

внедрению в практику новых менее опасных препаратов с учетом современных технологий.

В заключение следует отметить, что информационные технологии, применяемые для преподавания дисциплины «Ветеринарная фармакология и токсикология», действительно являются эффективными, они позволяют индивидуализировать и дифференцировать процесс обучения, стимулировать познавательную активность и самостоятельность, развитие творческих способностей студента, прививают навыки исследовательской деятельности, формируют культуру обучения, позволяя сосредоточиться на учебных, воспитательных и развивающих функциях.

Литература. 1. Андреева, Н. Л. Фармакология / Н. Л. Андреева, Г. А. Ноздрин ; под ред. В. Д. Соколова. - 5-е изд., стер. - Санкт-Петербург : Лань, 2022. - 576 с. 2. Ветеринарная токсикология с основами экологии / М. Н. Аргунов [и др.]. – Москва : Колос, 2005. - 415 с. 3. Информационные технологии. Базовый курс : учебник для вузов / А. В. Костюк, С. А. Бобонец, А. В. Флегонтов, А. К. Черных. - 3-е изд., стер. - Санкт-Петербург : Лань, 2021. – 604 с.

УДК 615.27:615.9

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДАНИО РЕРИО (ZEBRAFISH) ДЛЯ ОЦЕНКИ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Барулин Н.В.

Белорусская государственная сельскохозяйственная академия,
г. Горки, Республика Беларусь

Введение. Многие химические вещества, попавшие в окружающую среду, проявляют нейроактивные свойства и могут иметь негативные последствия для здоровья человека и животных [1, 2]. Нейроактивные вещества представляют собой самую большую группу (13%) химических веществ с известным способом действия, обнаруженных в европейских реках. Эти нейроактивные вещества сосуществуют в окружающей среде с другими химическими веществами [1, 2], и связи «вещество-рецептор» могут быть полезны для идентификации этих веществ в сложной смеси. Обычно нейроактивные вещества воздействуют на определенные участки нервной системы, такие как ацетилхолинэстераза, никотиновые рецепторы, рецепторы гамма-аминомасляной кислоты и рецепторы натриевых каналов. Несмотря на широкое распространение нейроактивных химических веществ в окружающей среде и их способность нарушать работу нервной системы, стандартные методы оценки рисков, связанных с этими веществами, отсутствуют.

В настоящее время тестирование негативного воздействия химических веществ на человека и окружающую среду в значительной степени опирается на животные модели, такие как грызуны и взрослые рыбы [3]. Однако известно, что воздействие химических веществ на животных может причинять боль и страдания. Следовательно, использование животных для тестирования токсичности крайне не рекомендуется в пользу продвижения принципа 3R: сокращение, уточнение и замена (reduction, refinement and replacement) [1]. В свою очередь, использование клеточных линий поощряется в качестве альтернативы благодаря их способности выявлять механизмы, лежащие в основе токсических эффектов [4]. Однако неспособность клеточных линий интегрировать взаимодействие различных тканей

в рамках многоклеточной системы является основным недостатком. В качестве альтернативы, эмбрионы данио рерио оказались перспективной моделью благодаря своей способности предсказывать токсичность. Кроме того, поведение эмбрионов данио рерио можно использовать для различения различных нейротоксичных веществ, таких как агонисты бета-адренергических рецепторов, агонисты дофамина и антагонисты аденозиновых рецепторов [5].

Пресноводные рыбы данио рерио (*zebrafish, Danio rerio*) в последнее время получили широкую популярность в качестве модельного объекта в различных биомедицинских исследованиях, направленных на изучение процессов функционирования генов, развития организма, анатомии, физиологических и поведенческих особенностей, а также в экотоксикологии, нейробиологии, онкологии и аквакультуре. Несмотря на низкое сходство с человеком, многие системы данио, например, сердечно-сосудистая система, взаимодействует как у человека с низкомолекулярными соединениями. Методами генной инженерии разрабатываются модели данио рерио, имитирующие заболевания человека. Следует отметить, что использование данио рерио в качестве модельного объекта в медико-биологических исследованиях еще не получило достаточно популярности в научной сфере Беларуси.

Цель работы – представить научному сообществу ветеринарных фармакологов и токсикологов ЕАЭС современные возможности и методы использования данио рерио, в качестве модельного объекта для оценки нейротоксичности химических веществ, а также результаты освоения этих методов.

