کاربرد زبرافیش (*Danio rerio*) به عنوان مدل تحقیقاتی در مطالعات انسانی

بهناز بذرافشان*[۱]، حسین صادقی[۲]، محسن خلیلی[۳]، سید حسین حسینی‌فر[۳]

۱- مرکز تحقیقات پزشکی، سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

۲- دانشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

۳- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیطزیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

*b_bazrafshan@yahoo.com

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹٤

چکیده

ماهی زبرافیش با نام علمی *Danio rerio* در آب‌های شیرین مناطق گرمسیری زندگی می‌کند. شکل بدن آن‌ها باریک، دراز و دارای نوارهای طلایی و آبی است که در طول بدنش کشیده می‌شود. پایدار بودن ژن‌ها و داشتن شباهت زیاد ژن‌های این ماهی به ژن‌های انسان، ماهی زبرا را که به راحتی قابل پرورش است را به یک ارگانیسم مدل ایده‌آل برای مطالعه آسیب‌شناسی مولکولی در ارتباط با بیماری‌های ژنتیکی انسان و همچنین تکوین پایه‌ای آن کرده است. پرورش ماهی زبرا فرآیندی ساده دارد و این ماهی به طور فوق‌العاده‌ای برای مطالعات تکوینی جدید و زنده مناسب است. توالی‌های مولکولی شناسایی شده در مطالعه‌ی ماهی زبرا معمولا بازتابگر تکوین انسان بوده و همچنین از ماهی زبرا در مدل‌سازی بیماری‌های متفاوت انسانی از قبیل سرطان، بیماری‌های پانکراس و کبد، آلزایمر، پارکینسون و سایر بیماری‌ها استفاده شده است. در این مقاله مروری به بررسی جنبه‌های مختلف کاربرد زبرافیش به عنوان ارگانیسم مدل در مطالعات انسانی پرداخته شده است.

کلمات کلیدی: گورخرماهی، سلولی، مولکولی، مدل تحقیقاتی، *Danio rerio*.

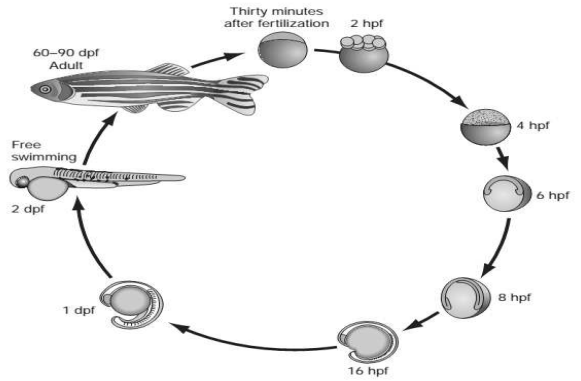
مقدمه

در سال‌های اخیر از ماهی زبرا با نام علمی *Danio rerio* به عنوان یک مدل بسیار مفید برای بیماری‌های انسانی و مطالعه تکوین مهره‌داران استفاده می‌گردد. جنین ماهی زبرا در بیرون از بدن رشد و نمو می‌یابد و این خصوصیت جنین ماهی زبرا، این ماهی را تبدیل به یکی از بهترین مدل تحقیقاتی برای مشاهده و دستکاری در تمام مراحل رشد و نمو کرده است. شفافیت جنین ماهی زبرا و لارو این ماهی این اجازه را به پژوهشگران می‌دهد تا تصویربرداری از اندام-های داخلی را در زمان‌های واقعی داشته باشند. همچنین ماهی زبرا می‌تواند به عنوان یک مدل بسیار سودمند برای کمک به غربالگری ژنتیکی که مدل‌های متنوع بیماری انسانی ایجاد می‌کند باشد (Perry *et al*., 2010). در این مقاله به بررسی ماهی زبرا به عنوان یک مدل تحقیقاتی در مطالعات مولکولی، تکوین و بیماری‌ها پرداخته شده است.

