



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Zebrafish embryos and larvae as a complementary model for behavioural research

Ahmad, F.

Citation

Ahmad, F. (2014, December 1). *Zebrafish embryos and larvae as a complementary model for behavioural research*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/29890>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/29890>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/29890> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Ahmad, Farooq

Title: Zebrafish embryos and larvae as a complementary model for behavioural research

Issue Date: 2014-12-01

Nederlandse Samenvatting

Samenvatting

De zebravis (*Danio rerio*) is een kleine teleost (beenvis) die is boven komen drijven als een belangrijk diermodel in verschillende onderzoeksgebieden. Zijn snelle ontwikkeling, hoge aantal nakomelingen, uitwendige bevruchting, doorzichtig lichaam in de vroege stadia, lage onderhoudskosten en korte levenscyclus zijn de belangrijkste voordelen van dit succesvolle diermodel [43]. De gunstige kosten/baten verhouding van zebravis embryo's en larven maakt het mogelijk om een grote hoeveelheid chemische verbindingen in 'high-throughput' te testen [46,87]. Door de lage kosten is het mogelijk om de zebravis te gebruiken om het gat te dichten tussen *in vitro* 'high-throughput' en het gebruik van complete organismen [465]. Wanneer we de zebravis op de juiste waarde schatten kunnen we ervan profiteren voor het ontdekken van medicijnen en gebruiken als een snelle test voor de effecten van een medicijn.

Een van de interessantste onderzoekgebieden hierin is het centrale zenuwstelsel van de zebravis. Er zijn gedragstesten ontwikkeld om verandering in bewegingsactiviteit, verzwakte gezicht of gehoor functies, verzwakking van de cognitie en de potentie van medicijnafhankelijkheid te onderzoeken [55,161,260]. Het gebruik van deze gedragstesten is een grote belofte voor het ontdekken van potentieel nieuwe medicijnen door duizenden kleine moleculen in dit 'high-throughput' systeem te onderzoeken. Deze rijkdom aan informatie kan gebruikt worden om de veiligheidsrisico's van chemische verbindingen te evalueren en het is een interessant instrument voor het ontdekken van medicijnen terwijl je ook nog tijd en geld bespaart [89,254]. Het gebruik van goedkope, automatische en makkelijk aan te passen video apparatuur maakt de testen gemakkelijk en tijdbesparend [466]. In dit proefschrift gebruikten we geautomatiseerde video-tracking om het gedragsrepertoire van de zebravis larve te analyseren en het effect daarop van chemische verbindingen, licht condities en een nieuwe omgeving.

In **hoofdstuk 2** bespreken we de bestaande literatuur die gaat over het gebruik van zebravis embryo's en larven in het biochemisch onderzoek. De functionele eiwitstructuren waar medicijnen aan koppelen, en veel anderen functioneel belangrijke eiwitten, vertonen dikwijls grote overeenkomsten tussen de zebravis en zoogdieren. Bovendien vertonen zebravis embryo's en larven al een complex gedragspatroon slechts enkel dagen na de bevruchting. We laten ook zien hoe gedragsstudies van zoogdieren zich laten vertalen naar het zebravis embryo/larve model. We benadrukken de gedragsstudies die relevant kunnen zijn voor het screenen van medicijnen of de veiligheid van gifstoffen. Het gebruik van

video-tracking hard- en software in deze studies resulteert in een grote hoeveelheid automatisch verkregen data van zebravis gedragsreacties. Gepubliceerde gedragsassays die gebruik maken van zebravis ontwikkelingsstadia behelzen onder andere visuele beweging reacties, akoestische prikkels, effect van een nieuwe omgeving en verschillende farmacologische stoffen.

In **hoofdstuk 3** hebben we pesticiden, insecticiden en metalen gescreend op de effecten tijdens zebravis ontwikkeling en voortbeweging door een visuele beweging reactie test. De LC_{50} van deze stoffen voor de zebravis is ook berekend en vergeleken met de gepubliceerde data van de knaagdier LD_{50} . De resultaten hiervan laten zien dat verschillende stoffen selectieve effecten hebben op het uit het ei komen en ontwikkeling van het embryo. Sommige stoffen waren teratogeen en veroorzaakten misvormingen. Wat de bewegingsactiviteit betreft geven de stoffen vier verschillende reacties; 1) monotone remming, waar de bewegingsactiviteit van de zebravis wordt onderdrukt bij een toenemende dosis, 2) monotone stimulatie, waarbij de bewegingsactiviteit wordt verhoogd wanneer de dosis stijgt, 3) bifasisch (remming en stimulatie), waarbij de bewegingsactiviteit verhoogd bij een lage dosis maar geremd bij een hoge dosis, 4) neutrale reactie, waarbij de bewegingsactiviteit nog toenam nog afnam.

