

Применение зебраданио (zebrafish) в доклинических исследованиях лекарственных средств: проблемы и перспективы

А.В. Калуев^{1,2,3,4,✉}, М.М. Котова¹, А.Н. Икрин¹, Т.О. Колесникова¹

¹ Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», Олимпийский пр-т, д. 1, пгт. Сириус, Краснодарский край, 354340, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, 197341, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Университетская наб., д. 7–9, Санкт-Петербург, 199034, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова», ул. Ленинградская, д. 70, п. Песочный, Санкт-Петербург, 197758, Российская Федерация

✉ Контактное лицо: Калуев Алан Валерьевич avkalueff@gmail.com

РЕЗЮМЕ

В доклинических испытаниях лекарственных средств становится актуальным применение вспомогательных водных позвоночных моделей, в частности рыб зебраданио (zebrafish, *Danio rerio*), поскольку использование грызунов для биоскрининга лекарственных препаратов существенно ограничивают фискальная и регуляторная нагрузки.

Цель работы: анализ эффективности модели зебраданио в доклинических исследованиях лекарственных средств, а также обзор текущего состояния ее использования, проблем и перспектив в этой области и определение стратегических направлений дальнейшего развития доклинического тестирования на зебраданио. В работе описаны основные тесты на зебраданио, используемые для оценки общей токсичности, выживаемости эмбрионов и личинок, а также эндокринных нарушений, для широкого спектра малых молекул. Выявлены преимущества и недостатки применения зебраданио в доклинических испытаниях нейротропных соединений. Обозначены методологические подходы повышения эффективности токсикологических исследований препаратов на зебраданио. Показано, что в целом использование зебраданио постепенно закрепляется в качестве одного из этапов тестирования малых молекул в лабораториях мира. Широкое внедрение данного модельного организма в исследовательскую и доклиническую практику в качестве дополнительного (вспомогательного) теста помимо исследований на грызунах позволит существенно ускорить разработку новых лекарственных препаратов, а также более полно и адекватно оценивать биологические риски воздействия химических веществ.

Ключевые слова: доклинические исследования; токсикологические исследования; зебраданио; *Danio rerio*; лекарственные препараты; биоскрининг

Для цитирования: Калуев А.В., Котова М.М., Икрин А.Н., Колесникова Т.О. Применение зебраданио (zebrafish) в доклинических исследованиях лекарственных средств: проблемы и перспективы. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(3):155–164. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-3-155-164>

Using Zebrafish in Preclinical Drug Studies: Challenges and Opportunities

A.V. Kalueff^{1,2,3,4,✉}, M.M. Kotova¹, A.N. Ikrin¹, T.O. Kolesnikova¹

¹ Sirius University of Science and Technology,
1 Olimpiyskiy Ave, Sirius urban-type settlement, Krasnodar region 354340, Russian Federation

² Almazov National Medical Research Center,
2 Akkuratova St., St Petersburg 197341, Russian Federation

³ St Petersburg State University,
7–9 Universitetskaya Emb., St Petersburg 199034, Russian Federation

⁴ A.M. Granov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies,
70 Leningradskaya St., Pesochny settlement, St Petersburg 197758, Russian Federation

✉ Corresponding author: **Allan V. Kalueff** avkalueff@gmail.com

ABSTRACT

Since fiscal and regulatory constraints substantially limit bioscreening in rodent models, a wider implementation of additional alternative models in preclinical studies of medicines is gaining momentum. These alternative models include aquatic vertebrates, such as zebrafish (*Danio rerio*).

The aim of the study was to examine zebrafish models in terms of their performance in preclinical studies, their current uses, the challenges and opportunities in the field, and strategic directions for the development of preclinical testing in zebrafish.

