

ISSN 2782-3806
 ISSN 2782-3814 (Online)
 УДК 616.8-039.42

ЗЕБРАДАНИО (ZEBRAFISH) КАК МОДЕЛЬ РЕДКИХ (ОРФАННЫХ) ЗАБОЛЕВАНИЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

**Державина К. А.¹, Ильин Н. П.¹, Серединская М. В.¹, Неруш М. О.¹,
 Захарченко К. В.¹, Сорокин Д. В.¹, Демин К. А.¹, Калугев А. В.^{1, 2, 3}**

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А. М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Калугев Алан Валерьевич,
 ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
 Минздрава России,
 ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
 Россия, 197341.
 E-mail: avkalueff@gmail.com

Демин Константин Андреевич,
 ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
 Минздрава России,
 ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
 Россия, 197341.
 E-mail: deminkasci@gmail.com

Статья поступила в редакцию 21.01.2022
 и принята к печати 01.02.2022.

РЕЗЮМЕ

Редкие (орфанные) заболевания — биомедицинская проблема мирового уровня. На поиск лекарств от этих заболеваний затрачиваются огромные усилия и средства. Зебраданию (zebrafish) могут обеспечить скрининг новых лекарственных препаратов, углубить понимание редких патологических состояний. В этом обзоре рассмотрены различные модели орфанных заболеваний нервной системы на зебрадании и связанные с ними проблемы и перспективы в контексте развития персонализированной медицины.

Ключевые слова: болезни развития нервной системы; зебраданию, нейродегенеративные заболевания, орфанные (редкие) заболевания, персонализированная медицина.

Для цитирования: Державина К.А., Ильин Н.П., Серединская М.В., Неруш М.О., Захарченко К.В., Сорокин Д.В., Демин К.А., Калугев А.В. Зебраданию (zebrafish) как модель редких (орфанных) заболеваний нервной системы. Российский журнал персонализированной медицины. 2022; 2(2):17-32. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-2-17-32

ZEBRAFISH AS A MODEL ORGANISM FOR RARE DISEASES OF NERVOUS SYSTEM

Derzhavina K. A.¹, Ilyin N. P.¹, Seredinskaya M. V.¹, Nerush M. O.¹, Zakharchenko K. V.¹, Sorokin D. V.¹, Demin K. A.¹, Kalueff A. V.^{1, 2, 3}

¹ Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

² President of Russia B. N. Yeltsin First Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia

³ Academician A. M. Granov First Russian Scientific Center of Radiology and Surgical Technologies, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Kaluev Alan V.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: avkalueff@gmail.com

Demin Konstantin A.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: deminkasci@gmail.com

Received 21 January 2022; accepted
01 February 2022.

ABSTRACT

Rare (orphan) diseases are an urgent unmet biomedical problem. Tremendous efforts and resources are expended for the search for cures for these diseases. Zebrafish can provide a powerful screening tool for novel orphan drugs, and may also deepen our mechanistic understanding of such rare pathological conditions. Here, we discuss various models of orphan diseases of the nervous system on zebrafish, and outline associated problems, limitations and prospects in the context of the development of personalized medicine.

Key words: neurodegenerative diseases, neurodevelopmental disorders, orphan (rare) diseases, personalized medicine, zebrafish.

For citation: Derzhavina KA, Ilyin NP, Seredinskaya MV, Nerush MO, Zakharchenko KV, Sorokin DV, Demin KA, Kalueff AV. Zebrafish as a model organism for rare diseases of nervous system. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(2):17-32. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-2-17-32

Список сокращений: ВИЧ — вирус иммунодефицита человека, МО — морфолиновые олигонуклеотиды, НРРС — нарушение развития нервной системы, НЦЛ — нейрональный цероидный липофусциноз, САГ — синдром Айкарди-Гутьереса, СДВГ — синдром дефицита внимания и гиперактивности, FMRP — Fragile X Mental Retardation Protein.

ВВЕДЕНИЕ

Орфанные болезни представляют собой крайне редкие заболевания человека [1]. В каждой стране существуют свои критерии редкости для орфанных заболеваний. Например, в Европейском союзе таковыми считают заболевания, поражающие менее 1 человека на 2000 [4], а в России — не более 1 случая на 10 000 человек [5, 6]. Однако общая популяция людей с орфанными заболеваниями довольно высока и составляет 300 млн в мире [2]. Признание значимости орфанных заболеваний — важный шаг в развитии персонализированной медицины, обеспечивающий сдвиг от массовых лекарств в сторону поиска дорогостоящего лечения для малых групп населения [3].

Орфанные заболевания включают в себя диагнозы из самых разных областей медицины, но при этом можно выделить некоторые общие закономерности их течения. Более 80 % орфанных заболеваний имеют генетическую основу, часто — хроническую природу, опасность для жизни, проявляются в первые пять лет жизни и связаны с воспалением и дегенерацией. Представления об орфанных лекарственных средствах создали условия для активизации разработки лекарств для данной гетерогенной группы расстройств, несмотря на относительно меньшую экономическую выгоду их разработки для фармакологических компаний. Однако и цена за такое лечение крайне высока в связи с почти полным отсутствием конкуренции на данном рынке и экстремально высокой стоимостью разработки.

На сегодняшний день около 3 % населения Российской Федерации страдают от психических заболеваний [7]. Однако в списках орфанных заболеваний психические расстройства представлены весьма мало. Так, в российском перечне таковыми считаются два заболевания: синдром Ретта и синдром де ла Туретта. По другим классификациям, например, Genetic and Rare Disease Informatic Center (GARD) [8], синдром де ла Туретта не является орфанным заболеванием, в отличие от функционального неврологического расстройства, синдрома Гарднера-Даймонда, синдрома Метенса-Вебера и кататонии Крепелина [9]. Малая представлен-

ность психических расстройств среди орфанных заболеваний во многом объясняется тем, что, как только причина тяжелых психических симптомов находит органическое объяснение (например, когда у пациентов с anti-NMDAR энцефалитом нашли аутоантитела к глутаматным NMDA-рецепторам), то заболевание переводится в категорию неврологических, даже если непосредственно неврологические симптомы практически отсутствуют [10].

Тем не менее, экспериментальное изучение орфанных заболеваний ЦНС крайне важно, так как оно позволяет глубже исследовать патологические процессы, происходящие в организме, и способствует разработке новых орфанных лекарственных препаратов. В настоящее время рыбы зебраданию (*Danio rerio*, zebrafish) активно используются как объект для моделирования психических расстройств и патологий ЦНС в биомедицинских исследованиях. Зебраданию как модельный организм имеет множество преимуществ в трансляционной медицине. Их проще содержать и разводить (по сравнению с другими модельными животными, например, мышами и крысами), что обеспечивает доступную стоимость исследований. Зебраданию имеют короткий цикл размножения, быстрое развитие, внешнее оплодотворение и прозрачные эмбрионы, что позволяет с раннего возраста наблюдать за развитием патологии и влиять на ранние этапы нейрогенеза. Зебраданию воспроизводят много потомства, в результате чего в эксперименте можно собирать намного больше данных, чем в опытах на грызунах.

Геном зебраданию полностью секвенирован, а последовательности ДНК ключевых генов зебраданию и человека имеют более 70 % [11] гомологичных участков, что позволяет довольно точно транслировать результаты исследования на млекопитающих. Зебраданию живут около 4–5 лет, что дает возможность ставить длительные эксперименты, наблюдая за изменением поведения при патологиях от раннего возраста к старости. У зебраданию и человека также имеются подобные нейротрансмиттерные системы и структуры мозга, поэтому патология развивается по подобному механизму [12].

Данные факторы дают возможность моделировать и исследовать различные заболевания ЦНС и психики [13], а также изучать действие фармакологических препаратов [14], в том числе как хорошо известных (целебрекса [15], алкоголя [16] и никотина [17]), так и новых препаратов, в рамках доклинических исследований [18, 19]. Зебраданию обладают подобными поведенческими реакциями и способны к социальному поведению (образованию стай), поэтому их можно использовать для изучения влияния фармакологических препаратов при психических

расстройствах и патологиях ЦНС. При исследовании поведения зебраданио используют простые акватические тесты, как, например, тест нового аквариума, где измеряют число и время определенных паттернов (нахождение в верхней/нижней части аквариума, «фризинг», снижение/повышение количества перемещений) [20]. Более того, в одном аквариуме хроническому воздействию химического агента могут подвергаться сотни рыб, и зебраданио обычно требуется меньшая доза вещества, чем грызунам. Таким образом, при меньшем расходе исследуемого препарата становится возможно получить большее число наблюдений, что ускорит поиск новых орфанных лекарств.