Материалы и методы исследований. Работы по освоению современных методов использования данио рерио для оценки нейротоксичности химических веществ выполняются на базе специализированной лаборатории «Физиология рыб» кафедры ихтиологии и рыбоводства Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. В состав материально-технической базы лаборатории входит: специализированные виварии для проведения экспериментов и выращивания личинок, мальков и взрослых данио рерио общим водообъемом 6000 литров; участок выращивания живых кормов и водорослей; участок получения эмбрионов и их инкубации; комплекс оборудования для нейробиологических исследований с использованием эмбрионов, личинок, мальков и взрослых данио рерио, оборудование для мониторинга показателей качества воды, а также другое оборудование для токсикологических, физиологических, биохимических и других исследований.

Для ежедневного получения эмбрионов данио рерио в лаборатории имеется половозрелое стадо данио рерио дикого типа с ведением учета их плодовитости. Рыбы содержатся с 12 часовым фотопериодом. Самки содержатся совместно с самцами, однако за 12 часов до получения эмбрионов рыбы рассаживаются раздельно по полу. В период основного выращивания, половозрелые рыбы питаются высокобелковыми коммерческими кормами Tetra, а также регулярно получают живые корма в виде grindальского червя и аулофоруса, а также науплий артемии.

Получение эмбрионов осуществляют в специализированных нерестовых емкостях, имеющих отсек, отделяющих взрослых особей от эмбрионов, а также прозрачную перегородку, отделяющих самцов от самок перед началом нереста. Благодаря контролируемому получению эмбрионов, имеется возможность управлять эмбриональным развитием с точностью до 10 минут. После сбора и отмывания эмбрионов, они помещаются в различные емкости в зависимости от целей эксперимента: стеклянные или полистироловые чашки Петри, 96 луночные планшеты с круглыми или квадратными лунками. Инкубация эмбрионов осуществляется в термостатах при температуре – 28,0 °С в течении 120 – 144

часов (5 – 6 суток) после оплодотворения. При исследовании нейротоксичности химических веществ, живые эмбрионы, как правило, через 2 часа после оплодотворения, переносятся в емкости с инкубационной средой, в которую добавляется исследуемый токсикант. Затем они переносятся в 96 луночные планшеты, по 1 эмбриону в каждую лунку. Один 96 луночный планшет позволяет исследовать 6 различных концентраций (с учетом дубликатов) по 8 экземпляров в 1 дубле.

В ходе исследований осуществляется ежедневная замена инкубационной среды со свежей порцией токсиканта, а также учет летальных, сублетальных и тератогенных эффектов, с последующим расчетом ЛД₅₀, процедуры Каплана-Мейера, различных индексов морфологических аномалий. Через 24, 30 и 120 часов после оплодотворения эмбрионы проходят нейробиологическое тестирование в тесте спонтанного сворачивания хвоста (spontaneous tail coiling, STC); в тесте фотомоторного ответа (photomotor response, PMR) и в тесте локомоторного ответа (locomotor response, LMR), соответственно.

При STC-тесте, 96-луночный планшет с эмбрионами помещают на платформу с инфракрасной подсветкой и затем накрывают затемненным боксом, поддерживая температуру (28,0 °C). Видео активности эмбрионов записывают в течение 1 минуты в темноте, после 5 минут адаптации. Для записи активности эмбрионов используют камеру Basler, оснащенную инфракрасным фильтром. После последнего измерения 96-луночный планшет с эмбрионами помещают в термостат для дальнейшей инкубации.

Методика PMR-теста в основном схожа с методикой STC-теста, за исключением наличия светового воздействия в следующем режиме: 20 сек темноты; 1 сек яркого верхнего света; 19 сек темноты; 1 сек яркого верхнего света; 19 сек темноты.

Для проведения LMR-теста, 96-луночный планшет со свободными эмбрионами, также помещают на платформу с инфракрасной подсветкой и затем накрывают затемненным боксом, поддерживая температуру (28,0 °C). Видеозаписи подвижности личинок записывают с использованием следующих настроек освещения при температуре 28 °C после 5 мин темновой адаптации: 5 мин (свет) - 5 мин (темнота) - 5 мин (свет) - 10 мин (свет) - 20 мин (темнота) - 10 мин (свет) и анализируют с помощью программного обеспечения EthoVision XT (Noldus, Нидерланды) в режиме DanioVision с использованием камеры микроскопа Basler, оснащенной инфракрасным фильтром. Интервал записи составляет 15 секунд.

