

Ελεγχόμενη πρόκληση λόρδωσης στο zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton 1822)

Αλίκη Πρίντζη¹, Στέφανος Φραγκούλης¹, Γεώργιος Γελαδάκης¹, Αναστασία Δημητριάδη¹,
Κλεονίκη Κεκλίκoglou², Χρήστος Αρβανιτίδης², Γεώργιος Κουμουνδούρος¹

¹Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, alikipr95@gmail.com, stefanos_fragkoulis@hotmail.com, grad833@edu.biology.uoc.gr,
adimitriadibio@gmail.com, gekound@biology.uoc.gr

² Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών, Κρήτη, keklikoglou@hcmr.gr, arvanitidis@hcmr.gr

ABSTRACT

Alice Printzi, Stefanos Frangkoulis, George Geladakis, Anastasia Dimitriadi, Kleoniki Keklikoglou, Christos Arvanitidis, George Koumoundouros: Exercise induced lordosis in zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton 1822)

Plasticity of vertebrate's skeleton is widely accepted. Through continuous procedures of remodeling and reshaping (Hall & Witten 2007) a variety of skeletal changes can be detected. We have chosen enhanced swimming activity as a means of inducing changes in skeletal level. Forcing juvenile zebrafish against a swimming regime of 0.0, 5.0, 6.5 or 8.0 TL·s⁻¹ water velocity we were able to induce lordosis development. Results demonstrate that lordosis time of appearance and severity depends on swimming intensity. Moreover as lordosis was observed at the moment of apparition we were able to recognize deformed area with detail and to suggest for the first time a method to induce skeletal deformities in an animal model.

Keywords: exercise, lordosis, skeleton, zebrafish

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο σκελετός των σπονδυλωτών αποτελεί ένα δυναμικό σύστημα, το οποίο υπόκειται σε συνεχείς αλλαγές σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους (Hall & Witten 2007). Στις αλλαγές αυτές περιλαμβάνονται αναδιαμορφώσεις σχήματος ή δομής καθώς και αντικαταστάσεις των σκελετικών στοιχείων. Οι κυριότεροι σκελετικοί ιστοί που συμμετέχουν είναι τα οστά και οι χόνδροι. Στους τελεόστεους έχειδειχθεί ότι ερεθίσματα για τέτοιου είδους διαδικασίες μπορούν να αποτελέσουν η αλλομετρική αύξηση, η ανάγκη αντικατάστασης ιστών, η μηχανική απόκριση καθώς και η αποκατάσταση σε απώλεια ή τραυματισμό των σκελετικών στοιχείων (Witten & Huyssseune 2009). Ο όρος λειτουργική προσαρμογή των οστών των τελεόστεων, περιλαμβάνει μία ευρεία συλλογή παραγόντων επιγενετικής προέλευσης που είναι πλέον αποδεκτό ότι συμβάλλουν στη φαινοτυπική πλαστικότητα του σκελετού. Ένας από τους πιο σημαντικούς αυτούς παράγοντες είναι τα αυξημένα μηχανικά φορτία, τα οποία επάγουν πληθώρα σκελετικών αλλαγών. Το πιο δοκιμασμένο και επιτυχές μέσο πρόκλησης αυξημένων φορτίων στους τελεόστεους είναι η εφαρμογή κάποιου πρωτοκόλλου έντονης άσκησης. Μέσω της άσκησης έχειδειχθεί ότι μπορεί να τροποποιηθεί το αναπτυξιακό πρότυπο στο zebrafish (Fiaz *et al.* 2012) ενώ οι Suniaga *et al.* (2018) παρατήρησαν αυξημένη οστέινη μάζα σαν απόκριση σε συνθήκες κολύμβησης εκτός του φυσιολογικού ορίου στο ίδιο είδος. Η ανάγκη ανάπτυξης ενός γρήγορου και ασφαλούς μοντέλου εισαγωγής και κατ'επέκταση μελέτης των σκελετικών δυσπλασιών με βάση τις παραπάνω γνώσεις δεν άργησε να δημιουργηθεί. Στη βάση αυτή προτάθηκαν σαν μέθοδοι η χειρουργική αφαίρεση της υπόφυσης (Fjellidal *et al.* 2004) καθώς και η αυξημένη κολυμβητική άσκηση ύστερα από αφαίρεση του ουραίου πτερυγίου (Kihara *et al.* 2002). Ωστόσο απώτερος σκοπός της εισαγωγής ενός τέτοιου μοντέλου είναι η αποσαφήνιση του μηχανισμού μέσω του οποίου οι σκελετικές ανωμαλίες εμφανίζονται καθώς και η απλότητα και επαναληψιμότητα των συνθηκών. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της άσκησης σε ιχθύδια zebrafish.