Для генетических манипуляций на зебраданио используют множество методов генетической инженерии, в том числе нокаут генов (например, транспортеров серотонина, дофамина, глюкокортикоидного рецептора) с помощью использования технологии CRISPR/SpCas9, CRISPR/LbCas12a, нуклеазы цинкового пальца, TALENS [21, 22]. Эти методы активно используются для изучения депрессии [23, 24], шизофрении [25, 26, 27] и нейродегенеративных заболеваний (например, таупатии и семейного бокового амиотрофического склероза) [28].

Малая распространенность орфанных заболеваний не позволяет проводить крупные клинические исследования на пациентах, а, следовательно, препараты, выбранные для клинического этапа исследования, должны быть тщательно изучены на доклиническом этапе. Исследования на зебраданио могут не только дать ценную информацию об отдельных звеньях патологического процесса орфанных заболеваний, но и обеспечить скрининг потенциальных орфанных лекарств. В данном обзоре будут рассмотрены некоторые орфанные заболевания нервной системы, их модели на зебраданио и перспективы дальнейших исследований в этой области.

НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Болезнь Гентингтона

Болезнь Гентингтона — это редкое (4–10 случаев на 100 000 человек), неизлечимое нейродегенеративное заболевание, возникающее в результате мутаций гена *HTT*, кодирующего белок гентингтин [29]. Эти мутации приводят к увеличению количества CAG повторов в гене и, как следствие, увеличению длины полиглутаминового тракта в составе белка. Мутантный белок имеет тенденцию образовывать токсичные агрегаты в головном мозге, что приводит к нарушению белкового гомеостаза,

митохондриальной дисфункции и смерти клеток. Наиболее подвержен атрофическим изменениям стриатум, в котором располагаются шпоровидные ГАМК-эргические проекционные нейроны. Также предполагается, что часть из симптомов заболевания может быть обусловлена нарушением физиологической функции белка гентингтина, которая, впрочем, не до конца ясна [30].

Гомолог человеческого гена *HTT*, присутствующий в геноме зебраданио (*htt*), кодирует белок на 70 % идентичный человеческому [31]. Интересно, что в составе полиглутаминового тракта гентингтина зебраданио имеется всего 4 глутамина (в сравнении с 6–35 у человека), что делает невозможной его спонтанную агрегацию. Первые попытки моделирования симптомов болезни Гентингтона на зебраданио были связаны с «выключением» гена гентингтина за счет морфолиновых олигонуклеотидов (МО) — так называемый МО-нокаун — с целью выяснить, как отсутствие функционального белка повлияет на организм животного. Такие рыбы демонстрируют целый ряд морфологических изменений, в том числе некроз клеток мозга и микроцефалию [32]. Также наблюдается снижение содержания нейротрофического фактора мозга (BDNF) и нарушение использования организмом железа [33, 32]. Так как похожие изменения наблюдаются у пациентов с болезнью Гентингтона, эти данные свидетельствуют в пользу каузальной роли дефицита нормального гентингтина в патогенезе. По всей видимости, гентингтин играет важную роль в раннем эмбриональном развитии нервной системы зебраданио, так как выключение его гена приводит к нарушению формирования некоторых отделов головного мозга, в том числе конечного мозга [34]. Введение в эмбрионы зебраданио экзогенного BDNF частично облегчает наблюдаемые изменения, что указывает на роль данного нейротрофина как важного модулятора эффектов дефицита гентингтина [34].

Еще больше возможностей для моделирования болезни Гентингтона на зебраданио открывает создание мутантных линий, экспрессирующих человеческий гентингтин с полиглутаминовым трактом различной длины. Так же как у людей, мутантный белок в клетках зебраданио имеет тенденцию к неправильной укладке, олигомеризации и образованию нерастворимых агрегатов, что приводит к выраженным морфологическим нарушениям; при этом тяжесть наблюдаемых у мутантных зебраданио фенотипов прямо коррелирует с количеством глутаминовых остатков в поли-Q-тракте белка [34, 35]. Важным открытием стало то, что клеточная смерть наблюдается, главным образом, в отсутствие нерастворимых накоплений гентингтина, что

указывает на то, что реальной токсичностью могут обладать именно растворимые олигомеры [35]. Использование зебраданио в качестве модельного организма позволяет наблюдать накопление агрегатов гентингина *in vivo* с возможностью поиска новых терапевтических мишеней. Например, показано, что повышенная экспрессия белка chip (C-terminal Hsp70-interacting protein) совместно с мутантным гентингином значительно снижает агрегацию белка и облегчает наблюдаемый у зебраданио патологический фенотип [36]. Также удалось обнаружить несколько перспективных соединений (усилители аутофагии), способных ингибировать агрегацию химерного белка гентингин-GFP в телах зебраданио [37]. Интересно, что мутантный белок гентингин с отсутствующими 17 аминокислотами на N-конце обладает специфической токсичностью именно для нервных клеток зебраданио [38], так как мутантные рыбы, экспрессирующие этот белок, демонстрируют явные признаки нейродегенеративных процессов, а также нарушения произвольных движений.

Понтоцеребеллярные гипоплазии

Понтоцеребеллярная гипоплазия — это группа крайне редких и плохо изученных нейродегенеративных заболеваний, приводящих к смерти в раннем детском возрасте [39]. Причинами их возникновения являются мутации в генах, продукты которых участвуют, главным образом, в процессинге РНК. К симптомам понтоцеребеллярной гипоплазии относят отставание в развитии, отсутствие развитых психомоторных навыков, а также атрофию таких важных структур мозга, как мост и мозжечок.

Ген *TSEN54* кодирует белок, входящий в состав комплекса TSEN, ответственного за процессинг пре-тРНК. Подавление экспрессии гомологичного гена МО на раннем эмбриональном этапе развития зебраданио приводит к нарушению развития, нейроанатомическим дефектам заднего и среднего мозга, а также к увеличению маркеров клеточной смерти в головном мозге [40]. Интересно, что введение экзогенной мРНК, кодирующей нормальный человеческий белок TSEN54, частично восстанавливает патологический фенотип, что указывает на, по крайней мере, частичное функциональное сходство двух белков.

Подобные результаты были также получены в экспериментах с мутантными зебраданио по гену, гомологичному *CLP1* (еще один компонент комплекса TSEN) [41]. Такие рыбы демонстрируют целый ряд дефектов развития, включая искривленное тело, маленькую голову и глаза, а также маркеры нейродегенеративных процессов в заднем и среднем мозге. Кроме того, показаны дегенеративные процессы

в моторных нейронах спинного мозга. В целом, перечисленные изменения напоминают таковые, наблюдаемые в других моделях понтоцеребеллярной гиперплазии, а также у пациентов в клинике. Показательно, что инъекция нормальной мРНК человеческого *CLP1* значительно улучшает наблюдаемый фенотип, в то время как введение мутантной формы — нет. Интересно, что подавление экспрессии белка p53 у мутантных зебраданио приводит к частичному улучшению фенотипа, что может указывать на роль p53 в формировании патологического фенотипа [41]. Помимо комплекса TSEN, понтоцеребеллярная гипоплазия может также возникать в результате мутаций в генах компонентов экзосомальных комплексов. Как нокдауны [42, 43, 41], так и нокауты [44] зебраданио по генам компонентов экзосом *exosc3*, *exosc8*, и *exosc9* обладают похожим фенотипом, выражающимся в дефектах развития и поражении структур, гомологичных мозжечку, а также спинного мозга. Отмечается и увеличение экспрессии белка p53 в данной модели, что еще раз указывает на его роль в развитии заболевания [44]. В целом, генетические модели понтоцеребеллярной гипоплазии на зебраданио оказались способны достаточно аккуратно моделировать многие из симптомов заболевания, а также пролили свет на некоторые из его молекулярных аспектов.

Нейрональный цероидный липофусциноз

К этой группе относят редкие, генетически разнородные неизлечимые болезни лизосомного накопления, общим патогенным фактором которых является аккумуляция в тканях тела липопигмента липофусцина, состоящего из поперечно-связанных макромолекул [45]. Характерной особенностью этих орфанных болезней является тяжелая нейродегенерация и сопутствующие симптомы, в том числе умственная отсталость и деменция, а также смерть в раннем детском возрасте. На данный момент идентифицировано более десятка генов, мутации в которых приводят к развитию нейронального цероидного липофусциноза (НЦЛ) [46]. Разработка генетических моделей на зебраданио, в дополнение к известным моделям на грызунах, способствует изучению этиологии нейродегенеративных процессов при конкретных мутациях, а также поиску потенциальных терапевтических мишеней. Например, существует несколько моделей болезни НЦЛ2 (один из вариантов нейронального цероидного липофусциноза) на зебраданио, основанных на частичном или полном подавлении активности гена трипептидил пептидазы 1. Интересно, что в то время, как у больных НЦЛ2 первые симптомы обычно проявляются по истечении первых двух лет жизни

ни, зебраданию имеют четко выраженный фенотип (уменьшенный мозг и глаза, искривленное тело) уже через два дня после оплодотворения [47].