چرخه‌ی زندگی و تولید مثل در زبرافیش

طول عمر ماهی زبرا به طور معمول بین ۲ تا ۳ سال می‌باشد، اما می‌توان این ماهی را تحت شرایط ایده‌آل در اسارت تا ۵ سال هم نگهداری کرد، اما در طبیعت مدت زنده ماندن این ماهی احتمالا کم‌تر است. این ماهی بین ۳ تا ۴ ماه به بلوغ جنسی رسیده و قادر به تخم‌ریزی می‌باشد (Farrell, 2011). جنس ماده هر ۲ تا ۳ روز قادر به تخم‌ریزی یک‌بار می‌باشد و می‌تواند تا ۲۰۰ تخمک در هفته تولید کنند. تخمک‌ها پس از لقاح بلافاصله رشد و نمو جنین را آغاز می‌کنند، اما اگر تخمک‌ها بارور نشوند، رشد متوقف و پس از چند تقسیم سلولی اول تخم‌ها می‌میرند و یا خورده می‌شوند. پس از لقاح، تخم‌ها تقریباً بلافاصله شفاف شده و رشد و نمو خود را به سرعت انجام می‌دهند (شکل ۱). تخم‌های بارور شده در عرض چهار ساعت از یک تک سلولی به ۱۰۰۰ سلول تبدیل می‌شوند (Wolpert *et al*, 2002). کمی بعد از آن، رویان تحت گاسترولاسیون، که مرحله تکوینی وابسته به شکل‌گیری یک دیواره دولایه رویانی است که در نتیجه فرورفتگی در بلاستولا ایجاد می‌شود که این خود وابسته به تمایز لایه اکتودرمی به مزودرمی و اندودرم می‌باشد. اندام‌زایی (ارگانوژنز) بین ۱۶ تا ۲۴ ساعت بعد لقاح آغاز می‌شود و جوانه‌های اکثر همه اندام‌ها در ۳۶ ساعت بعد از لقاح ظاهر می‌شوند. برای مثال قلب زبرافیش بصورت یک قلبی لوله‌ای بعد از ۱۸ ساعت از لقاح شروع به شکل‌گیری می‌کند و انقباض ریتمیک و دودی مانند قلب (همچنین گردش خون و سیستم گردش خون) بعد از ۲۴ ساعت از آغاز لقاح قابل مشاهده است. تفریخ نهایتاً ۴۸ تا ۷۲ ساعت بعد از لقاح انجام می‌گیرد که وابسته به دما بوده و تغذیه و شنا در تقریبا ۷۲ ساعت بعد لقاح است (Farrell, 2011 ; Wolpert *et al*, 2002).

زبرافیش‌ها بین ۲ تا ۳ ماه بالغ شده و می‌توانند در ماه سوم شروع به تولید مثل کنند. اگرچه رفتار تولید مثلی زبرافیش‌های پرورشی به خوبی شناخته شده است، اما این رفتار در ماهیان زبرافیشی که در طبیعت هستند به خوبی شناخته شده نیست. زبرافیش‌ها معمولا در طبیعت ۴ تا ۵ ماه برای رسیدن به بلوغ جنسی زمان احتیاج دارند در صورتی که در اسارت این ماهی بین ۲ تا ۳ ماه به بلوغ جنسی می‌رسد (Perry *et al*., 2010).



شکل۱: چرخه زندگی ماهی زبرا: نمو ماهی زبرا با تبدیل سریع جنین بارور شده شروع شده، و اندام‌های پس از ۱ روز بعد لقاح قابل مشاهده می‌باشد. تخم‌های بارور شده تقریبا بعد از ۲ روز هچ می‌شوند و ماهی زبرا در ماه ۲ و ۳ بالغ می-شود.

استفاده از ماهی زبرا در مطالعات مولکولی

ماهی زبرا یک ارگانیسم مدل مهم برای مطالعه‌ی زیست‌شناسی تکوینی است. گونه‌های کوچک آب شیرین مزایای زیادی دارند که سایر گونه‌ها از آن بی‌بهره‌اند. ژنوم ماهی زبرا پایدار است و می‌تواند تصویر مفصل از تکوین مولکولی مهره‌داران ارائه دهد. بدنه‌ی تحقیقات مولکولی و ژنتیکی ماهی زبرا به سرعت در حال رشد است، از توضیح الگوی یک ژن منحصر به فرد تا ژنوم، پروتئوم و آنالیزهای فنومیک، همچنین نقشه‌های آنتولوژیکال ماهی زبرا در حال تصحیح و تفصیل هستند (Jamieson, 2009). افزایش تعداد ابزارهای قابل استفاده برای مطالعه‌ی تجربی و آزمایشگاهی زیست‌شناسی تکوینی ماهی زبرا به سرعت به موش و مگس سرکه نزدیک می‌شود. تکثیر و پرورش ماهی زبرا فرآیندی ساده داشته و این ماهی به‌طور قابل توجه‌ای برای مطالعات تکوینی جدید مناسب است. برای مثال،