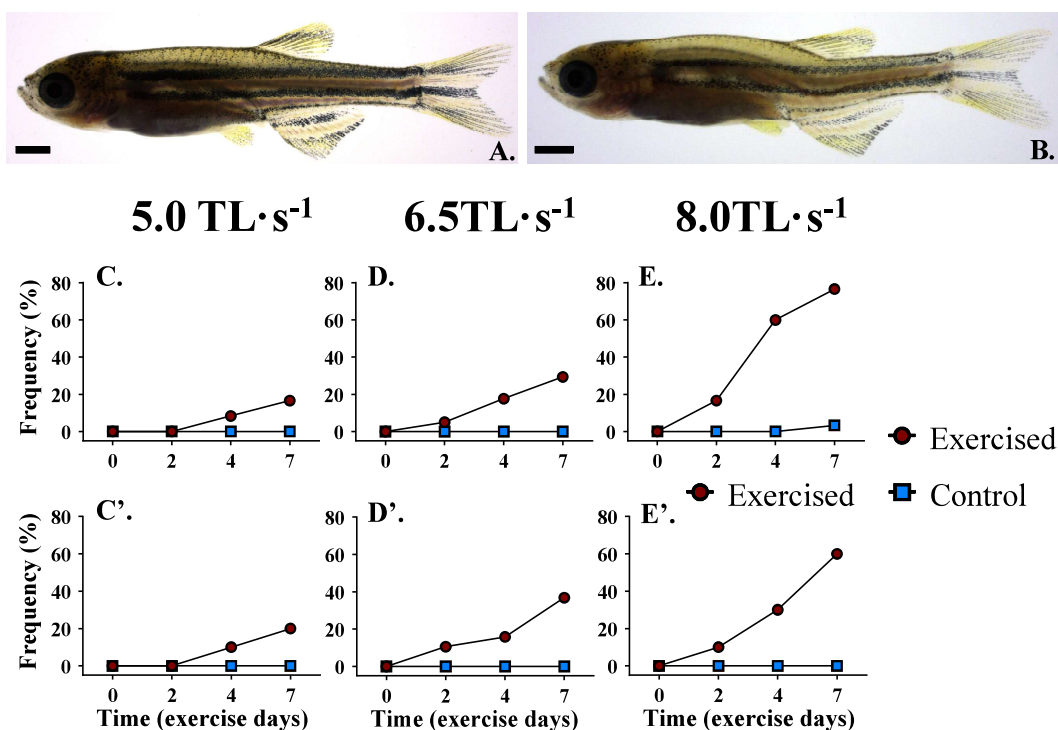
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση της άσκησης στους σπόνδυλους ιχθυδίων zebrafish σχεδιάσαμε ένα πειραματικό πρωτόκολλο άσκησης. Σύμφωνα με αυτό ιχθύδια κοινής προέλευσης, ολικού μήκους (TL) 10-11 mm, υποβλήθηκαν σε τρεις διαφορετικές ταχύτητες συνεχόμενης κολύμβησης ίσες με 5,0 , 6,5 ή 8,0 TL·s⁻¹ για μια περίοδο επτά ημερών. Κατά τη διάρκεια της εβδομάδας άσκησης τα ιχθύδια εξετάζονταν τακτικά για την παρουσία λόρδωσης. Στο τέλος του πειράματος πραγματοποιήθηκε οστεολογική εξέταση των ατόμων με ιστολογικές τεχνικές και αξονική