Патологические симптомы НЦЛ в модели зебраданию в общих чертах напоминают таковые у больных людей: нарушение локомоции, судорогоподобное поведение, гибель клеток ЦНС, астроцитоз, снижение миелинизации, увеличенный размер лизосом и судороги [47]. Это позволяет использовать данный поведенческий маркер для скрининга лекарственных препаратов в моделях НЦЛ2 и подобных заболеваний. Валидность данного подхода продемонстрирована в опытах, где показана возможность модуляции судорогоподобного поведения зебраданию вальпроатом — известным противосудорожным препаратом [48] (вальпроат также значительно увеличивает продолжительность жизни данных мутантных рыб).

Другим вариантом НЦЛ, успешно смоделированным на зебраданию, является болезнь Баттена (НЦЛ3). Данное заболевание обусловлено мутациями в гене *CLN3*, кодирующем лизосомальный белок баттенин. Подавление экспрессии гомологичного гена зебраданию (МО-нокдаун) приводит к развитию симптомов, сходных с клинической картиной болезни Баттена: нарушение моторной функции, судороги, смерть нервных клеток, ретинопатия, аксонопатия и т. д. [49]. Модель на зебраданию также отражает отличительную черту болезни — накопление в лизосомах с-субъединицы АТФ-синтазы. Как и в случае с НЦЛ2, симптомы НЦЛ3 в модели зебраданию начали проявляться уже в первые дни после оплодотворения. Таким образом, мутантные зебраданию показывают исключительную способность моделировать ключевые симптомы НЦЛ, не уступая аналогичным моделям на грызунах. Более того, наличие выраженного патологического фенотипа вместе с возможностью использования больших выборок животных открывает перспективу для проведения на зебраданию масштабных доклинических испытаний потенциальных лекарственных препаратов для терапии данных орфанных заболеваний мозга.

Болезнь Ниманна-Пика типа С

Болезнь Ниманна-Пика типа С — еще одна лизосомная патология, возникающая в результате мутаций в генах *NPC1* и *NPC2*, которые кодируют белки, участвующие в транспорте холестерина [50]. Нарушение их функции в результате мутаций приводит к накоплению холестерина и некоторых других липидов внутри лизосом, следствием чего является стремительно прогрессирующая нейродегенерация. Помимо ЦНС, страдают также и периферические органы, такие как печень и селезенка. Смерть,

как правило, наступает в детском возрасте. Как и в случае других болезней лизосомного накопления, конкретные механизмы смерти нейронов не изучены [51]. В последнее время зебраданию становится популярным модельным организмом для изучения болезни Ниманна-Пика типа С. Так, описано несколько моделей, основанных на МО-нокдауне/CRISPR-Cas9-нокауте гомологов *NPC1* и *NPC2* генов у зебраданию [52, 53, 54, 55, 56, 51, 57]. Помимо внутриклеточного накопления холестерина, увеличения размеров печени и селезенки, данным моделям удалось повторить характерные для патологии неврологические проявления: нарушение координации движений, смерть нервных клеток, изменение формы головы и размеров мозга [53, 58, 57]. Интересным наблюдением является селективная смерть клеток Пуркинье мозжечка — феномен, описанный также в модели на грызунах и у больных людей [57, 58]. Хотя почти все *npc*-/- нокауты умерли в течение первого месяца, продолжительность жизни некоторых особей достигала полугода. Этот факт представляет определенный интерес ввиду наличия клинических данных о единичных случаях пациентов, доживших до 30–40 лет с диагностированной болезнью Ниманна-Пика типа С [53].

ЭПИЛЕПСИЯ

Эпилепсия является тяжелым, широко распространенным неврологическим расстройством, характеризующимся рецидивирующей аномальной синхронной активностью в головном мозге, непроизвольными движениями или судорогами [59]. Эпилепсия является расстройством спектра с разнообразной этиологией, включающей как генетические, так и приобретенные факторы. Модели фармацевтической эпилепсии на животных хорошо проверены, но судороги в них вызываются химически или электрически в неповрежденном мозге и не имитируют аспекты многих редких синдромов эпилепсии человека, имеющих генетическое происхождение [60].

Генетические модели эпилепсии на зебраданию могут быть особенно полезны для исследования патогенеза орфанных видов эпилепсии и поиска новых эффективных препаратов (см. ниже). Фармакологические модели эпилепсии на зебраданию представлены анализом ряда поведенческих и физиологических ответов у рыб, вызванных введением конвульсантов. Подобные модели отражают общие для большинства типов эпилепсии механизмы и служат для скрининга и идентификации соединений, имеющих потенциальную противосудорожную активность.

Пентилентетразол (коразол) — конвульсант, вмешивающийся в ГАМК-эргическую нейротрансмиссию и вызывающий дисбаланс между процессами возбуждения и торможения [61]. Он активно использовался в моделях на грызунах и приводил к возникновению характерных приступов [62], которые у зебраданио представлены резкими изменениями локомоторной активности (от рывков до оцепенения) [63], коррелирующими с изменениями электрической активности мозга, фиксируемыми на ЭЭГ [63]. Модель показывает хорошую чувствительность к введению антиконвульсантов, таких как вальпроевая кислота и диазепам [64, 65]. Существуют также другие модели, которые используют метаболизм ГАМК в качестве механизма индуцирования эпилептических эффектов, например, модель с введением аллилглицина [66] и этилкетопентеноата [67], однако, они менее популярны в использовании.

Каиновая кислота — популярный конвульсант в моделях на грызунах, который является агонистом глутаматергических рецепторов, вызывая эксайтотоксичность и гибель нейронов [68]. Она вызывает как острые судороги, так и повторяющиеся припадки при внутримозговых инъекциях [60], однако, зебраданио обнаруживают высокую зависимость эффектов от времени воздействия [69]: наличие только определенных временных окон, в которые можно наблюдать судороги, делает данную модель неудобной для высокопроизводительного скрининга. Другие конвульсанты с различными механизмами действия, такие как кофеин [70], стрихнин [71], гинкготоксин [72], пикротоксин [70] и пилокарпин [73], показывают судорожные эффекты при введении, однако, в целом, являются недостаточно изученными и требуют дальнейших исследований поведенческих и нейрохимических эффектов, а также реакций на антиконвульсанты различного действия. Хотя модели фармакогенной эпилепсии на животных хорошо проверены, судороги в них вызываются химически или электрически в неповрежденном мозге и не имитируют аспекты многих редких синдромов эпилепсии человека, имеющих генетическое происхождение [60], поэтому генетические модели орфанных видов эпилепсии на зебраданио могут быть особенно полезны для исследования патогенеза и поиска новых эффективных препаратов.

Синдром Драве — редкая эпилептическая энцефалопатия младенческого возраста, в более чем 80 % случаев обусловленная мутациями в гене *SCN1A*, кодирующем α -субъединицу потенциал-зависимого натриевого канала NaV1.1. У зебраданио данный ген кодируется двумя гомологичными генами *scn1laa* и *scn1lab*, последний из которых имеет

77 % идентичность с человеческим геном *SCN1A* [74]. Гомозиготные мутантные личинки *Didys552*, жизнеспособные до 12 дней после оплодотворения (дпо), демонстрируют аномальное плавание и гиперактивность, сопровождающиеся спонтанным судорожным поведением, начиная с 4 дпо, а также темную пигментацию. Записи ЭЭГ показывают спонтанные эпилептиформные события в мозге рыб уже на 3 дпо [75].

EAST-синдром включает в себя эпилепсию, атаксию и связан с мутациями в гене *KCNJ10*, который кодирует инвертирующий калиевый канал Kir4.1 [76]. Нокдаун *kcnj10a* уже на 30 час после оплодотворения (чпо) приводит к дефектам движения в виде спонтанных сокращений тела. В возрасте 5 дпо у личинок наблюдается атаксия, аберрантные движения челюсти, глаз и плавников и пароксизмальная локомоторная активность [77]. На ЭЭГ морфанты *kcnj10a* на 5 дпо также демонстрировали пароксизмальные события [78].

Доброкачественные семейные неонатальные судороги — заболевание, проявляющееся в течение первых дней жизни в виде тонико-клонических припадков и связанное с мутациями в генах *KCNQ2* и *KCNQ3*, кодирующих субъединицы потенциал-зависимого калиевого канала Kv7. Функциональный нокдаун *kcnq3* в личинках 3–5 дпо воспроизводит эпилептический фенотип с эпилептиформными разрядами примерно у 70 % морфантов [79].