Результаты исследований. У рыб функциональное вмешательство в сердечно-сосудистую и нервную системы, особенно показанное при ингибировании АХЭ, приводит к синдрому дыхательной недостаточности, что влечет за собой повышенную смертность из-за нехватки кислорода [6]. В отличие от этого, у эмбрионов рыб синдром дыхательной недостаточности отсутствует, поскольку кислород в эмбрионах в основном поступает через кожную диффузию [1]. В результате эмбрионы демонстрируют лишь слабую смертность от нейротоксичных веществ. Однако было показано, что некоторые нейроактивные вещества оказывают влияние на поведение при концентрациях значительно ниже летального диапазона [1]. Следовательно, наблюдение за изменениями поведения эмбрионов при сублетальных концентрациях может служить индикатором нейроактивности и/или может быть использовано для вывода о неблагоприятном воздействии.

Потенциал выявления взаимодействия химических веществ с нервной системой с помощью поведенческих тестов на данио рерио был признан мировым сообществом [1]. При этом наиболее часто используемые поведенческие тесты это – STC, PMR и LMR. В специализированной лаборатории «Физиология рыб» были успешно апробированы все три указанных поведенческих теста.

Тест STC - это оценка первой двигательной активности, генерируемой развивающейся нейронной сетью, которая возникает в результате иннервации мышцы [7]. Предполагается, что это событие важно для вылупления эмбриона из хориона [7]. Частотные изменения STC используются в качестве инструмента для обнаружения воздействия нейроактивных химических веществ на развивающийся эмбрион.

Тест PMR – это оценка эмбрионального движения, вызываемое световым стимулом высокой интенсивности (длина волны от 300 до 700 нм). Этот ответ не зависит от восприятия света глазами и опосредуется через фоторецепторы в развивающемся заднем мозге [5]. PMR можно разделить на четыре большие фазы: предстимульная фоновая фаза, латентная фаза, фаза возбуждения и рефрактерная фаза. Визуализация этих фаз PMR используется для химической классификации и скрининга лекарств [5]. Как STC, так и PMR представляют собой конечные точки, измеряемые на стадии до вылупления эмбриона данио рерио.

Тест LMR – это оценка как спонтанного, так и индуцированного чередование света, локомоторного ответа свободных эмбрионов (личинки). При LMR-тесте эмбрионы слабо двигаются при освещении светом, но демонстрируют увеличение активности при переключении со света на темноту [1]. Поэтому для мониторинга такого поведения применяют циклы свет-темнота. LMR оценивается путем регистрации различных конечных точек плавательной активности, таких как время плавания, расстояние плавания, скорость плавания (рассчитанная из расстояния и времени) и угол плавания.

Основной целью вышеперечисленных тестов является выявление гипо- и / или гиперактивности эмбрионов под влиянием различных химических веществ.

В некоторых исследованиях дифференциация между гипо- и гиперактивностью была предложена в качестве потенциального показателя нейроактивности химических веществ [5]. Предполагается, что нейроактивные вещества способны модулировать нервные рецепторы, что приводит к гипо- или гиперактивному поведению. Например, Viet и др. [8] использовали реакцию STC в качестве метрики для скрининга библиотеки из 1280 фармакологически активных соединений на нейроактивность. Рейф и др. [9] использовали гипо- или гиперактивность, наблюдаемую в различных фазах PMR, для характеристики набора из 1060 химических веществ.

Обоснование вышеупомянутых скрининговых исследований заключалось в том, что вещества с одинаковым или сходным способом действия будут вызывать только гипо- или гиперактивность. Однако возможно, что одно и то же вещество может вызывать как гипо-, так и гиперактивность (двухфазная активность) в зависимости от уровня концентрации или продолжительности воздействия. Например, хлорпирифос-оксон и альдикарб-сульфоксид стимулируют нервные клетки путем ингибирования ацетилхолинэстеразы, тем самым вызывая гиперактивность и усиленное сердцебиение эмбрионов, соответственно [1]. При более высоких концентрациях чрезмерное возбуждение холинергической системы может привести к параличу, вызванному судорогами, что приводит к гипоактивности [1]. В качестве альтернативы, абамектин вызывает гипоактивность из-за своего ингибирующего действия, когда он активирует хлоридный канал, связанный с ГАМК [1].