μικροτομογραφία. Για την περιγραφή της λόρδωσης μετρήθηκε η γωνία καθώς και το κέντρο της παραμόρφωσης. Η γωνία μετρήθηκε με το λογισμικό tpsDig2 software (Rohlf 2015). Όσον αφορά την στατιστική ανάλυση, η στατιστική σημαντικότητα των συχνοτήτων της λόρδωσης ελέγχθηκε με G-test (Sokal & Rohlf 1981) ενώ για τις γωνίες χρησιμοποιήθηκε Kruskal–Wallis and Mann–Whitney *U* στατιστικό (Sokal & Rohlf 1981) ύστερα από ένα μετασχηματισμό τους σε συνημίτονα. Η αξονική μικροτομογραφία έγινε σε SkyScan 1172, 1-2 μm resolution και οι εικόνες μετασχηματίστηκαν στο λογισμικό NRecon και επεξεργάστηκαν στο Amira v.5.2 (Visage Imaging, Berlin, Germany, Burlington USA).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μακροσκοπική εξέταση των ιχθυδίων κατά τη διάρκεια της πειραματικής εβδομάδας έδειξε ότι η κολυμβητική άσκηση προκαλεί ανάπτυξη λόρδωσης. Μάλιστα ανάλογα με την ένταση της άσκησης, η λόρδωση ήταν ορατή μόλις από τη δεύτερη (6,5-8,0 $\text{TL}\cdot\text{s}^{-1}$) ή την τέταρτη (5,0 $\text{TL}\cdot\text{s}^{-1}$) ημέρα άσκησης (Εικόνα 1). Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας η λόρδωση ήταν διακριτή στο 15,4-20,0 %, 25,0-35,0% και 60,0-76,7% των ατόμων στα 5,0 , 6,5 και 8,0 $\text{TL}\cdot\text{s}^{-1}$ ταχύτητα άσκησης αντίστοιχα (Εικόνα 1). Στην περίπτωση των ομάδων ελέγχου, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική απόκλιση από τον φυσιολογικό φαινότυπο.