Младенческая эпилептическая энцефалопатия связана с мутациями в гене синтаксин-связывающего белка *STXBPl* [80]. Последовательности *stxbpla* и *stxbplb* зебраданио имеют 87,2 % и 78,5 % идентичности с последовательностью *STXBPl* человека, соответственно [81]. Особи двух мутантных линий *stxbpla*^{-/-} и *stxbplb*^{-/-} на 5 дпо имеют гиперпигментацию головы и туловища, у мутантов *stxbpla*^{-/-} наблюдаются морфологические дефекты развития. Выявлены тяжелые и спонтанные эпилептические припадки у мутантных личинок *stxbplb*^{-/-}. Мутанты *stxbpla*^{-/-} также демонстрируют преждевременную смерть, что соответствует фенотипу мутантных мышей *Stxbpl*^{-/-} [82].

Неспецифическая эпилептическая энцефалопатия раннего начала представляет собой редкий синдром детской эпилепсии, связанный с мутациями в гене *CACNA1A*, который кодирует $\alpha 1$ субъединицу P/Q кальциевых каналов [83]. У зебраданио *cacnala* дуплицирован и имеет 72,01 % (*cacnala*_a) и 71,28 % (*cacnala*_b) гомологии с человеческим *CACNA1A*. Более чем 90-процентный нокдаун паралога *cacnala*_a вызывает эпилептический фенотип как на поведенческом уровне, так и на уровне электрофизиологической активности.

В патогенез **миоклонической астатической эпилепсии** вовлечен ген, напрямую не связанный с ионной проводимостью или синаптической передачей, — хромодоменный хеликазный ДНК-связывающий белок (CHD2). Белок *chd2* зебраданию имеет около 70 % идентичности с белком CHD2 человека. Начиная с 2 дпо у морфантов с нокдауном *chd2* наблюдались отек перикарда, микроцефалия, искривление тела, отсутствие плавательного пузыря и замедленный рост. На 4 дпо также наблюдались поведенческие аномалии, свидетельствующие об эпилептических припадках, такие как всплески активности, подергивание грудных плавников и челюстей, а также дрожь всего тела [84].

Аутосомно-доминантная парциальная эпилепсия со слуховыми особенностями — редкий эпилептический синдром, за возникновение которого отвечают мутации гена *LGII* [85]. У зебраданию гены *lgila* и *lgilb* имеют ту же структуру, что и ген *LGII* млекопитающих [86]. Нокдаун *lgila* вызывает аномалии развития, такие как уменьшение размеров мозга и глаз с повышенным апоптозом, отек сердца и аномалии хвоста [87]. Личинки демонстрируют эпилептоподобное поведение (гиперактивность, характеризующаяся плаванием по спирали и миоклоническими подергиваниями). Снижение уровня *lgilb* приводит к тяжелым и длительным аномалиям развития — гидроцефалии, порокам развития глаз и мозга, отеку сердца и искривлению тела, но без явного эпилептического фенотипа [88].

Семейная фокальная эпилепсия с переменными очагами — заболевание, обусловленное мутацией в *DEPDC5* [89]. У зебраданию существует только один ортолог *DEPDC5*, имеющий 75 % аминокислотной идентичности с геном человека. Было обнаружено, что потеря функции *depdc5* приводит к двигательной гиперактивности эмбрионов уже в 17 чпо (всплески хвостом, повторяющаяся дрожь) [90]. На 48 дпо у морфантов *depdc5* наблюдалась абберрантная модель локомоции.

С патогенезом **пиридоксин-зависимой эпилепсии** связаны два гена — *ALDH7A1* и *PLPBP*. Для мутантных *aldh7a1*-нокаутных линий зебраданию характерно искривление оси тела, гиперактивное поведение с плаванием кругами и конвульсии, смерть происходит в возрасте 14 дпо. На ЭЭГ изменения в поведении сопровождаются высокоамплитудными иктакльными и низкоамплитудными межиктакльными разрядами [91]. Мутанты зебраданию *plpbp*-/- демонстрируют спонтанные судороги с 10 дпо и погибают к 16 дпо [92]. Хроническое лечение пиридоксином значительно увеличило продолжительность их жизни, снизило гиперлокомоцию и уменьшило количество эпилептиформных

событий. Кроме того, анализ метаболитов в мозге мутантов *plpbp*-/- 10 дпо выявил нарушение уровня ГАМК, катехоламинов и аминокислот, что свидетельствует о дисфункции PLP-зависимых ферментативных путей.

В целом, генетические модели редких типов эпилепсий у зебраданию достаточно достоверно воспроизводят основные фенотипы, характерные для данных заболеваний, что делает эти модели валидным инструментом для изучения как патогенеза заболеваний, так и для поиска новых эффективных противосудорожных препаратов.

ЭНЦЕФАЛИТЫ

Аутоиммунные энцефалиты

N-метил-D-аспарататные рецепторы (NMDAR) являются ионотропными рецепторами глутамата, и их активация играет ключевую роль в синаптической пластичности. Анти-NMDAR энцефалит диагностируется у пациентов всех возрастов, но чаще у молодых женщин и детей. Заболевание обычно начинается с острого нарушения поведения, психоза, кататонии, что впоследствии приводит к развитию судорог, нарушению памяти, дискинезии, нарушению речи, вегетативным и дыхательным расстройствам [93]. После связывания антител происходит снижение плотности NMDAR в постсинаптической мембране нейрона вследствие интернализации и деградации рецепторов, сшитых с антителами. Снижение NMDAR может теоретически привести к избыточному высвобождению глутамата в префронтальных и подкорковых структурах, что способствует развитию ряда клинических симптомов. Существует очень высокое сходство (~ 90 %) между субъединицей NMDAR человека и зебраданию, поражаемой антителами, что делает зебраданию подходящей моделью для оценки эффектов анти-NMDAR антител.

Так, при введении цереброспинальной жидкости больных анти-NMDAR энцефалитом у рыб наблюдается снижение судорожного порога и дефицит памяти. Модель зебраданию последовательно повторяет симптомы, наблюдаемые у пациентов с анти-NMDAR энцефалитом, и может стать надежной, быстрой и экономически эффективной платформой для исследования новых терапевтических стратегий против энцефалита анти-NMDAR. Еще одним интересным примером аутоиммунных энцефалитов является энцефалит, вызванный VGKC-комплексом/LGII-антителами. Это очень редкое заболевание, связанное с аутоантителами против синаптических структур нейронов, где антитела нацелены на клеточную поверхность или синаптические бел-

ки [94]. Симптомы аутоиммунного синаптического энцефалита включают судороги, нарушения памяти, аномальное поведение, снижение сознания, бессонницу, фациобранхиальные дистонические судороги и амнезию [94]. LGI1 и CASPR2 — белки, ассоциированные с комплексом потенциал-зависимых калиевых каналов (VGKC). Белки LGI1 (богатый лейцином инактивируемый глиомой протеин 1) и CASPR2 (связанный с контактином протеин 2) — компоненты комплекса потенциал-зависимых калиевых каналов (VGKC). Большая часть анти-VGKC антител, которые выявляют методом иммунопреципитации, нацелены не собственно на калиевые каналы, а на ко-преципитирующие с ними белки LGI1 и CASPR2 [95]. LGI1 — нейрональный секреторируемый белок, участвующий в организации транссинаптических белковых комплексов. Аутоиммунный энцефалит, ассоциированный с антителами к LGI1, представлен лимбическим энцефалитом с парциальными эпилептическими приступами, психопатологическим синдромом и гипонатриемией. У зебраданий, лишенных экспрессии LGI1, наблюдалось развитие судорогоподобного поведения, подтверждая роль данного белка в патогенезе [95].

Вирусные энцефалиты

Зебраданий быстро набирает популярность в качестве модели различных инфекционных заболеваний [96]. Кинетику инфекции, такую как экспрессия вирусных генов, и вирусную нагрузку можно измерить у зебраданий и других животных моделей вирусных инфекций и сравнить с вирусными инфекциями человека. Количество вирусного белка может быть определено с помощью Вестерн-блоттинга, а локализация — с помощью иммуногистохимии. Существует множество антител для выявления вирусных белков человека методами иммуногистохимии. Однако именно уникальная возможность визуализировать кинетику инфекции *in vivo* с помощью флуоресцентных вирусов человека отличает зебраданий от других животных моделей инфекционных заболеваний [96]. Такая уникальность зебраданий делает ее хорошей моделью для исследований вирусных энцефалитов. Наиболее редкими являются вирусные энцефалиты коры головного мозга, но при этом они являются потенциально опасными. Их могут вызывать вирус герпеса, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ, вызывает двустороннее диффузное изменение белого вещества), неполиомиелитные энтеровирусы (являются причиной менингита и у 3 % — энцефалита) и арбовирусы (переносятся членистоногими и являются основной причиной энцефалита во всем мире).

