
Aleksandar Jokić

Uticaj diltiazema i nifedipina na embriogenezu, srčani rad i aktivnost SOD kod zebrica (*Danio rerio*)

*Prisustvo farmaceutskih proizvoda je konstatovano u površinskim vodama širom sveta. Zagađenje ovom vrstom otpada predstavlja potencijalni rizik za vodene ekosisteme, pri čemu promene koje će nastati uveliko zavise od koncentracije samog polutanta. U ovom radu je ispitivan uticaj blokatora kalcijumovih kanala, diltiazema i nifedipina, na embriogenezu i srčani rad embriona zebrica (*Danio rerio*), kao i njihov uticaj na ukupnu koncentraciju proteina i aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD). Embrioni zebrica bili su izloženi različitim dozama lekova (1, 0.75, 0.5, 0.25 µg/L) u triplikatu i posmatrani pod invertnim mikroskopom nakon 24 i 48 sati. Određivanje ukupne koncentracije proteina vršeno je pomoću Bradfordove metode, dok je aktivnost SOD određena spektrofotometrijski, merenjem autooskidacije adrenalina. Analiza srčanog ritma vršena je pomoću posebno dizajniranog programa. Rezultati pokazuju da nifedipin i diltiazem u razmatranim koncentracijama ne utiču na embriogenezu, a utiču na povećanje ukupne koncentracije proteina. Takođe, iz rezultata se zaključuje da nifedipin i diltiazem smanjuju broj otkucaja srca kod tretiranih embriona u odnosu na kontrolnu grupu. Osim toga, lek nifedipin utiče na povećanje aktivnosti SOD.*

Uvod

Kontaminacija vode je problem svetskih razmera koji se odnosi kako na vodu za piće, vodu za navodnjavanje useva tako i na rečnu vodu, jezera i mora. Prema zvaničnim ocenama

voda je, uprkos njenom značaju, najslabije čuvan i održavan resurs u celom svetu (Chutter 1998), a usled različitih ljudskih aktivnosti ujedno je i najugroženiji osnovni prirodni resurs.

U novije vreme kao polutant vode se pojavljuju i lekovi (Jorgensen i Halling-Sorensen 2000). Razlog za prisustvo lekova u biološki relevantnim koncentracijama u vodotokovima je njihova prekomerna upotreba, neadekvatno odlaganje i izostanak prečišćavanja otpadnih voda (Mansour *et al.* 2016; Kot-Wasik *et al.* 2007). S obzirom na to, sve su intenzivnija istraživanja posvećena utvrđivanju efekata lekova na neciljne vrste koje su im izložene u životnoj sredini.

Blokatori kalcijumovih kanala su grupa lekova čije prisustvo je zabeleženo u površinskim i otpadnim vodama (Kolpin *et al.* 2002). Međutim, njihov uticaj na životnu sredinu nije poznat. Ova grupa lekova se koristi u lečenju povišenog krvnog pritiska. Mehanizam njihovog dejstva podrazumeva blokiranje kalcijumovih voltažno-zavisnih kanala pri čemu se sprečava kretanje Ca²⁺ u i iz ćelije. Najpoznatiji antagonisti kalcijumovih kanala su:

- 1) Diltiazem i analozi
- 2) Verapamil i analozi
- 3) Nifedipin i analozi

Kolpin i saradnici (Kolpin *et al.* 2002) su pokazali da se u površinskim vodama diltiazem nalazi u koncentraciji od 0.049 µg/L i metabolit nifedipina (dehidronifedipin) u koncentraciji od 0.03 µg/L. Usled povećanja koncentracije ove grupe lekova u površinskim vodama, potrebno je ispitati uticaj visokih koncentracija na živi svet u vodama.