درک زیست‌شناسی مولکولی و تکوینی در حال تبدیل شدن به روشی کارامد جهت به‌دست آوردن اطلاعات درباره‌ی زیست‌شناسی مولکولی و تکوینی مهره‌داران است (Bennett *et al*., 2007; Feldman *et al*., 1998). توالی‌های مولکولی شناسایی شده در مطالعه‌ی ماهی زبرا معمولا موید تکوین انسان هستند و بنابراین، درک مفصلی از زیست‌شناسی مولکولی ماهی زبرا به ما درباره‌ی تکوین انسان نیز اطلاعات بسیار مفیدی می‌دهد (Kimmel *et al*., 1995; Jamieson, 2009). به علت حساسیت ماهی زبرا به مولکول‌های آنتی سنس مورفولینو، محققان می‌توانند متوجه شوند که ژنی خاصی برای یک عمل خاصی نیاز است یا نیست و همچنین نفوذپذیری جنین‌های ماهی زبرا نسبت به مولکول‌های آب سبب شده که در آزمایشات دارویی که برای تکوین مهره‌داران مضر هستند استفاده شود (بهاروند، ۱۳۸۷). درنتیجه این تحقیقات پایه‌ای، پیامدهای مهمی برای سلامت انسان دارد. پایدار بودن ژن‌ها و داشتن شباهت زیاد به ژن‌های انسان، این گونه‌ی از ماهی را که به سادگی قابل تکثیر و پرورش است را به یک ارگانیسم مدل ایده‌آل برای مطالعه‌ی آسیب‌شناسی مولکولی در ارتباط با بیماری‌های ژنتیکی انسان و همچنین تکوین پایه‌ای آن کرده است (Jamieson, 2009).

استفاده از زبرافیش به عنوان مدل در مطالعات سرطان

ماهی زبرا به چند دلیل به عنوان یک مدل بسیار مناسب برای سرطان مفید می‌باشد. مانند انسان، در ماهی زبرا تومورهای خود به خودی ایجاد می‌شود (Smolowitz *et al*., 2002; Matthews, 2004). مقایسه ژنوم انسان و ماهی زبرا نشان داده است که بیشتر انکوژن‌ها و مهارکننده‌های تومور بین انسان و ماهی زبرا از لحظ تکاملی حفظ شده‌اند (Liu *et al*., 2002). ماهی زبرا به عنوان ابزاری برای پیشبرد تحقیقات در مطالعات ژنتیکی در زمینه سرطان می‌باشد و می‌توان تعداد زیادی ماهی مبتلا به سرطان را تولید کرده و مورد پرورش قرار داد. شفافیت نسبی ماهی زبرا به طور قابل توجهی می‌تواند به شناسایی رویدادهای درگیر در ایجاد سرطان و پیشرفت تومورها کمک کند (Perry *et al*., 2010). چندین نوع تومور در ماهی زبرا ایجاد شده که می‌توان به ملانوم، رابدومیوسارکوم، سرطان کلیه، تومورهای کبد، تومورهای بدخیم غلاف اعصاب محیطی (MPNSTs) و سرطان خون اشاره کرد. استراتژی‌های استفاده شده به منظور مطالعه سرطان در گورخرماهی شامل القای تومور کارسنوژن، به دنبال غربالگری ژنتیکی و غیرفعال‌سازی تومور موردنظر، کنترل طولانی یا موقت از فعال‌سازی ژن سرطان و xenotransplantion سلول‌های تومور سرطانی انسان است (Perry *et al*., 2010).

مزایا و معایب زبرافیش در ژنتیک پزشکی

در این سال‌های اخیر از ماهی زبرا، به عنوان مدلی به منظور فعالیت‌های بیولوژیکی و مولکول‌های آلی و تجزیه و تحلیل سریع عملکرد ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (Zon and Peterson, 2005). ماهی زبرا از جهات مختلفی از جمله ژنتیکی، فارماکولوژیکی، فیزیولوژیکی، شباهت بسیار زیادی با انسان دارد که به منظور درمان بیماری‌ها بسیار مناسب است. به دلیل این که قدرت باروری این ماهی بسیار بالاست و همچنین اندازه‌ی بسیار کوچکی دارد در آزمایش‌های ژنتیکی و پزشکی مورد توجه قرار گرفته است (Crawford *et al*., 2008).