Наибольшую популярность получило моделирование на зебраданий инфекций, вызванных вирусом герпеса [96]. Современная модель данного возбудителя предполагает, что проникновение и распространение вируса представляет собой динамический многоступенчатый процесс, который начинается с первоначального связывания вируса с клеткой. В эмбрионы зебраданий на стадии 1–4 клеток добавляют морфолиновые олигонуклеотиды для подавления экспрессии гена 3-OST, этот ген кодирует фермент 3-OST сульфотрансферазу, который необходим для модификации вируса и дальнейшего его слияния с клеткой. При нокауте гена 3-OST вирус герпеса не заражал эмбрионы зебраданий. Найдено семь генов, два из которых являются высокоомологичными с человеческими, что позволяет использовать зебраданий как высокоэффективную модель для изучения работы фермента и его возможной роли в терапии и развития герпеса. Это также важно в изучении энцефалита, вызванного вирусом герпеса, так как оба гена, гомологичные человеческим (3-OST-3X и 3-OST-3Z), обнаружены в структурах, отвечающих за развитие ЦНС. Герпетический энцефалит проявляется как общемозговой, так и очаговой неврологической симптоматикой. Его типичными симптомами являются лихорадка, головная боль, нарушения поведения, дисфазия, атаксия [97].

НАРУШЕНИЯ РАЗВИТИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Термином «нарушение развития нервной системы» (НРПС) называют широкую и клинически гетерогенную группу заболеваний [98], которая характеризуется отклонениями в поведении, сознании, памяти, общении и/или двигательных функциях [99]. К ним относятся такие распространенные заболевания, как синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) и расстройства аутистического спектра. В основе НРПС лежат мультигенные нарушения [100], однако, не менее важен вклад эпигенетических факторов [101]. На клеточном уровне причиной НРПС могут являться дефекты в развитии и функционировании интернейронов, ответственных за образование тормозных путей в мозге [102]. Орфанными НРПС являются синдром хрупкой X-хромосомы, синдром Ретта, синдром Туретта, синдром Айкарди, синдром Айкарди-Гутьереса и ряд других заболеваний.

В связи с редкостью данных заболеваний и, следовательно, недостатком клинических данных, их моделирование на животных становится особо актуальным. Долгое время моделирование НРПС

проводили на мышах, однако в последние годы наблюдается экспоненциальное повышение интереса к моделированию НРНС на зебраданио [99]. Наиболее часто для моделирования НРНС на зебраданио используются МО [99], вследствие их низкой стоимости, простоты в использовании и недостатка методов быстрой модификации генов. Поэтому важно также моделировать НРНС путем генных модификаций (например, с помощью технологии CRISPR/Cas9) или проводить сравнение фенотипических проявлений у моделей разных типов [103]. На сегодня уже существуют модели некоторых орфанных НРНС на зебраданио.

Синдром хрупкой X-хромосомы — X-сцепленное заболевание, которое является довольно частой причиной наследственной задержки умственного развития [104]. Встречается у 1 на 7000 мужчин и 11 000 женщин [105]. Основной причиной развития синдрома является недостаток или отсутствие белка FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) [106]. В большинстве случаев заболевание связано с распространением тринуклеотидных повторов CGC в промоторной области FMR1, расположенной в локусе Xq27.3, что приводит к метилированию и, как следствие, подавлению транскрипции и дефициту FMRP. Белок FMRP зебраданио на 74 % идентичен человеческому [107]. Это позволяет моделировать синдром ломкой X-хромосомы путем нокдауна гена FMR1X, кодирующего данный белок, при помощи МО [108]. На данной модели было показано наличие анксиолитического эффекта в виде более активного исследовательского поведения, нарушения обучения избеганию и развития депрессивного поведения в сравнении с зебраданио дикого типа [108, 109]. Также на зебраданио была разработана модель с ноккаутом в том же гене по технологии CRISPR/Cas9. Были выявлены значимые дефекты в поведении, памяти и развитии костей черепа аналогичные тем, что наблюдаются у людей с синдромом хрупкой X-хромосомы. В целом, фенотипические проявления у представленных моделей соответствуют клиническим наблюдениям, что позволяет подробнее изучить механизмы возникновения НРНС и их течение.

Синдром Айкарди-Гутьереса (САГ) — наследственная интерферопатия, проявляющаяся ранней энцефалопатией, которая зачастую приводит к инвалидности. Обычно имеет подострое начало, характеризующееся нервозностью, асептической лихорадкой, замедлением роста головы и высоким уровнем интерферона- α в цереброспинальной жидкости [110]. Механизм развития данного синдрома связан с мутациями в генах *TREX1*, *RNASEH2A*, *RNASEH2B*, *RNASEH2C*, *SAMHD1*, *ADAR* и *IFIH1*

[111]. Для моделирования САГ на зебраданио используется нокдаун гена *SAMHD1* (sterile alpha motif and HD-domain containing protein), который является фактором рестрикции ВИЧ-1 и участвует в репарации ДНК [112, 113]. При снижении его активности или концентрации в цитоплазме происходит накопление ДНК, полученных путем обратной транскрипции эндогенных элементов ретровирусов, что приводит к увеличению продукции интерферонов. При моделировании САГ на зебраданио получены кровоизлияния в мозг и активация врожденного иммунного ответа (в частности, увеличение синтеза интерферона), что характерно для клинического течения данной орфанной болезни мозга у людей [112].

Синдром Ретта — заболевание, характеризующееся главным образом задержкой умственного и моторного развития, а также потерей приобретенных вербальных навыков. Встречается с частотой 1:10 000 [114], преимущественно поражая женщин [115]. Для моделирования синдрома Ретта используют зебраданио с мутацией гена MECP2 (methyl-CpG binding protein), нарушающей его синтез [114]. Функции данного белка до конца не ясны, однако, известно, что он может выступать в качестве репрессора или активатора транскрипции путем метилирования [116] и модулировать альтернативный сплайсинг РНК [117]. У мутантных зебраданио развиваются сенсорные и тигмотаксические реакции, а также двигательное поведение, характерные для течения заболевания у человека. Кроме того, обнаружено снижение экспрессии белка ACTC1A, представленного в кардиомиоцитах (что может объяснить бивентрикулярную дисфункцию, иногда наблюдающуюся у пациентов с синдромом Ретта) [118]. Большая часть моделей направлена на отключение или снижение экспрессии одного конкретного гена, тогда как механизм развития НРНС не ограничивается этим. Несмотря на это, фенотипические проявления у представленных моделей в целом соответствуют клиническим наблюдениям, что позволяет подробнее изучить механизмы возникновения НРНС и их течение.

ДИСКУССИЯ

Почти 85 % генов, ассоциированных с заболеваниями у человека, имеют свои гомологи в геноме зебраданио, что позволяет говорить о фундаментальном сходстве биохимических, физиологических и молекулярных процессов в норме и патологии [119]. Наблюдаемые патологические фенотипы генно-модифицированных зебраданио также имеют сходство с клинической картиной заболеваний человека и моделями грызунов. Некоторые аспекты патологии

у зебраданио представляют собой сжатый по времени аналог происходящих в организме человека процессов. Однако по-прежнему неизвестно, насколько точно изменения, возникшие в первые дни развития мальков зебраданио, отражают процессы хронических заболеваний в организме человека.

Зебраданио также обладают рядом эволюционных отличий от человека, как, например, отсутствие постоянной температуры тела (холоднокровность). Кроме того, оптимальный температурный диапазон содержания зебраданио — 26–28 °C, и поэтому белки гуманизированных зебраданио могут некорректно работать в нестандартных условиях (при более низких температурах). Частично эта проблема решается увеличением температуры среды, в которой развиваются эмбрионы зебраданио, до 33 °C, что, однако, все еще остается ниже оптимальной для белков человека температуры. В то же время практика подтверждает высокую валидность трансгенных моделей зебраданио, что говорит об отсутствии выраженных нарушений функций белков человека *in vivo* при данных температурах, как, например, в модели болезни Гентингтона.