Dit type assay zou niet alleen nuttig kunnen zijn voor het screenen van chemische stoffen maar ook voor het ontdekken van medicijnen. Het helpt ook bij het signaleren van ontwikkelingsmisvormingen en een verslechterd functioneren door een eenvoudige visuele beweging reactie test. Het is eenvoudig dit op te schalen naar 'high throughput', wat tijd en geld bespaart in het ontdekken van medicijnen en de evaluatie van hun veiligheid. De LC_{50} waarden verkregen in dit assay correleren niet goed met de gepubliceerde LD_{50} waarden van knaagdieren. Sommige stoffen waren giftiger voor de zebravis dan voor knaagdieren of net andersom. Andere onderzoeken echter hebben wel een correlatie gevonden tussen zebravis LC_{50} waarden en knaagdier LD_{50} waarden, afhankelijk van de categorie van de chemische stoffen [94,467].

Eerder onderzoek heeft aangetoond dat volwassen zebravissen donker mijden, terwijl zebravis larven het licht compartiment verkiezen in een open veld test [80]. De zebravis larve laat ook een schrikreactie en sterk verhoogde bewegingsactiviteit zien bij de plotselinge invalvanduisternis [49,122]. Het is echter niet bekend of deze reactie instinctief is of aangeleerd. Om onderscheid te kunnen maken tussen deze twee alternatieven hebben we zebravis larven opgegroeid onder verschillend licht condities van het begin van de bevruchting tot de dag van testen wanneer de effecten op, mortaliteit, uit het ei komen en

bewegingsactiviteit werden gemeten. De zebravis embryo's groeide op in 1) 14:10 uur licht/donker cyclus 2) constant in het donker 3) constant in het licht.

De resultaten hiervan waren; constant licht vervroegde het uitkomen van de larve terwijl constante duisternis het vertraagde, vergeleken met de control en er was geen significant effect op de mortaliteit in geen van de licht regimes. De larven die alleen in het donker opgroeiden hadden echter een aantal misvormingen zoals dooier zak oedemen, pericardiale oedemen en verspreide pigmentatie. De zebravissen die opgroeiden onder normale of constant licht regime hadden niet meer misvormingen dan de controle groep. De visuele beweging reactie test op 5 dpf bij larven opgegroeid in totale duisternis liet zien dat zij niet reageerden op de plotselinge start van de duisternis. De larven die opgroeiden onder constant licht hadden een hoge basale bewegingsactiviteit en daardoor was hun reactie op de plotselinge duisternis niet erg hoog vergeleken met larven opgegroeid in een normale licht-donker cyclus.

Om te kijken of zebravis embryo's kunnen herstellen van de effecten van abnormale licht condities werd de visuele beweging reactie test gedaan twee uur nadat de zebravis embryo's uit de abnormale licht regimes waren gehaald. Het resultaat was dat zebravis embryo's die opgroeiden in complete duisternis normale bewegingsactiviteit gingen vertonen en reageerden op plotselinge duisternis zoals de controle groep. Deze assay bevestigde dat het vertonen van hyperactiviteit als reactie op het plotseling donker worden niet beïnvloed wordt door omgevingsfactoren. Normale licht-donker cycli zijn echter noodzakelijk voor een normale ontwikkeling (**hoofdstuk 4**)

In **hoofdstuk 5** laten we zien dat het kiezen van het tijdstip van de dag en het ontwikkelingsstadium om een specifieke test te doen heel belangrijk is. Alhoewel er geen effect was van het tijdstip van de dag op de bewegingsactiviteit van de zebravis embryo's is er een significant verschil in de bewegingsactiviteit tussen de leeftijdsgroepen. In vergelijking met 6 dpf larven waren de 4 dpf larven minder actief en de 5 dpf larven hyperactief. De zebravis larven vertonen niet-associatief leren. Dit is aangetoond door de zebravissen larven bloot te stellen aan licht donker stimuli met verschillende intervallen gedurende drie uur. Het 10 minuten interval veroorzaakte geen gewenning bij 4 dpf larven. Echter, alhoewel 5 en 6 dpf larven geen vermindering van bewegingsactiviteit vertoonden bij plotselinge duisternis, verminderden ze hun bewegingsactiviteit gedurende de 10 minuten duisternis fase.

Het afwisselende licht donker regime met een interval van 5 minuten liet een afname zien na 5 cycli en verminderde niet voor de rest van de test periode bij 4 en 5 dpf larven terwijl 6 dpf larven geen gewenning vertoonden. De zebravis larven van alle leeftijdsgroepen lieten een snelle vermindering in activiteit zien bij om de minuut wisselend licht-donker regimes van drie uur. Om te onderscheiden tussen snelle gewenning en vermoeidheid werd er een geluidsstimulus gegeven na gewenning aan de licht-donker cycli. Een piek in de bewegingsactiviteit toonde aan dat de zebravis larven kunnen wennen aan bepaalde stimuli met een korte interstimuli interval. In principe kan deze test gebruikt worden om medicijnen te vinden die een rol spelen bij leren en geheugen en misschien ook als een screen voor chemische stoffen met effecten op de cognitie.