تحقیقات زیست پزشکی به استفاده از مدل‌های حیوانی برای درک حدت بیماری‌های انسانی در سطح سلولی و مولکولی بستگی دارد. مدل‌های جانوری همانند موش‌ها، در مدل‌سازی انسانی همواره پیش‌قدم بودند. در ابتدا به دلیل مشابهت بین ژنوم پستاندارن و بسیاری از شباهت‌های از لحاظ آناتومی برای بیولوژی سلولی، فیزیولوژی وجود دارد. علی‌رغم تمام این شباهت‌ها بسیاری از ساختارها و بدن بی‌مهرگان است، که در پاتوژنز بیماری انسان دخیل است و به همین علت نقش آن‌ها در مدل‌سازی بیماری‌های انسانی محدود می‌شود (Carpinelli *et al*., 2004; Michaud *et al*., 2005; Nolan *et al*., 2000; Hrabe de Angelis *et al*., 2000).

بی‌مهرگان با وجود این مزایا، فاقد بسیاری از ساختارهای و سیستم‌های اندامی هستند که در آسیب‌زایی بیماری‌های انسانی شرکت دارند و بنابراین نقش آن‌ها در مدل‌سازی بیماری‌های انسانی محدود خواهد بود. در مقابل، اگرچه غربالگری‌های ژنتیکی پیش‌رو و ژنتیک معکوس مبتنی بر جهش‌زایی تصادفی در موش امکان‌پذیر هستند و در حال حاضر استفاده می‌شوند ولی نمی‌توان آن‌ها را در مقیاسی که در بی‌مهرگان ممکن است، انجام داد چون به نیروی کار و پشتیبانی زیرساختی قابل توجهی نیاز دارند. از این رو، چنین رویکردهایی در موش‌ها به چند پروژه بزرگ محدود است که اغلب به صورت مشارکت‌های غربالگری عمل می‌کنند. در این زمینه، زبرافیش به تازگی به عنوان یک سیستم مدل مهره‌دار مهارشدنی ژنتیکی مورد توجه قرار گرفته‌است. در اوایل دهه ۱۹۳۰، زبرافیش به عنوان یک مدل تکوینی و جنینی کلاسیک استفاده می‌شد.

مطالعات اولیه از ترکیب منحصر به فرد شفافیت نوری جنین‌ها و لاروها (که تجسم رویدادهای بیولوژیک سلول را در درون بدن ممکن ساخت) و دستکاری جنینی برای انجام چند مشاهده مهم الهام گرفت. در طول دهه ۱۹۸۰، توسعه تکنیک‌های ژنتیکی زبرافیش مانند رویکردهای کلونینگ (شبیه‌سازی)، جهش‌زایی، انتقال ژن و نقشه‌برداری، استفاده از زبرافیش را برای کاربرد ژنتیک پیش‌رو به سبک بی‌مهرگان برای پاسخ به پرسش‌های تکوینی مهره‌داران تضمین نمود. در اصل پیش‌بینی شده بود که سیستم زبرافیش، سرنخ‌های مهمی را در مورد توسعه جنین و تکوین اندام طبیعی فراهم خواهد کرد (Hrabe de Angelis *et al*., 2000; Michaud *et al*., 2005, Carpinelli *et al*., 2005; Nolan *et al*., 2000).

از آنجا که این موجود، مهره‌دار است، شکاف بین ژنتیک مگس سرکه (دروزوفیلا) / (*Caenhorhabditis elegans*) و موش / انسانی را پر می‌کند. آشفتگی آزمایش‌های کلونینگ ژن کاندید نشان داد که این موجود برای زیست‌شناسی تکاملی بسیار جذاب است و به وضوح، استفاده از زبرافیش را برای ایجاد محور جنینی و عصب زایی اولیه نشان می‌دهد. امید دیگر برای این سیستم آن بود که زبرافیش مهره‌دار با انسان مرتبط بود و جهش‌یافته‌های آن می‌توانند لوکوس‌های بیماری را تعریف کنند (Chakrabarti *et al*., 1983).

نتیجه‌گیری کلی

شواهد زیادی نشان داد که ماهی زبرا می‌تواند به دقت اثرات بیولوژیکی دارویی را بر روی انسان پیش‌بینی کند. از آنجایی که مدل‌های حیوانی پستاندارن گران هستند، سیستم ماهی زبرا برای فراهم آوردن ارزیابی آزمایشگاهی و مدل‌سازی بدن پستانداران شانس بالاتر و بیش‌تری نسبت به سایر مدل‌ها دارد. ماهی زبرا مدلی است که برای دستکاری‌های ژنتیکی و جنینی بسیار مناسب است. در نتیجه ماهی زبرا مدل عمده‌ای برای تحقیقات زیست پزشکی معرفی شده است.

منابع

بهاروند، ح. ۱۳۸۷. زیست‌شناسی تکوینی. انتشارات خانه زیست‌شناسی. ۳۹۲ص.