Существует также перспектива использования зебраданио в качестве так называемых аватаров — для оценки потенциальной эффективности препаратов у конкретного пациента. В онкологии подобные организмы называются ксенографами, и изначально в этом качестве использовали мышей, но в международной практике уже существуют успешные случаи использования зебраданио в подборе терапии при лечении лимфатической аномалии (лимфангиоматоза) [121] и некоторых других форм онкологии [122]. Использование в качестве аватаров зебраданио, по сравнению с мышами, дает преимущество в скорости развития патологических процессов. Выбор в пользу зебраданио также соответствует концепции 3R (replacement, reduction, refinement) гуманного экспериментирования, снижая этическую нагрузку на исследование в связи с относительной простотой устройства нервной системы зебраданио.

Для подбора терапии пациентам, страдающим от орфанных заболеваний нервной системы, вполне можно использовать подобный подход, особенно потому, что каждый пациент с редким заболеванием — уникален и предсказать течение его заболевания, подобрать подходящую терапию затруднительно, ввиду отсутствия обширных статистических данных. Персонализированный подбор препаратов на трансгенных персонализированных моделях в доклинических исследованиях поможет добиться существенного улучшения качества и продолжительности жизни таких пациентов [123, 124].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Зебраданио — перспективный организм для моделирования редких (орфанных) болезней ЦНС: нейродегенеративных заболеваний, редких форм эпилепсии, аутоиммунных и вирусных энцефалитов. Модели орфанных заболеваний на зебраданио вызывают фенотип, напоминающий течение заболевания у пациентов, а также демонстрируют выраженный терапевтический ответ на препараты, уже применяющиеся в клинической практике. Использование мутантных зебраданио позволит гораздо быстрее и с меньшими затратами находить новые препараты для лечения орфанных заболеваний и поможет приблизиться к лучшему пониманию патофизиологии редких заболеваний.

Зебраданио — перспективный организм для моделирования редких энцефалитов. Субъединицы глутаматных рецепторов зебраданио настолько гомологичны человеческим, что моделирование патологии возможно путем введения цереброспинальной жидкости больного человека. Некоторые вирусы, способные вызывать энцефалит у человека, могут заражать мальков зебраданио, что позволяет моделировать эту патологию на данном организме. В то же время большая часть орфанных заболеваний имеет генетическую основу, поэтому для моделирования патологических процессов на зебраданио основной методикой является нарушение нормальной функции конкретных генов. В некоторых ситуациях, например, при болезни Гентингтона, где белок человека имеет характерную полиглутаматную последовательность, отсутствующую у зебраданио, появляются трансгенные модели. Наконец, почти все существующие модели зебраданио концентрируются на изменении одного гена, хотя среди редких заболеваний есть и такие, которые вызываются сочетаниями генов, что также важно учитывать при трансляции текущих и будущих экспериментов на рыбах в клинические условия.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2020-901). / The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2020-901).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Food and Drug Administration (FDA). Public Law 97-414. Orphan Drug Act. 1983; 2049–2066.
2. Orphanet. <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>.
3. Brewer GJ. Drug development for orphan diseases in the context of personalized medicine. *Transl. Res.* 2009;154:314–32.
4. Joppi R, Bertele V, Garattini S. Orphan drugs, orphan diseases. The first decade of orphan drug legislation in the EU. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2013;69: 1009–1024.
5. Федеральный закон № 323-ФЗ от 21 ноября 2011 года «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». Ст. 44.
6. Перечень редких (орфанных) заболеваний. <https://minzdrav.gov.ru/documents/9641-perechen-redkih-orfannyh-zabolevaniy>.
7. Распространенность психических расстройств (%) — Европейский портал информации здравоохранения. https://gateway.euro.who.int/ru/indicators/hfa_391-2410-prevalence-of-mental-disorders/visualizations/#id=19322&tab=table.
8. Genetic and Rare Diseases Information Center (GARD) — an NCATS Program | Providing information about rare or genetic diseases. <https://rarediseases.info.nih.gov/>.
9. Behavioral and mental disorders | Genetic and Rare Diseases Information Center (GARD) — an NCATS Program. <https://rarediseases.info.nih.gov/diseases/diseases-by-category/3/behavioral-and-mental-disorders>.
10. Bergink V. The prevalence of rare diseases in psychiatry. *The Lancet Psychiatry* 2018;5:693–694.
11. Barbazuk WB, et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 2000;10:1351–1358.
12. Dahlbom SJ, Backström T, Lundstedt-Enkel K, Winberg S. Aggression and monoamines: Effects of sex and social rank in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 2012;228:333–338.
13. Fontana BD, Mezzomo NJ, Kalueff AV, Rosemberg DB. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. *Exp. Neurol.* 2018; 299:157–171.
14. Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2004;4:504–512.
15. Галстян Д.С., Косицын Ю.М., Ильин Н.П., Неруш М.О., Хайбаев А.Ш. Острые поведенческие эффекты целебрекса у взрослых зебраданио. *Фундаментальная наука и клиническая медицина.* 2021;24:818–819.
16. Burton DF, et al. Pharmacological activation of the Sonic hedgehog pathway with a Smoothed small molecule agonist ameliorates the severity of alcohol-induced morphological and behavioral birth defects in a zebrafish model of fetal alcohol spectrum disorder. *J. Neurosci. Res.* 2022. DOI:10.1002/JNR.25008.
17. Klee EW, Ebbert JO, Schneider H, Hurt RD, Ekker SC. Zebrafish for the Study of the Biological Effects of Nicotine. *Nicotine Tob. Res.* 2011;13, 301–312.
18. Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005;4:35–44.
19. Dinday MT, Baraban SC. Large-Scale Phenotype-Based Antiepileptic Drug Screening in a Zebrafish Model of Dravet Syndrome. *eNeuro.* 2, 2015.
20. de Abreu MS, et al. Emotional behavior in aquatic organisms? Lessons from crayfish and zebrafish. *J. Neurosci. Res.* 2020;98:764–779.
21. Prabhudesai S, et al. LRRK2 knockdown in zebrafish causes developmental defects, neuronal loss, and synuclein aggregation. *J. Neurosci. Res.* 2016; 94: 717–735.
22. Мешалкина Д.А., Казалов М.А., Кисель Э.В., Федорова Я.В. Получение линий зебраданио, нокаутных по генам транспортеров серотонина (slc6a4a и slc6a4b) с помощью направленного редактирования системами CRISPR/SpCas9 и CRISPR/LbCas12a. VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы. Сборник тезисов Международного конгресса. 2019:753.
23. Fonseka TM, Wen XY, Foster JA, Kennedy SH. Zebrafish models of major depressive disorders. *J. Neurosci. Res.* 2016;94:3–14.
24. de Abreu MS, et al. Zebrafish models: do we have valid paradigms for depression? *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2018;94:16–22.
25. Campbell PD, Granato M. Zebrafish as a tool to study schizophrenia-associated copy number variants. *DMM Dis. Model. Mech.* 13, 2020.
26. Demin KA, et al. Developing zebrafish experimental animal models relevant to schizophrenia. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2019;105:126–133.
27. Gawel K, Banono NS, Michalak A, Esguerra CV. A critical review of zebrafish schizophrenia models: Time for validation? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2019;107:6–22.
28. Sager JJ, Bai Q, Burton EA. Transgenic zebrafish models of neurodegenerative diseases. DOI:10.1007/s00429-009-0237-1.
29. McColgan P, Tabrizi SJ. Huntington's disease: a clinical review. *Eur. J. Neurol.* 2018;25:24–34.
30. Walker FO. Huntington's disease. *Lancet.* 2007;369:218–228.
31. Karlovich CA, John RM, Ramirez L, Stainier DYR, Myers RM. Characterization of the Huntington's disease (HD) gene homolog in the zebrafish *Danio rerio*. *Gene.* 1998; 217:117–125.