In **hoofdstuk 6**, gebruikte we het explorerend gedrag van de zebravis larven om hun kleurvoorkeuren te testen. De zebravissen hadden een voorkeur voor oranje en groen, maar vermeden geel, blauw, rood en zwart. Dit laat zien dat zebravis larven instaat zijn om kleuren te onderscheiden en dat complexe omgevingen angst gerelateerd gedrag ten gevolg hebben. Op deze manier hebben we een traditioneel knaagdier assay ontwikkeld en aangepast dat gebruikt wordt als de goudstandaard in preklinische medicijn screening. Ons assay levert bovendien een versie van dezelfde test die de mogelijkheid biedt om het effect van omgevingsstress op het gedrag van zebravis larven te onderzoeken. Deze assay zou in de toekomst kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van kennis over moleculaire mechanismes achter gedragsmatige stress, spanningsstress, leren en geheugen. Het heeft daarom de potentie om relevant te zijn in het ontdekken van geneesmiddelen.

In **hoofdstuk 7**, hebben we verschillende grijstinten getest op voorkeurs- of vermijdingsgedrag bij de zebravis larven. Het resultaat is dat zebravis larven het donker mijden en bij voorkeur in de lichte of minder donkere omgeving verkeren. Daarnaast hebben we ook de rol van abnormale licht condities onderzocht op voorkeurs- en mijdingsgedrag. De zebravissen die in constante duisternis opgroeiden tot de dag van testen gingen meer naar de zwarte, gele en blauwe zones, terwijl de zebravis larven die opgroeiden in constant licht deze kleur zones vermeden. Echter, de voorkeur voor oranje en de afkeer voor rood was onveranderd. Voor de farmacologische manipulatie is het anxiolyticum diazepam gebruikt om vast te stellen of het geobserveerde gedrag in deze kleurrijke omgeving angst gerelateerd is. De kleurvoorkeur en vermijding, alsmede het verstijvingsreactie van zebravis larven in een complexe omgeving, verdween bij blootstelling aan diazepam. Deze studie toont aan dat angst een belangrijke factor kan zijn bij kleurvoorkeur en exploratie gedrag van zebravis larven. Het laat ook zien dat deze

voorkeuren gewijzigd kunnen worden door de lichtcondities tijdens het opgroeien te veranderen.

Samengevat, we hebben laten zien dat zebravis larven gedragspatronen laten zien die gebruikt kunnen worden om, toxicologie, farmacologie, adaptatie patronen, stress, angst, geheugen en leren te onderzoeken. Het muis model blijft echter het dominante model in de meeste van deze onderzoeksgebieden. Bijvoorbeeld, het onderzoeken van het effect van medicijnen op het metabolisme zou betrouwbaarder zijn in zoogdieren omdat de homologie van de sequence conservatie lager is tussen zebravis en de mens vergeleken met de homologie tussen knaagdier en mens [472]. Onderzoek met zoogdieren is echter duur en heeft een lagere 'throughput'. Screening van een groot aantal verbindingen, chemisch of biologisch, zou meer geld, tijd en verbindingen kosten bij het gebruik van zoogdieren. Daarom is het op voorhand de moeite waard om stoffen te screenen bij zebravis larven omdat het efficiënter is in geld, tijd en hoeveelheid medicijn. Op deze manier kan het zebravis model gebruikt worden als een complementair model in verschillende gebieden.

Conclusies

De zebravis larve is een bruikbaar model in de toxicologie en het ontdekken van medicijnen. De voorspellende waarde voor de effecten op het knaagdier en de mens zijn echter beperkt tot bepaalde chemische categorieën (**hoofdstuk 3**).

- De licht-donker cyclus is belangrijk voor de normale ontwikkeling van de zebravis embryo. Abnormaal licht regime tijdens het opgroeien kan leiden tot verschillende misvormingen (**hoofdstuk 4**).
- De hyperactiviteit van de zebravis larven na de plotselinge duisternis is een intrinsieke eigenschap omdat zebravissen opgegroeid in het donker nog steeds hyperactief worden na de plotselinge duisternis (**hoofdstuk 4**).
- De basale bewegingsactiviteit van 4 dpf zebravissen is significant lager dan die van 5 of 6 dpf larven. Er was geen effect van het tijdstip van de dag op de bewegingsactiviteit (**hoofdstuk 5**).
- Zebravis larven raken gewend aan een herhaald stimulus of plotselinge duisternis met een korte interstimulus periode van 1 minuut. Langere interstimulus periodes (5 en 10 minuten) gaven geen of een lichte gewenning. De hyperactiviteit was altijd hoger na een licht-naar-donker overgang dan bij een donker-naar-licht overgang (**hoofdstuk 5**).
- De 4 dpf zebravis larven lieten geen gewenning zien bij de langere ISI intervallen terwijl de 5 en 6 dpf larven zich aanpasten aan de duisternis na een korte periode van

hyperactiviteit. De activiteit in het donker bleef echter altijd hoger dan de activiteit in de licht periode (**hoofdstuk 5**).

