хелатного комплекса, удаление хориона приводит к увеличению токсичности препарата для эмбрионов *Danio rerio*. Применение метода дехорионизации необходимо при проведении ряда токсикологических исследований на эмбрионах Zebrafish.

DEHORIONIZATION OF DANIO RERIO EMBRYOS TO ASSESS THE ACUTE TOXICITY OF ORGANOMINERAL CHELATE COMPLEXES

Polistovskaya P.A. – PhD., associate Professor of the Department of Biochemistry and Physiology; **Karpenko L.Yu.** – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department. Biochemistry and physiology; **Makhnin I.A.*** – post-graduate student of the 1st year of study, assistant of the Department of Biochemistry and Physiology; **Azhikina O.Yu.** – graduate student of the 2nd year of study. St. Petersburg State University of Veterinary Medicine

* ily.makh@mail.ru

Financing: The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation 23-76-01042, <https://rscf.ru/project/23-76-01042/>

ABSTRACT

One of the main issues when working with fish embryos is the throughput of the chorion. It is believed that heavy metals can also be blocked by chorion. In the context of studying the acute toxicity of an organomineral chelate complex containing metals such as iron, manganese, copper,

zinc, and cobalt, modification of standard tests is required. A possible approach to studying the effect of chorion on the results of acute toxicity may be the removal of chorion (dehorionization). The aim of the study was to compare the sensitivity of dehorionized embryos in assessing the acute toxicity of organomineral chelate complexes. The research was conducted at the Department of Biochemistry and Physiology of the St. Petersburg State University of Veterinary Medicine. The object of the study was the embryos of *Danio rerio*. To obtain caviar, the parent pairs were planted in spawning jigs. Dehorionization was performed mechanically at 24 hpf (pharyngula stage). After dehorionization, the embryos were transferred to agarose-coated wells of 24-well tablets filled with 2 ml of solution per well. During the study, 15 concentrations of the studied dietary supplement were produced, varying by 2.0 times (64...0.0039 g/l). Working concentrations were prepared by diluting dietary supplements with E3 medium. The results of comparing the sensitivity of de- and non-dehorionized embryos in assessing the acute toxicity of organomineral chelate complexes were obtained. It was shown that the LC50 of the studied drug for non-dehorionized embryos is 3.754 g/l, for dehorionized embryos the LC50 is 2.326 g/l. The data indicate that the removal of the chorion leads to an increase in the toxicity of the drug for *Danio rerio* embryos.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kurogi K, Liu TA, Sakakibara Y, Suiko M, Liu MC. The use of zebrafish as a model system for investigating the role of the SULTs in the metabolism of endogenous compounds and xenobiotics. *Drug Metab Rev.* 2013 Nov;45(4):431-40. doi: 10.3109/03602532.2013.835629. Epub 2013 Sep 12. PMID: 24028174.
2. Качанов Д.А., Лакеенков Н.М., Левикин К.Е., Блаженко А.А. и др, *Danio rerio* (Zebrafish) как универсальный модельный объект в доклинических исследованиях // FORCIPE. 2018. №1.
3. Беттини С., Лаццари М., Феррандо С., Галлус Л., Франческини В. Гистопатоло-

- гический анализ обонятельного эпителия рыбок Данио рерио, подвергшихся сублетальному воздействию мочевины. *J Anat.* 2016 Jan;228(1):59-69. doi: 10.1111/joa.12397. Epub 2015, 29 октября. PMID: 26510631; PMCID: PMC4694166.
4. Fishman MC. Genomics. Zebrafish--the canonical vertebrate. *Science.* 2001 Nov 9;294(5545):1290-1. doi: 10.1126/science.1066652. PMID: 11701913. R. Creton
5. Creton R. The calcium pump of the endoplasmic reticulum plays a role in midline signaling during early zebrafish development. *Brain Res Dev Brain Res.* 2004 Jul 19;151(1-2):33-41. doi: 10.1016/j.devbrainres.2004.03.016. PMID: 15246690.
6. T. Braunbeck et al. Towards an alternative for the acute fish LC(50) test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species — an update
7. Xander J. H. X. Stouthart, Jeroen L. M. Haans, Robert A. C. Lock, Sjoerd E. Wendelaar Bonga Effects of water pH on copper toxicity to early life stages of the common carp (*Cyprinus carpio*) *Environmental Toxicology and Chemistr* Epub 1996 doi.org:10.1002/etc.5620150323
8. Henn K, Braunbeck T. Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2011 Jan;153(1):91-8. doi: 10.1016/j.cbpc.2010.09.003. Epub 2010 Sep 30. PMID: 20869464.
9. Вестерфилд М. Руководство по лабораторному использованию рыбок Данио Рерио. — Юджин: Университет Орегона, США, 2010-564 с.
10. Vokhminova, Daria, Viktor Umansky and Annette Paschen. Dissertation submitted to the Combined Faculties for the Natural Sciences and for Mathematics of the Ruperto-Carola University of Heidelberg, Germany for the degree of Doctor of Natural Sciences Presented by Diplom-Biotechnology. 2010 - 359
11. Cunliffe A. M. et al. Pyrolysis of composite plastic waste. *Environmental Technology* 24 (2003): 653 - 663.
12. Патент № 2016121770 Российская Федерация RU 2 640 908 С2, 31.05.2016. Микроэлементный препарат для животных: № 2016121770: заявл. 31.05.2016: опубл. 12.01.2018 / Рыжов А.А., Рыжова В.В., Володькина Г.М., Коровицын Е.С. — 7 с.
13. Jezierska B, Ługowska K, Witeska M. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiol Biochem.* 2009 Nov;35(4):625-40. doi: 10.1007/s10695-008-9284-4. Epub 2008 Nov 20. PMID: 19020985.
14. De Silva, D., Fasmina, M., Jayamanne, S. C., Liyanage, N. P., & Perera, J. Determination of the Toxicity Cause by Trace Metals on Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 2021, 10(2), 176–185. <https://doi.org/10.20473/jafh.v10i2.21496>
15. Анализ кратковременного воздействия тяжелых металлов на белковый обмен у карпа / Л. Ю. Карпенко, П. А. Полистовская, А. И. Енукашвили, К. П. Иванова // *Международный вестник ветеринарии*. — 2020. — № 4. — С. 145-149. — DOI 10.17238/issn2072-2419.2020.4.145.
16. Влияние свинца на изменение показателей углеводного обмена у карпа / Л. Ю. Карпенко, П. А. Полистовская, К. П. Иванова, А. Б. Балыкина // *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии*. — 2019. — № 4. — С. 100-102. — DOI 10.17238/issn2072-6023.2019.4.100.