32. Lumsden AL, Henshall TL, Dayan S, Lardelli MT, Richards RI. Huntingtin-deficient zebrafish exhibit defects in iron utilization and development. *Hum. Mol. Genet.* 2007;16:1905–1920.
33. Diekmann H, et al. Decreased BDNF levels are a major contributor to the embryonic phenotype of huntingtin knockdown zebrafish. *J. Neurosci.* 2009;29:1343–1349.
34. Henshall TL, et al. Selective neuronal requirement for huntingtin in the developing zebrafish. *Hum. Mol. Genet.* 2009;18:4830.
35. Schiffer NW, et al. Identification of anti-prion compounds as efficient inhibitors of polyglutamine protein aggregation in a zebrafish model. *J. Biol. Chem.* 2007;282:9195–9203.
36. Miller VM, et al. CHIP Suppresses Polyglutamine Aggregation and Toxicity In Vitro and In Vivo. *J. Neurosci.* 2005;25:9152.
37. Williams A, et al. Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat. Chem. Biol.* 2008;4:295–305.
38. Veldman MB, et al. The N17 domain mitigates nuclear toxicity in a novel zebrafish Huntington's disease model. *Mol. Neurodegener.* 10, 2015.
39. Rudnik-Schöneborn S, Barth PG, Zerres K. Pontocerebellar hypoplasia. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* 2014;166:173–183.
40. Kasher PR, et al. Impairment of the tRNA-splicing endonuclease subunit 54 (tsen54) gene causes neurological abnormalities and larval death in zebrafish models of pontocerebellar hypoplasia. *Hum. Mol. Genet.* 2011;20:1574–1584.
41. Schaffer AE, et al. CLP1 founder mutation links tRNA splicing and maturation to cerebellar development and neurodegeneration. *Cell.* 2014;157:651–663.
42. Boczonadi V, et al. EXOSC8 mutations alter mRNA metabolism and cause hypomyelination with spinal muscular atrophy and cerebellar hypoplasia. *Nat. Commun.* 2014; 51 5:1–13.
43. Burns DT, et al. Variants in EXOSC9 Disrupt the RNA Exosome and Result in Cerebellar Atrophy with Spinal Motor Neuronopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 2018;102:858–873.
44. Müller JS, et al. RNA exosome mutations in pontocerebellar hypoplasia alter ribosome biogenesis and p53 levels. *Life Sci. alliance.* 3, 2020.
45. Moreno-García A, Kun A, Calero O, Medina M, Calero M. An Overview of the Role of Lipofuscin in Age-Related Neurodegeneration. *Front. Neurosci.* 12, 2018.
46. Dragos A. Nita, Sara E. Mole, Minassian BA. Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Epileptic Disord.* 2016;18:S73–S88.
47. Mahmood F, et al. A zebrafish model of CLN2 disease is deficient in tripeptidyl peptidase 1 and displays progressive neurodegeneration accompanied by a reduction in proliferation. *Brain* 2013;136:1488–1507.
48. Mahmood F, Zdebik A, Au A, Cooke J, Russell C. Valproic acid extends lifespan of the zebrafish model of CLN2 disease (late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis). *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 86, e4.153-e4; 2015.
49. Wager K, et al. Neurodegeneration and Epilepsy in a Zebrafish Model of CLN3 Disease (Batten Disease). *PLoS One.* 11, 2016.
50. Rosenbaum AI, Maxfield FR. Niemann-Pick type C disease: molecular mechanisms and potential therapeutic approaches. *J. Neurochem.* 2011;116: 789–795.
51. Toledano-Zaragoza A, Ledesma MD. Addressing neurodegeneration in lysosomal storage disorders: Advances in Niemann Pick diseases. *Neuropharmacology.* 171, 2020.
52. Cook SR, et al. Visualisation of cholesterol and ganglioside GM1 in zebrafish models of Niemann-Pick type C disease and Smith-Lemli-Opitz syndrome using light sheet microscopy. *Histochem. Cell Biol.* 2020;154:565–578.
53. Lin Y, Cai X, Wang G, Ouyang G, Cao H. Model construction of Niemann-Pick type C disease in zebrafish. *Biol. Chem.* 2018;399:903–910.
54. Louwette S, et al. NPC1 defect results in abnormal platelet formation and function: studies in Niemann-Pick disease type C1 patients and zebrafish. *Hum. Mol. Genet.* 2013;22:61–73.
55. Wiweger M, Majewski L, Adamek-Urbanska D, Wasilewska I, Kuznicki J. npc2-Deficient Zebrafish Reproduce Neurological and Inflammatory Symptoms of Niemann-Pick Type C Disease. *Front. Cell. Neurosci.* 15, 2021.
56. Schwend T, Loucks EJ, Snyder D, Ahlgren SC. Requirement of Npc1 and availability of cholesterol for early embryonic cell movements in zebrafish. *J. Lipid Res.* 2011;52:1328.
57. Tseng WC, et al. Modeling Niemann-Pick disease type C1 in zebrafish: a robust platform for in vivo screening of candidate therapeutic compounds. *Dis. Model. Mech.* 11, 2018.
58. Tseng WC, et al. The role of Niemann-Pick type C2 in zebrafish embryonic development. *Dev.* 148, 2021.
59. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. *Lancet.* 2019; 393:689–701.
60. Löscher W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochem. Res.* 2017;42:1873–1888.
61. Macdonald RL, Barker JL. Specific antagonism of GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian spinal cord neurons: A common mode of convulsant action. *Neurology.* 1978; 28:325–330.

62. Gallitto G, et al. Pentylentetrazol-induced spike wave discharges in rats: A polygraphic study. *Ital. J. Neurol. Sci.* 1987;8:143–150.
63. Afrikanova T, et al. Validation of the Zebrafish Pentylentetrazol Seizure Model: Locomotor versus Electrographic Responses to Antiepileptic Drugs. *PLoS One.* 8, 2013.
64. Watanabe Y, Takechi K, Fujiwara A, Kamei C. Effects of antiepileptics on behavioral and electroencephalographic seizure induced by pentetrazol in mice. *J. Pharmacol. Sci.* 2010;112:282–289.
65. Berghmans S, Hunt J, Roach A, Goldsmith P. Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 2007;75:18–28.
66. Leclercq K, et al. Cross-species pharmacological characterization of the allylglycine seizure model in mice and larval zebrafish. *Epilepsy Behav.* 2015;45:53–63.
67. Zhang Y, et al. Inhibition of glutamate decarboxylase (GAD) by ethyl ketopentenoate (EKP) induces treatment-resistant epileptic seizures in zebrafish. *Sci. Reports.* 2017; 71 7:1–13.
68. Langlois M, et al. Involvement of the thalamic parafascicular nucleus in mesial temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 2010;30:16523–16535.
69. Mussulini BHM, et al. Forebrain glutamate uptake and behavioral parameters are altered in adult zebrafish after the induction of Status Epilepticus by kainic acid. *Neurotoxicology.* 2018;67:305–312.
70. Wong K, et al. Modeling seizure-related behavioral and endocrine phenotypes in adult zebrafish. *Brain Res.* 2010;1348:209–215.
71. Stewart AM, et al. Perspectives of zebrafish models of epilepsy: What, how and where next? *Brain Res. Bull.* 2012;87:135–143.
72. Lee GH, et al. Zebrafish larvae exposed to ginkgotoxin exhibit seizure like behavior that is relieved by pyridoxal-5 β -phosphate, GABA and anti-epileptic drugs. *DMM Dis. Model. Mech.* 2012;5:785–795.
73. Lopes MW, Sapio MR, Leal RB, Fricker LD. Knockdown of carboxypeptidase A6 in zebrafish larvae reduces response to seizure-inducing drugs and causes changes in the level of mRNAs encoding signaling molecules. *PLoS One.* 11, 2016.
74. Novak AE, et al. Embryonic and larval expression of zebrafish voltage-gated sodium channel β -subunit genes. *Dev. Dyn.* 2006;235:1962–1973.
75. Baraban SC, Dinday MT, Hortopan GA. Drug screening in *Scn1a* zebrafish mutant identifies clemizole as a potential Dravet syndrome treatment. *Nat. Commun.* 4, 2013.
76. Cross JH, et al. Neurological features of epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy syndrome. *Dev. Med. Child Neurol.* 2013;55:846–856.
77. Mahmood F, et al. Generation and validation of a zebrafish model of EAST (epilepsy, ataxia, sensorineural deafness and tubulopathy) syndrome. *DMM Dis. Model. Mech.* 2013; 6:652–660.
78. Zdebik AA, et al. Epilepsy in *kcjn10* morphant zebrafish assessed with a novel method for long-term EEG recordings. *PLoS One.* 8, 2013.
79. Chege SW, Hortopan GA, Dinday MT, Baraban SC. Expression and function of KCNQ channels in larval zebrafish. *Dev. Neurobiol.* 2012;72:186–198.
80. Saitsu H, et al. De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat. Genet.* 2008;40:782–788.
81. Grone BP, et al. Epilepsy, behavioral abnormalities, and physiological comorbidities in syntaxin-binding protein 1 (STXBP1) mutant zebrafish. *PLoS One.* 11, 2016.
82. Verhage M, et al. Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* (80-.). 2000; 287:864–869.
83. Gawel K, et al. Seizing the moment: Zebrafish epilepsy models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2020;116:1–20.
84. Suls A, et al. De novo loss-of-function mutations in CHD2 cause a fever-sensitive myoclonic epileptic encephalopathy sharing features with dravet syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 2013; 93:967–975.
85. Ottman R, et al. Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat. Genet.* 1995;10:56–60.
86. Gu W, et al. Using gene-history and expression analyses to assess the involvement of LGI genes in human disorders. *Mol. Biol. Evol.* 2005;22: 2209–2216.
87. Teng Y, et al. Loss of zebrafish *Igi1b* leads to hydrocephalus and sensitization to pentylentetrazol induced seizure-like behavior. *PLoS One.* 6, 2011.
88. Teng Y, et al. Knockdown of zebrafish *Igi1a* results in abnormal development, brain defects and a seizure-like behavioral phenotype. *Hum. Mol. Genet.* 2010;19:4409–4420.
89. Dibbens LM, et al. Mutations in *DEPDC5* cause familial focal epilepsy with variable foci. *Nat. Genet.* 2013;45:546–551.
90. de Calbiac H, et al. *Depdc5* knockdown causes mTOR-dependent motor hyperactivity in zebrafish. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2018;5:510–523.
91. Pena IA, et al. Pyridoxine-dependent epilepsy in zebrafish caused by *aldh7a1* deficiency. *Genetics* 2017;207:1501–1518.
92. Johnstone DL, et al. PLPHP deficiency: Clinical, genetic, biochemical, and mechanistic insights. *Brain.* 2019; 142:542–559.
93. Goi LDS, Altenhofen S, Nabinger DD, Bonan CD, Sato DK. Decreased convulsive threshold and memory loss after anti-NMDAR positive CSF injection in zebrafish. *J. Neuroimmunol.* 359, 2021.