Aleksandar Jokić (1999), Vrnjačka Banja, Moravska 61, učenik 4. razreda Gimnazije u Vrnjačkoj Banji

MENTORI:

Stefan Maksimović, student pete godine Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Nikola Mitović, student treće godine Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Za ispitivanje toksičnosti na živi svet u vodama se sve češće koristi *Danio rerio* test (DarT test) (Braunbeck i Lammer 2005, 2006). Prema Evropskom zakonodavnom telu, DarT test se smatra najpouzdanijim akutnim toksikološkim testom koji se vrši na ribama u vremenskom intervalu od 96 h. DarT test je standardizovan 2007. godine od strane Internacionalne Organizacije za Standardizaciju na međunarodnom nivou i podrazumeva ispitivanje različitih supstanci na embrionima zebrića. Zebrice predstavljaju dobar model sistem u nauci jer se razviće embriona odvija van tela ženke i potpuna transparentnost horiona koji okružuje jaje omogućava pre svega veoma detaljno i lako posmatranje embriogeneze kod zebrića (Busquet *et al.* 2008).

Cilj ovog rada jeste ispitivanje dejstva blokatora kalcijumovih kanala, nifedipina i diltiazema na embriogenezu, srčani ritam, aktivnost superoksid dismutaze (SOD), kao i ukupnu koncentraciju proteina embriona zebra ribica u cilju povećana ukupne ekspresije proteina.

Materijal i metode

Embrioni su standardno uzgajani u ribljem medijumu koji se pravi pomoću štokova Hensovih rastvora (Westerfield 2000). Serijska razblaženja lekova rastvorenih u 100% dimetil sulfoksidu (DMSO) pravljeni su u ribljem medijumu (pH 7.2) i finalne koncentracije diltiazema (Cortiazem retard[®], Hemofarm A. D.) i nifedipina (Nifelat[®], Zdravlje A. D.) su bile: 1, 0.75, 0.5 i 0.25 µg/L ribljeg medijuma.

Embrioni. Odrasle jedinke zebra ribica (*Danio rerio*) čuvane su u staklenom akvarijumu na temperaturi $26 \pm 1^\circ\text{C}$, pri svetlonsnom režimu 12 h svetlo – 12 h mrak. Ribice su hranjene tri puta dnevno hranom sa visokim sadržajem proteina. Na kraju dana, muške i ženske jedinke su odvojene u različite mrestilice. U jednoj mrestilici odnos mužjaka i ženki je bio 1:2, a u drugoj 2:1. Na dno mrestilice je postavljena plastična mrežica u cilju sprečavanja odraslih jedinki da pojedu embrione. Sat vremena nakon paljenja svetla došlo je do fertilizacije. Potom su odrasle ribice prebačene u akvarijum, plastične mrežice uklonjene, a embrioni pokupljeni pomoću pasterove pipete. Embrioni su prebačeni u mikrotitracione ploče koje su prethodno napunjene sa 500 µL ribljeg medijuma. Embrioni su čuvani u

inkubatoru na temperaturi od 28.5°C sa dnevno-noćnim režimom, pri čemu su 14 sati bili izloženi svetlosti, a 10 sati mraku.

***Danio rerio* bioesej (DarT test).** U ovom radu korišćen je standardni DarT test (ISO 15088 2007). Prema Evropskim standardima iz 2013. godine, najmanje 24 sata pre početka testa, prazne bunariće je potrebno tretirati koncentracijama rastvora lekova (EC 2014). Zbog toga su prazni bunarići tretirani koncentracijama lekova od 1, 0.75, 0.5 i 0.25 µg po litru ribljeg medijuma. U svaki bunarić je dodato 500 µL rastvora leka. Prvo je izvršen pregled embriona pod lupom. Zdravi embrioni kod kojih nije uočen početak koagulacije, niti bilo kakva druga malformacija, korišćeni su za dalji rad. Rastvori lekova u bunarićima su obnovljeni. Tokom istraživanja korišćen je nifedipin u četiri koncentracije (1, 0.75, 0.5 i 0.25 µg/L), a diltiazem tri koncentracije (1, 0.75, 0.5 µg/L). Kao negativna kontrola korišćen je čist riblji medijum sa dodatkom fosfatnog pufera, a kao kontrola rastvarača korišćen je DMSO u koncentraciji dostignutoj tokom rastvaranja lekova sa čistim ribljim medijumom. Test se ponovio u triplikatu, i u svakom bunariću se nalazio po jedan embrion. Nakon tretiranja embriona, mikrotitracione ploče su stavljene u inkubator na 28.5°C . Nakon tretmana od 24 i 48 sata vršena su snimanja na invertnom mikroskopu koja su trajala po 1 minut, i ti snimci su dalje obrađivani u cilju ispitivanja promena u embriogenezi i srčanog ritma. Toksikološke letalne tačke uključuju koagulaciju kod oplođenih jaja, odsustvo otkucaja srca, odsustvo formacije somita i odsustvo odvajanja repa od žumančane kese. Akutna toksičnost se određuje na osnovu pojave bilo koje od ove četiri letalne tačke. Posebno za ovaj rad, dizajniran je program Heart Beat Calculator koji obrađuje podatke dobijenih pomoću programa ImageJ, koji vrši analizu snimaka srčanog rada.