Here, the authors summarise the key zebrafish tests that are currently used to assess a wide range of small molecules for their general and endocrine toxicity and effects on the survival of embryos and larvae. The review discusses the strengths and weaknesses of zebrafish models for preclinical testing of neurotropic agents. Additionally, the authors overview various methodological approaches to improving zebrafish toxicity testing. Overall, the use of zebrafish models is gradually becoming internationally established for laboratory testing of small molecules. A wider implementation of zebrafish models in pharmaceutical research and preclinical testing as an additional alternative to rodents, particularly in Russia, may significantly accelerate the development of novel medicinal products and foster a more comprehensive and adequate assessment of the biological risks associated with chemical substances.

Key words: preclinical studies; toxicology studies; zebrafish; *Danio rerio*; medicinal products; bioscreening

For citation: Kalueff A.V., Kotova M.M., Ikrin A.N., Kolesnikova T.O. Using zebrafish in preclinical drug studies: challenges and opportunities. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(3):155–164. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-3-155-164>

Введение

Разработка новых лекарственных средств (ЛС) является длительным и трудоемким процессом, а количество потенциальных терапевтических агентов намного превышает количество кандидатов, которые достигают стадии клинических испытаний [1, 2]. Например, до 80% изучаемых соединений не проходят

доклиническую оценку биодоступности, эффективности и безопасности. При этом чувствительность существующих тестов на грызунах является достаточно низкой (<50%), в результате чего нередко возможны ложноотрицательные результаты [1, 2]. Изучение рисков, связанных с острым и хроническим действием лекарственных препаратов-кандидатов, становится важной

биомедицинской задачей. Решению данных задач в России также способствует создание отечественных национальных и международных стандартов доклинического тестирования¹.

Еще одна область применения биоскрининга — оценка токсичности производимых или экспортируемых химических веществ, в том числе удобрений, детергентов и промышленных химикатов. В США и странах Европы производство и экспорт химикатов строго регулируются законодательством, требуется обязательное тестирование токсичности этих веществ². Особый акцент в исследованиях токсичности делается на тестировании эндокринных процессов *in vivo* и оценке токсичных эффектов препаратов как возможных эндокринных дизрапторов (ЭД)³.

В то же время законодательство ведущих стран мира требует снизить интенсивность тестирования химических веществ на животных⁴. Такой подход ограничивает использование высших позвоночных, в первую очередь приматов, а также грызунов для токсикологических исследований, в том числе для доклинических испытаний ЛС. Еще один немаловажный аспект доклинических исследований — их стоимость, которая не только ограничивает масштабы доклинического тестирования, но и значительно увеличивается, если неэффективность или небезопасность ЛС выявляется на поздних этапах тестирования. И хотя с сугубо научной точки зрения фискальные и регуляторные факторы не должны иметь решающего значения, на практике они, тем не менее, играют важную роль при выработке стратегии доклинического тестирования малых молекул. За последние годы накоплено достаточно данных о возможной оптимизации доклинических исследований путем использования вспомогательных альтернативных животных моделей (*табл. 1*), в том числе зебраданио (zebrafish, *Danio rerio*) [3–6].

Зебраданио — небольшая пресноводная костная рыба, обладающая консервативными физиологическими механизмами и системами, а также сходством с человеческими основными

молекулярных мишеней (примерно на 85%), клеток, тканей и органов [3]. Многие анатомические характеристики и работа большинства сигнальных систем зебраданио сходны с таковыми у человека и млекопитающих [7]. Геном зебраданио имеет высокую (примерно 70%) гомологию с геномом человека [8], а более 80% генов, ассоциированных с болезнями человека, имеют как минимум один ортолог у зебраданио [9–11]. Зебраданио могут использоваться в качестве модельного объекта в фармакологии и токсикологии начиная с самого раннего периода эмбрионального развития [12]. Так, например, эмбрионы зебраданио в настоящее время являются признанной моделью для оценки токсичности малых молекул, особенно потенциальных ЭД, а взрослые особи зебраданио широко применяются в различных токсикологических тестах.