94. Fang Z, et al. Advances in autoimmune epilepsy associated with antibodies, their potential pathogenic molecular mechanisms, and current recommended immunotherapies. *Front. Immunol.* 2017;8:395.
95. Binks SNM, Klein CJ, Waters P, Pittock SJ, Irani SR. LGI1, CASPR2 and related antibodies: a molecular evolution of the phenotypes. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2018; 89:526–534.
96. Goody MF, Sullivan C, Kim CH. Studying the immune response to human viral infections using zebrafish. *Dev. Comp. Immunol.* 2014;46:84–95.
97. Silva MTT. Viral encephalitis. *Arq. Neuropsiquiatr.* 2013;71:703–709.
98. Thapar A, Rutter M. Neurodevelopmental disorders. *Rutter's Child Adolesc. Psychiatry Sixth Ed.* 2015; 31–40. DOI:10.1002/9781118381953.CH3.
99. Sakai C, Ijaz S, Hoffman EJ. Zebrafish Models of Neurodevelopmental Disorders: Past, Present, and Future. *Front. Mol. Neurosci.* 2018;11:294.
100. Connors SL, et al. Fetal Mechanisms in Neurodevelopmental Disorders. *Pediatr. Neurol.* 2008;38:163–176.
101. Tran NQV, Miyake K. Neurodevelopmental Disorders and Environmental Toxicants: Epigenetics as an Underlying Mechanism. *Int. J. Genomics.* 2017.
102. Marin O. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 2012;13:107–120.
103. Stainier DYR, et al. Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLOS Genet.* 13, e1007000, 2017.
104. Garber KB, Visootsak J, Warren ST. Fragile X syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 2008; 166 16: 666–672.
105. Hunter J, et al. Epidemiology of fragile X syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Am. J. Med. Genet. Part A.* 2014;164:1648–1658.
106. Hagerman RJ, et al. Fragile X syndrome. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2017; 31 3: 1–19.
107. van't Padje S, et al. Characterisation of Fmrp in zebrafish: Evolutionary dynamics of the fmr1 gene. *Dev. Genes Evol.* 2005;215:198–206.
108. Kim L, et al. Anxiety, hyperactivity and stereotypy in a zebrafish model of fragile X syndrome and autism spectrum disorder. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* 2014; 55:40–49.
109. Ng MC, Yang YL, Lu KT. Behavioral and Synaptic Circuit Features in a Zebrafish Model of Fragile X Syndrome. *PLoS One* 8, e51456, 2013.
110. Goutières F. Aicardi-Goutières syndrome. *Brain Dev.* 2005;27:201–206.
111. Crow YJ, et al. Characterization of human disease phenotypes associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR, and IFIH1. *Am. J. Med. Genet. Part A.* 2015;167:296–312.
112. Kasher PR, et al. Characterization of samhd1 Morphant Zebrafish Recapitulates Features of the Human Type I Interferonopathy Aicardi-Goutières Syndrome. *J. Immunol.* 2015;194:2819–2825.
113. Rice GI, et al. Mutations involved in Aicardi-Goutières syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response. *Nat. Genet.* 2009;41:41:829–832.
114. Cortelazzo A, et al. Proteomic analysis of the Rett syndrome experimental model mec2Q63X mutant zebrafish. *J. Proteomics.* 2017;154:128–133.
115. Chahrouh M, Zoghbi HY. The Story of Rett Syndrome: From Clinic to Neurobiology. *Neuron.* 2007;56:422–437.
116. Ragione F, Della, Vacca M, Fioriniello S, Pepe G, D'Esposito M. MECP2, a multi-talented modulator of chromatin architecture. *Brief. Funct. Genomics.* 2016;15, 420–431.
117. Maunakea AK, Chepelev I, Cui K, Zhao K. Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition. *Cell Res.* 2013; 2311 23:1256–1269.
118. De Felice C, et al. Subclinical myocardial dysfunction in Rett syndrome. *Eur. J. Echocardiogr.* 2012;13, 339–345).
119. Howe K, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nat.* 2013;4967446 496:498–503.
120. Vaz R, Hofmeister W, Lindstrand A. Zebrafish models of neurodevelopmental disorders: Limitations and benefits of current tools and techniques. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2019.
121. Li D, et al. ARAF recurrent mutation causes central conducting lymphatic anomaly treatable with a MEK inhibitor. *Nat. Med.* 2019;257 25:1116–1122.
122. Usai A, et al. A Model of a Zebrafish Avatar for Co-Clinical Trials. *Cancers* 2020, Vol. 12, P. 677.
123. Costa B, Estrada MF, Mendes RV, Fior R. Zebrafish Avatars towards Personalized Medicine-A Comparative Review between Avatar Models. *Cells* 9, 2020.
124. Williams CH, Hong CC. Zebrafish small molecule screens: Taking the phenotypic plunge. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2016;14:350–356.

Информация об авторах:

Державина Ксения Андреевна, лаборант-исследователь лаборатории биологической психиатрии СПбГУ, студент 4 курса, обучающийся по программе «Лечебное дело» ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Ильин Никита Петрович, младший научный сотрудник лаборатории биологической психиатрии СПбГУ и Российского научного центра радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова;

Серединская Мария Вячеславовна, студент 1 курса, обучающийся по программе «Биология» в СПбГУ;

Неруш Мария Олеговна, студент 2 курса, обучающийся по программе «Лечебное дело» ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Захарченко Ксения Витальевна, студент 2 курса, обучающийся по программе «Лечебное дело» ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Сорокин Дмитрий Вадимович, студент 2 курса, обучающийся по программе «Лечебное дело» ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Демин Константин Андреевич, руководитель научно-исследовательской группы экспериментальной патофизиологии ЦНС, НЦМУ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, старший научный сотрудник лаборатории биологической психиатрии СПбГУ;

Калуев Алан Валерьевич, д.б.н., профессор РАН, ведущий научный сотрудник, руководитель научно-исследовательской группы нейробиологии, ИЭМ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, заведующий лабораторией биологической психиатрии СПбГУ.

Author information:

Derzhavina Ksenia A., assistant, Laboratory of Biological Psychiatry, Saint-Petersburg State University, undergraduate student (4 year) studying at Almazov Federal National Medical Research Centre;

Ilyin Nikita P., Junior Research Fellow, Laboratory of Biological Psychiatry, Saint-Petersburg State University and Russian Scientific Center for Radiology and Surgical Technologies named after Academician A.M. Granova;

Seredinskaya Maria V., Graduate Student (1 year) at Saint-Petersburg State University;

Nerush Maria O., undergraduate student (2 year) studying at Almazov Federal National Medical Research Centre;

Zakharchenko Ksenia V., undergraduate student (2 year) studying at Almazov Federal National Medical Research Centre;

Sorokin Dmitriy V., undergraduate student (2 year) studying at Almazov Federal National Medical Research Centre;

Demin Konstantin A., Head of Research Group of Experimental Pathophysiology of the CNS, Almazov Federal National Medical Research Centre, Senior Research Fellow, Laboratory of Biological Psychiatry, Saint-Petersburg State University;

Kalueff Allan V. Ph.D., Professor RAS, Head of Neurobiology Research Group, Almazov Federal National Medical Research Centre, Head of Laboratory of Biological Psychiatry, Saint-Petersburg State University.