Homogenizacija embriona. Embrioni su pokupljeni pomoću pasterove pipete i prebačeni u vajle. U svakoj vajli su se nalazili: po tri embriona sa istom koncentracijom leka, 100 µL pufera za lizu, i po dve cirkonijumske kuglice. Vajla je prvo centrifugirana na 12000 g tokom 20 minuta. Zatim su vajle stavljene na vorteks tokom pola minuta i ponovo centrifugirane na 12000 g tokom 20 minuta. Dobijeni homogenat se koristio za dalja ispitivanja.

Ispitivanje aktivnosti SOD. Enzimski esej i izračunavanja su urađena u skladu sa literaturom (Vukićević 2016; Misra i Fridovich 1972). Za određivanje aktivnosti SOD je korišćen karbo-natni pufer: 0.05 mmol/L pH 10.2, kome je dodat 1 mmol/L EDTA, 15 mmol/L HCl i osnovni rastvor adrenalina: 10 mmol/L, rastvoren u 15 mmol/L HCl. Za slepu probu u kivetu je dodato 700 µL karbonatnog pufera pH 10.2 i 50 µL 10mmol/L adrenalina u HCl-u. U kivetu je dodato 10 µL uzorka homogenate embriiona, 690 µL karbonatnog pufera i 50 µL osnovnog rastvora adrenalina, zatim inkubirana u mraku tokom 3 minuta na 25°C (vreme preinkubacije). Potom su na spektrofotometru očitavane ap-sorbance na svakih 9 sekundi, tokom 3 minuta na talasnoj dužini 450 nm. Aktivnost SOD se iz-ražava kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina.

Izračunavanje aktivnosti SOD. Relativna aktivnost SOD je ona koja dovodi do inhibicije 50 % autooksidacije adrenalina u definisanim uslovima. Početna koncentracija adrenalina iznosila je 10 mmol/L a potom su pravljena raz-blaženja dok nije postignuta relativna promena ap-sorbance (ΔA_{min}) od 0.025. Ova vrednost je izabarana jer je utvrđeno da SOD tada postiže najveću inhibiciju autooksidacije adrenalina. U uslovima u kojima je izvedena reakcija, odgova-rajuća koncentracija adrenalina je iznosila 3 mmol/L u kontrolnoj grupi. Kod uzorka sa homogenatom koji je tretiran nifedipinom u

najmanjoj koncentraciji od 0.25 µg/L, postupak je ponovljen. Prilikom izračunavanja aktivnosti SOD u obe grupe, uzeta je apsorbance uzorka u kome je koncentracija adrenalina 3 mmol/L. Jedinična aktivnost koja bi dovela do 50% sma-njenja apsorbanje u takvom uzorku je 0.0125. Aktivnost SOD u relativnim jedinicama se izra-čunava preko sledeće proporcije:

$$0.0125 : 1 \text{ U} = (0.025 - \Delta A_{min}) : X$$

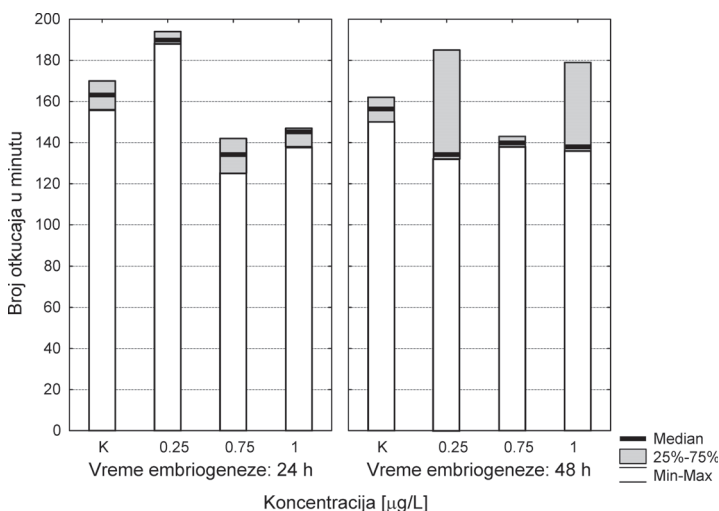
pri čemu X označava aktivnost SOD u uzorku, ΔA_{min} je relativna promena apsorbanje po mi-nutu u odnosu na slepu probu, 1U je definisana jedinična aktivnost.

Ukupna koncentracija proteina. Za određi-vanje ukupne koncentracije proteina korišćena je metoda po Bradfordu (1976). Apsorbance je očitavana na talasnoj dužini 595 nm na spektro-fotometru.

Rezultati

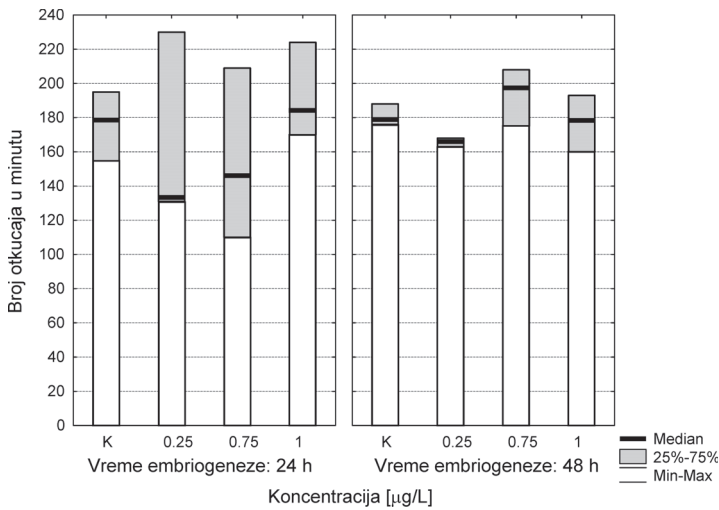
Embriogeneza. Nakon 48 sati od početka tretmana, koji predstavlja najosetljiviji period tokom embriogeneze kod zebrića modela, rast i razviće embriona nisu bili pod uticajem nijedne od primenjenih koncentracija nifedipina ili diltiazema i stopa preživljavanja embriona je bila 100%.

Srčani ritam. Izuzev najmanje koncentracije diltiazema koja iznosi 0.25 µg/L i najveće kon-



Slika 1. Prosečni broj otkucaja srca kod embriona zebrića nakon 24 i 48 sati od početka tretiranja diltiazemom

Figure 1. Average heart rate of zebrafish embryos after 24 and 48 hours after initiation of diltiazem treatment