В ходе наших исследований, нами были апробированы методы оценки потенциальных нейротоксических веществ с помощью STC, PMR и LMR тестов, а также сформированы рекомендации к техническим и методическим параметрам, направленные на совершенствование и унификацию использования указанных методик и тестов.

Заключение. Эмбрионы рыб являются удобной моделью для оценки нейротоксичности химических веществ. Благодаря простоте содержания и быстрому половому созреванию – данио рерио получили широкое распространение в качестве модельного объекта в различных медико-биологических направлениях.

Потенциал выявления взаимодействия химических веществ с нервной системой с помощью поведенческих тестов на данио рерио был признан мировым сообществом, при этом тесты STC, PMR и LMR претендуют стать наиболее популярными стандартизированными методами при оценке нейротоксичности химических веществ. В ходе наших исследований, нами были апробированы методы оценки потенциальных нейротоксических веществ с помощью STC, PMR и LMR тестов, а также сформированы рекомендации к техническим и методическим параметрам, направленные на совершенствование и унификацию использования указанных методик и тестов.

Литература. 1. *Hypo- or hyperactivity of zebrafish embryos provoked by neuroactive substances: a review on how experimental parameters impact the predictability of behavior changes* / A. Ogungbemi [et al.] // *Environ Sci Eur.* – 2019. - Vol. 31. – P. 88. 2. *An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment* / J. B. Legradi [et al.] // *Environ Sci Eur.* – 2018. - Vol. 30. – P. 46. 3. *Alternative approaches to vertebrate ecotoxicity tests in the 21st century: a review of developments over the last 2 decades and current status* / A. Lillicrap [et al.] // *Environ Toxicol Chem.* – 2016. – Vol. 35. – P. 2637–2646. 4. *Schirmer, K. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish* / K. Schirmer // *Toxicology.* – 2006. – Vol. 224. – P. 163–183. 5. *Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish* / D. Kokel [et al.] // *Nat Chem Biol.* – 2010. – Vol. 6. – P. 231–237. 6. *Development of an adverse outcome pathway for acetylcholinesterase inhibition leading to acute mortality* / C. L. Russom [et al.] // *Environ Toxicol Chem.* - 2014. – Vol. 33. – P. 2157–2169. 7. *Kimmel, C. B. The development and behavioral characteristics of the startle response in the zebra fish* / C. B. Kimmel, J. Patterson, R. O. Kimmel // *Dev Psychobiol.* – 1974. - Vol. 7. - P. 47–60. 8. *Vliet, S. M. Behavioral screening of the LOPAC 1280 library in zebrafish embryos* / S. M. Vliet, T. C. Ho, D. C. Volz // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2017. - Vol. 329. – P. 241–248. 9. *High-throughput characterization of chemical-associated embryonic behavioral changes predicts teratogenic outcomes* / D. M. Reif [et al.] // *Arch Toxicol.* – 2016. – Vol. 90. – P. 1459–1470.

УДК 378.4

ОПЫТ ОМСКОГО ГАУ В ПОДГОТОВКЕ НАУЧНЫХ КАДРОВ ВЫСШЕЙ КВАЛИФИКАЦИИ ЧЕРЕЗ РЕАЛИЗАЦИЮ ПРОЕКТОВ МИРОВОГО УРОВНЯ

Бойко Т.В.

ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П.А.
Столыпина», г. Омск, Российская Федерация

Введение. Подготовка аспирантов и докторантов в ведущих университетах и научных центрах всегда признавалась одной из наиболее сильных сторон развития общества. Сегодня работа с талантливой молодежью находится в фокусе государственной политики России [1].

Реализация национальной стратегии научно-технологического прорыва требует подготовки нового поколения ученых на основе интеграции фундаментальных и прикладных исследований с учетом запросов реального сектора экономики. Базовым инструментом такой интеграции должны выступать комплексные научно-исследовательские проекты мирового уровня [2].