Bennett, J. T., Stickney, H. L., Choi, W. Y., Ciruna, B., Talbot, W. S. and Schier, A. F., 2007. Maternal nodal and zebrafish embryogenesis. Nature 450(7167): E1-2; discussion E2-4.

Crawford, A.D., Esguerra, C.V., Witte, P.A.M., 2008. Fishing for drugs from nature: zebrafish as a technology platform for natural product discovery. Planta Medica. 74: 624 - 32.

Michaud, E. J., Culiat, C. T., Klebig, M. L., Barker, P. E., Cain, K. T., Carpenter1, D. J., Easter, L. L., Foster, C. M., Gardner, A. W., Guo, Z. Y., Houser1, K. J., Hughes, L. A., Kerley, M. K., Liu, Z., Olszewski, R. E., Pinn, I., Shaw, G. D., Shinpock, S. G., Wymore1, A. M., Rinchik, E. M. and Johnson, D. K., 2005. Efficient gene-driven germ-line point mutagenesis of C57BL/6J mice.BMC Genomics 6, 164.

Chakrabarti, S., Streisinger, G., Singer, F. and Walker, C., 1983. Frequency of □-ray induced specific locus and recessive lethal mutations in mature germ cells of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Genetics* 103, 109–123.

Farrell, A. P., 2011. Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment. San Diego, CA: Academic Press.

Feldman, B., Gates, M. A., Egan, E. S., Dougan, S. T., Rennebeck, G., Sirotkin, H. I., Schier, A. F. and Talbot, W. S., 1998. Zebrafish organizer development and germlayer formation require nodal-related signals. Nature 395(6698): 181-5.

Hrabe de Angelis, M.H. Heinrich Flaswinkel, Helmut Fuchs, Birgit Rathkolb, Dian Soewarto, Susan Marschall Genome-wide, 2000. Large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. Nature Genet. 25, 444–447.

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics 203(3): 253-310.

Liao, E., Paw, B., Peters, L., Zapata, A., Pratt, S., Do, C., Lieschke, G., and Zon, L. 2000. Hereditary spherocytosis in zebrafish riesling illustrates evolution of erythroid beta-spectrin structure, and function in red cell morphogenesis and membrane stability. Development 127, 5123–5132.

Carpinelli, M. R., Hilton, D. J., Metcalf, D., Antonchuk, J. L., Hyland, C. D., Mifsud, S. L., Di Rago, L., Hilton, A. A., Willson, T. A., Roberts, A. W., Matthews, J., 2004. Common diseases of laboratory zebrafish.Meth. Cell Biol.77, 617–643.

Smolowitz, R., Hanley, J. and Richmond, H., 2002. A three-year retrospective study of abdominal tumors in zebrafish maintained in an aquatic laboratory animal facility.Biol. Bull.203, 265–266.

Nolan, P. M., Peters, J., Strivens, M., Rogers, D., Hagan, J., Spurr, N., Gray, I. C., Vizor, L., Brooker, D., Whitehill, E., Washbourne, R., Hough, T., Greenaway, S., Hewitt, M., Liu, X.,

Ramsay, R.G., Nicola, N.A. and Alexander, W.S., 2004. Suppressor screen in Mpl–/–mice: c-Myb mutation causes supraphysiological production of platelets in the absence of thrombopoietin signaling. Proc. Natl Acad. Sci. USA 101, 6553–6558.

Wolpert, L., Beddington, R., Jessell, T. and et al. 2002. Principles of Development, 2nd edn. New York: Oxford University Press.

Zon, L.I. and Peterson, R.T., 2005. In vivo drug discovery in the Zebrafish. Natural Review Drug Discovery. 4: 35 - 44.

McCormack, S., Pickford, K., Selley, R., Wells, C., Tymowska-Lalanne, Z., Roby, P., Glenister, P., Thornton, C., Thaung, C., Stevenson, J. A., Arkell, R., Mburu, Ph., Hardisty, R., Kiernan, A., Erven, A., Steel, K. P., Voegeling, S., Guenet, J. L., Nickols, C., Sadri, R., Naas, M., Isaacs, A., Davies, K., Browne, M., Fisher, E.M.C., Martin, J., Rastan, S., Brownm S.D.M., and Hunte, J., 2000. A systematic, genome-wide, phenotype-driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse. Nature Genet. 25, 440–443.

Perry, S.F., Ekker, M., Farrell, A.P. and Brauner, C.J., 2010. Zebrafish. Fish Physiology,vol. 29. San Diego, CA: Academic Press.