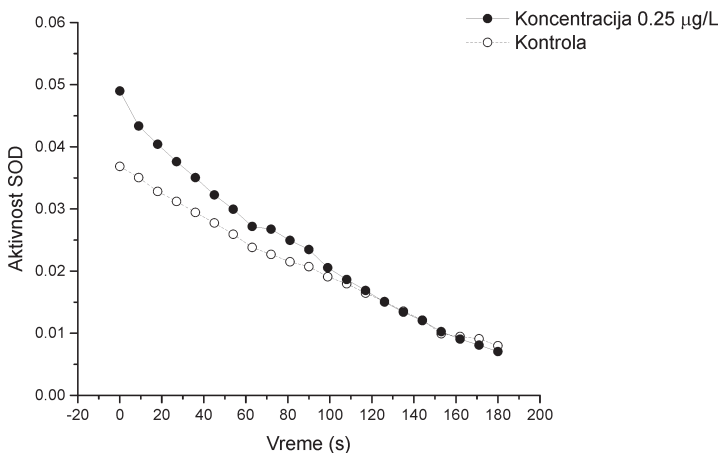
Slika 2. Prosečni broj otkucaja srca kod embriona zebraica nakon 24 i 48 sati od početka tretiranja nifedipinom

Figure 2. Average heart rate of zebrafish embryos after 24 and 48 hours after initiation of nifedipine treatment

centracije nifedipina koja iznosi 1 µg/L, diltiazem i nifedipin nakon 24 i 48 h od početka tretmana, dovode do smanjenja broja otkucaja srca embriona zebraica u odnosu na kontrolnu grupu. Rezultati su prikazani na slici 1 za diltiazem i slici 2 za nifedipin.

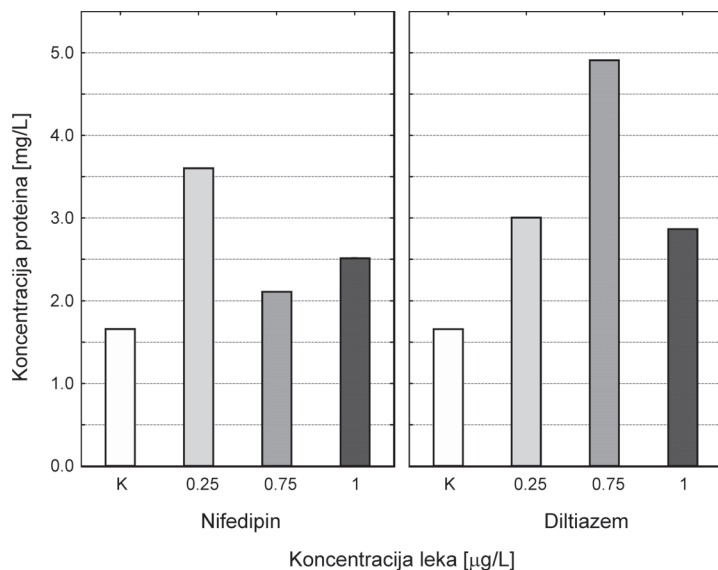
Aktivnost SOD. Rezultati pokazuju da je došlo do neznatnog povećanja aktivnosti SOD nakon tretiranja embriona. U kontroli, procenat inhibicije autooksidacije adrenalina je bio 40 %. Pri tretmanu najmanjom testiranom koncentracijom procenat inhibicije je 41.6 %. Relativna promena apsorbanci u toku vremena je prikazana na slici 3.

Ukupna koncentracija proteina. Bradfordovim esejom nije pokazano da tretmani diltiazemom i nifedipinom u testiranim koncentracijama ispoljavaju jasan trend povećanja ukupne koncentracije proteina u odnosu na kontrolnu grupu. U kontrolnoj grupi ukupna koncentracija proteina iznosila je 1.57 mg/mL, dok vrednosti koncentracije pri ostalim tretmanima nisu imale monoton rast sa povećanjem koncentracije lekova. Ukupne koncentracije proteina u tretiranim embrionima prikazane su na slici 4.