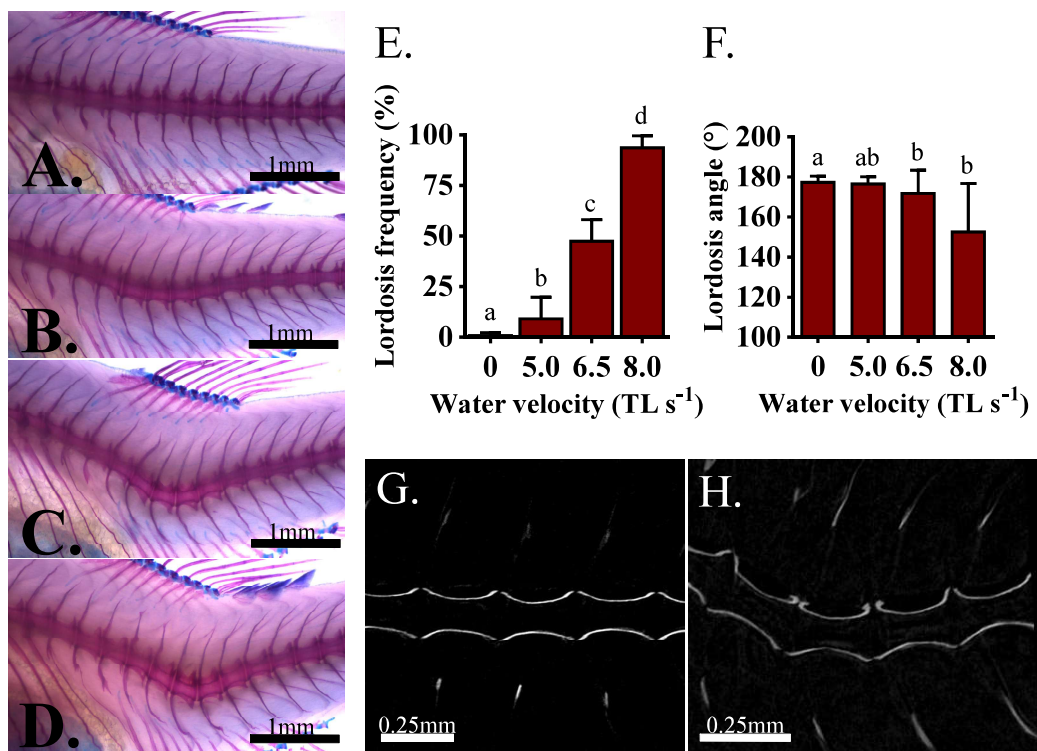


Εικόνα 1: Επίδραση της άσκησης στην ανάπτυξη λόρδωσης στο zebrafish. Ιχθυύδια zebrafish με φυσιολογικό (A) και παραμορφωμένο (B) εξωτερικό φαινότυπο. C-E', εξέλιξη της συχνότητας της λόρδωσης κατά την διάρκεια της πειραματικής εβδομάδας, υπό διαφορετικές ταχύτητες κολύμβησης (5,0 , 6,5 , 8,0 $\text{TL}\cdot\text{s}^{-1}$). Τα C-E και C'-E' δείχνουν τα αποτελέσματα των δύο πειραματικών επαναλήψεων. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 1 mm.

Figure 1: Effect of swimming induced lordosis in zebrafish. Representative cases of juvenile zebrafish with normal (A) and deformed (B) external morphology. C-E', frequency of lordosis on juvenile zebrafish during exercise week exposed to three experimental water velocities (5.0, 6.5, 8.0 $\text{TL}\cdot\text{s}^{-1}$). C-E and C'-E' represent two different replicates performed. Scale bars equals to 1 mm.

Η κατηγοριοποίηση και ποσοτικοποίηση της λόρδωσης *in vivo* επιβεβαιώθηκε με την ιστολογική εξέταση του σκελετού (Εικόνα 2A-2D). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ταχύτητα κολύμβησης επέδρασε σημαντικά στη συχνότητα της λόρδωσης ($p < 0,05$, G-test), η οποία κυμάνθηκε από $7,5 \pm 10,6\%$ στα 5,0

TL·s⁻¹ ως και 92,5±6,0% στα 8,0 TL·s⁻¹ ταχύτητα κολύμβησης (Εικόνα 2Ε). Αντίστοιχα σημαντική ήταν η επίδραση της ταχύτητας κολύμβησης στη μέση γωνία λόρδωσης ($p < 0,001$ Kruskal–Wallis and Mann–Whitney test), η οποία κυμάνθηκε από 176,4±2,1° (5 TL s⁻¹) σε 152,6±15,8° (8 TL·s⁻¹). Αναφορικά με το κέντρο της παραμόρφωσης, αυτό εντοπίσθηκε μεταξύ του 2^{ου} και 6^{ου} αιματικού σπονδύλου. Η ψηφιακή απεικόνιση του σκελετού έδειξε ότι η λόρδωση ξεκινά να αναπτύσσεται λόγω της αναδίπλωσης του ανώτερου πρόσθιου και οπίσθιου τμήματος του σπονδύλου (Εικόνα 2G-H).



Εικόνα 2: Θέση και ποσοτικοποίηση της λόρδωσης. Φυσιολογικά (Α) και διαφορετικής έντασης λόρδωτικά άτομα (Β-Δ). Ε-Ε, συχνότητα και γωνία παραμόρφωσης στις τρεις πειραματικές ταχύτητες. Ψηφιακές εικόνες των ίδιων αιματικών σπονδύλων φυσιολογικού (Γ) και λόρδωτικού ατόμου (Η). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με απουσία κοινού γράμματος ($p < 0,05$).

Figure 2: Location and quantification of lordosis. Normal (Α) and of various intensity lordosis (Β-Δ) juvenile zebrafish. (Ε-Ε), lordosis frequency and angle degree. Digital images of same haemal region on a normal (Γ) and lordotic (Η) juvenile. Significant statistical differences between groups are indicated by absence of a common letter ($p < 0.05$).

Η σωματική άσκηση και τα αποτελέσματα που επιφέρει έχουν απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα. Συγχρόνως, οι σκελετικές παραμορφώσεις αποτελούν σήμερα πολυσυζητημένο αντικείμενο σε διάφορους τομείς όπως η ιχθυοκαλλιέργεια ή η έρευνα γύρω από τη βιολογία των οστών. Όσον αφορά στην ιχθυοκαλλιέργεια, οι παραμορφώσεις αποτελούν σημαντική συνιστώσα υποβάθμισης της ποιότητας των παραγόμενων ιχθύων (Κουμουندούρος *et al.* 2001). Αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην επίδρασή τους στο σχήμα σώματος.