- Zebravis larven kunnen kleuren onderscheiden en tonen een voorkeur voor oranje en groen maar hebben een afkeer van rood, geel, blauw en zwart. De larven vertonen ook verstijvingsreactie in een complexe omgeving (**hoofdstuk 6**).
- Zebravis larven (4-6 dpf) hebben de voorkeur voor het licht en vermijden de duisternis ongeacht de mate van de duisternis. De kleur voorkeur en vermijding verdween bij de zebravis larven na blootstelling aan diazepam (**hoofdstuk 6**).
- Zebravis larven die in een abnormaal licht regime opgroeiden lieten veranderingen zien in sommige aspecten van hun kleur voorkeuren, maar oranje en rood bleven respectievelijk hun voorkeur en afkeer houden (**hoofdstuk 7**).
- De zebravis larve is een nuttig complementair dier model in gedragsonderzoek en toegankelijk voor ‘high-throughput’ screening van chemische verbindingen en het ontdekken van medicijnen (**algemene conclusie**).

Toekomst perspectief

Het onderzoek in dit proefschrift toont aan dat zebravissen kunnen gebruikt worden als een complementair model naast knaagdieren in; toxicologie screening, medicijn ontdekking, en gedragsonderzoek. Er is echter een behoefte om de inwendige en uitwendige factoren die de bewegingsactiviteit beïnvloeden of de conclusies daarvan te karakteriseren. Eerdere studies hebben al aangetoond dat experimentele condities zoals; temperatuur, diameter van de microtiterplaten, aanwezigheid van misvormde larven en het opgroeien van larven onder abnormale licht condities de bewegingsactiviteit van zebravis larven kan beïnvloeden. Er is dus een behoefte om te kijken welke factoren de bewegingsactiviteit van zebravis larven beïnvloeden. De fysiologische veranderingen die deze factoren veroorzaken (pharmacodynamics) en de moleculaire mechanismes hier achter moeten ook onderzocht worden.

Met de toename van de ethische bezwaren om zoogdieren als proefmodel te gebruiken en de bijbehorende restrictieve wetgeving is het waarschijnlijk dat er een groei zal ontstaan in het gebruik van alternatieve diermodellen zoals de zebravis larve. De bewegingsassays die gebruikt worden om het effect van verschillende chemische verbindingen te bepalen roep vragen op over de bioavailability [469]. De makkelijkste en simpelste manier is het oplossen van de te testen stof in de embryo buffer. Op deze manier is men het echter niet zeker van de dosis van de chemische verbinding in het embryo en het tijdstip wanneer het het embryo binnendringt. In feite is van de absorptie, distributie, metabolisme en excretie

(ADME pharmacokinetics) van chemische verbindingen in de vroege stadia van de zebravis heel weinig bekend. Wat het nog ingewikkelder maakt is dat het zebravis embryo een chorion heeft tijdens de eerste 2-3 dagen die 1.5 – 3.5 μm dik is en bestaat uit drie celloze lagen [274,470]. Mechanische of chemische dechroriatie kan uitgevoerd worden maar kan het gedrag van de zebravis beïnvloeden [134,471]. Derhalve, is het nodig om de kwantificatie van bioavailability van chemische verbindingen in het zebravis embryo nader te onderzoeken en effecten op de zebravis te vergelijken met andere diermodellen. Zonder twijfel is het gebrek aan informatie over de ADME een van de redenen waarom de farmaceutische industrie zo traag is om het zebravis model op te pakken.

Het onderzoek naar kleur voorkeuren kan gebruikt worden om de leer- en geheugen capaciteiten van de zebravis larve te bestuderen. Deze assays kunnen gebruikt worden om medicijnen en hun effect op angst te screenen. De verstijvingsreactie en kleur voorkeuren van de zebravis moeten ook bevestigd worden met medicijnen die een toename of afname laten zien in leren en geheugen. Het onderzoek in dit proefschrift helpt ons het gedragsrepertoire van de zebravis en de invloed van de licht-donker cycli te begrijpen en dit kan gebruikt worden om chemische verbindingen te screenen en voor het ontdekken van medicijnen.