Slika 3. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) kod embriona zebraica pre i nakon tretiranja nifedipinom u definisanim vremenima

Figure 3. Superoxide dismutase (SOD) activity in zebrafish embryos before and after nifedipine treatment at defined times



Slika 4. Ukupne koncentracije proteina kod embriona zebrića nakon izlaganja različitim koncentracijama nifedipina i diltiazema

Figure 4. Total protein concentrations in zebrafish embryos after exposure to different concentrations of nifedipine and diltiazem

Diskusija

David i Pancharatna (2009) su pokazale da paracetamol negativno utiče na normalan razvoj, rast i ponašanje embriona zebrića. Rezultati našeg rada pokazuju da tokom perioda izlaganja koncentracijama nifedipina i diltiazema ne dolazi do deformacija u ranom periodu razvika zebrića. Iako ranije studije (*ibid.*) ukazuju na to da lekovi, u zavisnosti od njihove strukture, delovanja i koncentracije, mogu imati različite efekte na živi svet u vodama, potrebno je još studija sa grupom lekova korišćenih u našoj studiji, kako bismo potvrdili naše rezultate.

Bartoskova i saradnici (2013) su dokazali da kod zebrića, pri koncentracijama ibuprofena od 0.0001, 0.005, 1, 8 i 25 µg/L tokom 28 dana, dolazi do značajnog povećanja aktivnosti enzima glutatjon peroksidaze (GPx) i glutatjon S-transferaze (GST). Naši rezultati, kojima je pokazano da nifedipin, pri koncentraciji od 0.25 µg/L dovodi do neznatnog povećanja aktivnosti enzima SOD u odnosu na kontrolnu grupu, u saglasnosti su sa ovim radom. Ovo ukazuje da nifedipin dovodi do povećanog oksidativnog stresa što uslovljava povećanu aktivnost SOD, čime nifedipin pokazuje nisku toksičnost.

Hallare i saradnici (2004) su takođe pokazali da diklofenak pri koncentracijama od 0, 1, 20, 100, 500, 1000 i 2000 µg/L nakon 96 h ne utiče na povećanje ili smanjenje otkucaja srca. U istom

radu, Hallare je pokazao da rastvarači DMSO pri visokim koncentracijama utiču na smanjenje broja otkucaja srca. Mi smo pokazali da nifedipin i diltiazem izazivaju smanjenje broja otkucaja srca u odnosu na kontrolnu grupu. Ovo se može objasniti pomoću mehanizma dejstva diltiazema i nifedipina i činjenicom da se koriste kao lekovi u terapiji povišenog krvnog pritiska. Iako povećanje koncentracije ukupnih proteina nije bila statistički značajna nakon tretmana u odnosu na kontrolu, ona može biti direktan odraz povećane ekspresije proteina. Ovaj rezultat, zajedno sa sniženim brojem otkucaja srca, pruža potporu činjenici da nifedipin i diltiazem imaju nisku toksičnost tokom ranog razvoja zebrića.

Zaključak

Rezultati antioksidativnog testa pokazuju da kod embriona zebrića dolazi do neznatnog povećanja aktivnosti superoksid dismutaze i usled toga povećanog oksidativnog stresa zbog namogomilavanja Ca^{2+} jona unutar ćelije. Takođe, povećana koncentracija Ca^{2+} jona utiče na povećanje ukupne koncentracije proteina i smanjenje broja otkucaja srca kod embriona tretiranih nifedipinom i diltiazemom u odnosu na kontrolu.

Smernice ka daljim istraživanjima uključuju i utvrđivanje proteina koji dovode do povećanja ukupne koncentracije proteina, utvrđivanje dejstva i mehanizma delovanja drugih grupa lekova

na živi svet u vodama kao i do razvoja novih tehnika za prečišćavanje otpadnih voda.

Zahvalnost. Zahvaljujem se Darku Pufloviću, asistentu na Elektronskom fakultetu u Nišu, na dizajniranju programa Heart Beat Calculator koji je omogućio analizu srčanog ritma kod zebrića.

Literatura

Bartoskova M., Dobsikova R., Stancova V., Zivna D., Blahova J., Marsalek P., et al. 2013. Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. *Neuroendocrinology letters*, **34** (suppl. 2): 102.

Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248.

Braunbeck T., Lammer E. 2005. Draft Detailed Review Paper on Fish Embryo Toxicity Assays. German Federal Environment Agency (UBA Contract Number 203 85 422). Press Office: Dessau, Germany.