Στη βάση της προσπάθειας πρόκλησης σκελετικών αλλαγών μέσω άσκησης, γνωρίζουμε ότι από τα νεαρά νυμφικά στάδια είναι δυνατόν να εμφανιστούν χρωροχρονικές αλλαγές στη σκελετογένεση του zebrafish, ως απόκριση σε μηχανικές δυνάμεις λόγω άσκησης (Fiaz *et al.* 2010). Οι αλλαγές αυτές αφορούν κυρίως τμήματα του κρανιακού και ουραίου σκελετού υψηλής λειτουργικής σημασίας για τις δεδομένες συνθήκες. Ο μηχανισμός πίσω από τις αλλαγές αυτές σε ακυτταρικά οστά έχει αποσαφηνιστεί (Witten & Huysseune 2009).

Οι περισσότερες εργασίες έως σήμερα επικεντρώνονται στη μελέτη των γενεσιουργών παραγόντων των παραμορφώσεων, των ανατομικών περιοχών που αυτές πλήττουν καθώς και του αναπτυξιακού σταδίου στο οποίο εμφανίζονται, με απώτερο στόχο την εφαρμογή των αποτελεσμάτων στη δημιουργία πρωτοκόλλων ποιότητας. Από την πλευρά της σκελετικής βιολογίας, οι παραμορφώσεις χαρακτηρίζονται ως παθήσεις στις οποίες έως σήμερα δεν εφαρμόζεται κάποια ακριβής και ασφαλής μέθοδος πρόληψης. Και αυτό συμβαίνει διότι η πρόκληση παραμορφώσεων στο εργαστήριο δεν έχει τελειοποιηθεί ώστε να μπορούν να μελετηθούν οι παραμορφώσεις στη χρονική στιγμή της γένεσής τους και να αποκρυπτογραφηθούν οι αλλαγές των σκελετικών στοιχείων πίσω από αυτές. Αυτό αποτελεί μία πρόκληση για τη μελλοντική έρευνα στο συγκεκριμένο πεδίο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Fiaz A, Van Leeuwen J, Kranenbarg S (2010) Phenotypic plasticity and mechano-transduction in the teleost skeleton. *Journal of Applied Ichthyology* 26(2): 289-293
- Fiaz A, Léon-Kloosterziel WKM, Gort G, Schulte-Merker S, Van Leeuwen J, Kranenbarg S (2012) Swim-Training Changes the Spatio-Temporal Dynamics of Skeletogenesis in Zebrafish Larvae (*Danio rerio*). *PLOS ONE* 7(4): e34072
- Fjellidal PG, Grotmol S, Kryvi H, Gjerdet NR, Taranger GL, Hansen T, Porter MJR, Totland GK (2004) Pinealectomy induces malformation of the spine and reduces the mechanical strength of the vertebrae in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Pineal Research* 36(2): 132-139
- Hall BK, Witten PE (2007) Plasticity of and transitions between skeletal tissues in vertebrate evolution and development. *Major transitions in vertebrate evolution*: 13-56
- Kihara M, Ogata S, Kawano N, Kubota I, Yamaguchi R (2002) Lordosis induction in juvenile red sea bream, *Pagrus major*, by high swimming activity. *Aquaculture* 212(1): 149-158
- Koumoundouros G, Divanach P, Kentouri M (2001) The effect of rearing conditions on development of saddleback syndrome and caudal fin deformities in *Dentex dentex* (L.). *Aquaculture* 200(3): 285-304
- Rohlf F J (2015) The tps series of software. *Hystrix* 26(1): 1-4
- Sokal R, Rohlf F (1981) *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*.
- Suniaga S, Rolvien T, Vom Scheidt A, Fiedler IAK, Bale HA, Huysseune A, Witten PE, Amling M, Busse B (2018) Increased mechanical loading through controlled swimming exercise induces bone formation and mineralization in adult zebrafish. *Scientific Reports* 8(1): 3646
- Witten PE, Huysseune A (2009) A comparative view on mechanisms and functions of skeletal remodelling in teleost fish, with special emphasis on osteoclasts and their function. *Biological Reviews* 84(2): 315-346