REFERENCES

1. Kurogi K, Liu TA, Sakakibara Y, Suiko M, Liu MC. The use of zebrafish as a model system for investigating the role of the SULTs in the metabolism of endogenous compounds and xenobiotics. *Drug Metab Rev.* 2013 Nov;45(4):431-40. doi: 10.3109/03602532.2013.835629. Epub 2013 Sep 12. PMID: 24028174.
2. Kachanov D.A., Lakeenkov N.M., Levikin K.E., Blazhenko A.A. and others, *Danio rerio* (Zebrafish) as a universal model object in preclinical research // *FORCIPE*. 2018. No.1.
3. Bettini S., Lazzari M., Ferrando S., Gallus L., Franceschini V. Histopathological analy-

- sis of the olfactory epithelium of *Danio rerio* fish exposed to sublethal urea. *J Anat.* 2016 Jan;228(1):59-69. doi: 10.1111/joa.12397. Epub 2015, October 29th. PMID: 26510631; PMCID: PMC4694166.
4. Fishman MC. Genomics. Zebrafish--the canonical vertebrate. *Science.* 2001 Nov 9;294(5545):1290-1. doi: 10.1126/science.1066652. PMID: 11701913.
5. Creton R. The calcium pump of the endoplasmic reticulum plays a role in midline signaling during early zebrafish development. *Brain Res Dev Brain Res.* 2004 Jul 19;151(1-2):33-41. doi: 10.1016/j.devbrainres.2004.03.016. PMID: 15246690.
6. T. Braunbeck et al. Towards an alternative for the acute fish LC (50) test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species — an update
7. Xander J. H. X. Stouthart, Jeroen L. M. Haans, Robert A. C. Lock, Sjoerd E. Wendelaar Bonga Effects of water pH on copper toxicity to early life stages of the common carp (*Cyprinus carpio*) *Environmental Toxicology and Chemistry* Epub 1996 doi.org:10.1002/etc.5620150323
8. Henn K, Braunbeck T. Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2011 Jan;153(1):91-8. doi: 10.1016/j.cbpc.2010.09.003. Epub 2010 Sep 30. PMID: 20869464.
9. Westerfield M. Guide to the laboratory use of *Danio Rerio* fish. Eugene: University of Oregon, USA, 2010-564 p.
10. Vokhminova, Daria, Viktor Umansky and Annette Paschen. Dissertation submitted to the Combined Faculties for the Natural Sciences and for Mathematics of the Ruperto-Carola University of Heidelberg, Germany for the degree of Doctor of Natural Sciences Presented by Diplom-Biotechnology. 2010 - 359
11. Cunliffe A. M. et al. Pyrolysis of composite plastic waste. *Environmental Technology* 24 (2003): 653 - 663.
12. Patent No. 2016121770 Russian Federation RU 2 640 908 C2, 05/31/2016. Microelement preparation for animals : No. 2016121770 : application 05/31/2016 : publ. 12.01.2018 / Ryzhov A.A., Ryzhova V.V., Volodkina G.M., Korovitsyn E.S. – 7 p.
13. Jezierska B, Ługowska K, Witeska M. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiol Biochem.* 2009 Nov;35(4):625-40. doi: 10.1007/s10695-008-9284-4. Epub 2008 Nov 20. PMID: 19020985.
14. De Silva, D., Fasmina, M., Jayamanne, S. C., Liyanage, N. P., & Perera, J. Determination of the Toxicity Cause by Trace Metals on Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 2021, 10(2), 176–185. <https://doi.org/10.20473/jafh.v10i2.21496>
15. Analysis of short-term effects of heavy metals on protein metabolism in carp / L. Y. Karpenko, P. A. Polistovskaya, A. I. Enukashvili, K. P. Ivanova // *International Bulletin of Veterinary Medicine.* - 2020. – No. 4. – pp. 145-149. – DOI 10.17238/issn2072-2419.2020.4.145.
16. The influence of lead on changes in carbohydrate metabolism in carp / L. Y. Karpenko, P. A. Polistovskaya, K. P. Ivanova, A. B. Balykina // *Issues of regulatory regulation in veterinary medicine.* – 2019. – No. 4. – pp. 100-102. – DOI 10.17238/issn2072-6023.2019.4.100.