Braunbeck T., Lammer E. 2006. Background Paper on Fish Embryo Toxicity Assays. German Federal Environment Agency (UBA Contract Number 203 85 422). Press Office: Dessau, Germany.

Busquet F., Nagel R., von Landenberg F., Mueller S. O., Huebler N., Broschard T. H. 2008. Development of a New Screening Assay to Identify Proteratogenic Substances using Zebrafish *Danio rerio* Embryo Combined with an Exogenous Mammalian Metabolic Activation System (mDarT). *Toxicological Sciences*, **104** (1): 177.

Chutter F. M. 1998. Research on the rapid biological assessment of water quality impacts in streams and rivers. Water Research Commission Report No 422/1/98, Pretoria.

David A., Pancharatma K. 2009. Effect of acetaminophen (paracetamol) in the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Applied Toxicology*, **29**: 597.

EC (European Commission – Joint Research Centre) 2014. *EURL ECVAM recommendation on the zebrafish embryo acute toxicity test method (ZFET)*

for acute aquatic toxicity testing. Luxembourg: Publications Office of the European Union

EFSA (European Food Safety Administration) 2005. Aspects of the biology and welfare of animals used for experimental and other scientific purposes. *EFSA Journal*, **292**: 1.

Gordeeva A. V., Zvyagilskaya R. A., Labas Y. A. 2003. Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells. *Biochemistry (Mosc)*, **68**: 1077.

Hallare A. V., Köhler H. R., Triebkorn R. 2004. Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere*, **56**: 659.

ISO 15088 2007. Water quality-Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). International Organization for Standardization: Geneva

Jorgensen S. E., Halling-Sorensen B. 2000. Drugs in the environment. *Chemosphere*, **40**: 691.

Kolpin D. W., Furlong E. T., Meyer M. T., Thurman E. M., Zaugg S. D., Barber L. B., Buxton H. T. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U. S. streams, 1999–2000: methods, development and national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, **36**: 1202.

Kot-Wasik A. K., Dębska J., Namieśnik J. 2007. Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products. *Trends in Analytical Chemistry*, **26** (6): 557.

Mansour F., Al-Hindi M., Saad W., Salam D. 2016. Environmental risk analysis and prioritization of pharmaceuticals in a developing world context. *Science of the Total Environment*, **557–558**: 31.

Misra H. P., Fridovich I. 1972. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, **247**: 3170.

Vukićević P. S. 2016. Uticaj različitih operativnih tehnika tokom hirurške revaskularizacije miokarda na oksidativni stress i antioksidativnu zaštitu. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Doktora Subotića 8, 11000 Beograd.

Westerfield M. 2000. *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed. Eugene: Univ. of Oregon Press

Aleksandar Jokić

The effect of Diltiazem and Nifedipine on the Embryogenesis, Cardiac Function and Antioxidant Enzymes of Zebrafish (*Danio rerio*)

The presence of pharmaceuticals has been reported to be present in surface waters all around the world. Contamination with this type of waste raises a potential fatal risk to aquatic ecosystems, with consequent changes that will largely depend on the concentration of the pollutant itself. The effect of calcium channel blockers, diltiazem, and nifedipine on the embryogenesis and cardiac function of zebrafish embryos (*Danio rerio*), as well as their effect on total protein concentration and superoxide dismutase (SOD) enzyme activ-

ity, was shown in this paper. Zebrafish embryos were exposed to different doses of drugs (1, 0.75, 0.5 and 0.25 µg/L) in triplicate and observed under an inverted microscope after 24 and 48 hours in order to follow morphogenesis. Determination of total protein concentration was performed using the Bradford method, while SOD activity was determined spectrophotometrically by measuring the adrenaline auto-oxidation. Heart rate analysis was performed using a specially designed Heart Rate Calculator and ImageJ video processing software. The results showed that nifedipine and diltiazem do not affect embryogenesis in the mentioned concentrations, but do increase the total protein concentration. Also, the results show that nifedipine and diltiazem reduce the heart rate in the treated embryos relative to the control group. Besides, nifedipine has the effect of increasing SOD activity. 