Расширение области применения альтернативных подходов в стандартных исследованиях требует весомого обоснования его целесообразности, поскольку они имеют принципиальные различия и изначально преследуют разные цели. Например, цель экологической токсикологии заключается в установлении гигиенических нормативов и допустимых пороговых значений токсического воздействия на живые организмы в окружающей среде. Цель лекарственной токсикологии — прогноз потенциального токсического действия на организм человека путем экстраполяции данных, полученных в экспериментах *in vivo* на животных. В настоящем обзоре обсуждаются основные тесты для оценки воздействия химических веществ, в том числе для анализа общей токсичности (острой и хронической), выживаемости эмбрионов и личинок, а также репродукции, на зебраданио, которые могут быть использованы как быстрый способ оценки потенциальных свойств широкого спектра малых молекул *in vivo*.

Цель работы — анализ эффективности модели зебраданио в доклинических исследованиях лекарственных средств, а также обзор текущего состояния ее использования, проблем и перспектив

¹ ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики.

Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 г. № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

² <https://www.gao.gov/assets/gao-07-825.pdf>

³ OECD. Test No. 229. Fish short term reproduction assay. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 2. OECD Publishing; 2012. OECD. Test No. 230. 21-day fish assay. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 2. OECD Publishing; 2009. OECD. Test No. 234. Fish sexual development test. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 2. OECD Publishing; 2011. OPPTS 850.1500. Fish life cycle toxicity. Ecological effects test guidelines. EPA712-C-96-122. U.S. Environmental Protection Agency; 1996.

⁴ <https://echa.europa.eu/guidance-documents/guidance-on-reach>
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=EN>

Таблица 1. Фискальная и этическая/регуляторная нагрузка на экспериментальные модели, используемые в доклиническом скрининге препаратов *in vivo*

Table 1. Fiscal and ethical/regulatory constraints on experimental models used in preclinical screening *in vivo*

Объекты исследований <i>Study subjects</i>	Интенсивность нагрузки <i>Burden intensity</i>		
	США <i>USA</i>	Европейский союз <i>European Union</i>	Российская Федерация <i>Russian Federation</i>
Фискальная нагрузка <i>Fiscal burden</i>			
Приматы / <i>Primates</i>	+++++	+++++	++++
Грызуны* / <i>Rodents*</i>	++++	++++	+++
Зебраданио / <i>Zebrafish</i> Взрослые / <i>Adults</i> Личинки / <i>Larvae</i> Икра / <i>Eggs</i>	++** + +	++** + +	+*** + +
Дрозофила / <i>Drosophilae</i>	+	+	+
Нематоды / <i>Nematodes</i>	+	+	+
Этическая / регуляторная нагрузка <i>Ethical/regulatory burden</i>			
Приматы / <i>Primates</i>	+++++	+++++	++++
Грызуны* / <i>Rodents*</i>	+++	+++	++
Зебраданио / <i>Zebrafish</i> Взрослые / <i>Adults</i> Личинки / <i>Larvae</i> Икра / <i>Eggs</i>	++** + -	++ + -	_*** - -
Дрозофила / <i>Drosophilae</i>	-	-	-
Нематоды / <i>Nematodes</i>	-	-	-

Примечание. Число знаков «+» отражает относительную значимость указанного фактора; «-» означает отсутствие существенного влияния фактора.

* Крысы и мыши, в том числе линейные и генетически модифицированные модели.

** В настоящее время применимо для организаций, получающих средства из государственных фондов.

*** Для рассмотрения протоколов исследования в различных организациях могут быть созданы этические комитеты.

Note. The number of “+” signs denotes the relative importance of specific factors; “-” denotes the lack of substantial impact.

* Rats and mice, including inbred, outbred, and genetically modified strains.

** Presently applicable to research organisations sponsored from public (governmental) funds.

*** Ethical committees may be established to review research protocols in various organisations.

в этой области и определение стратегических направлений дальнейшего развития доклинического тестирования на зебраданио.

Токсикологические тесты на зебраданио

Тест на острую токсичность для эмбрионов зебраданио (ZFET)

Тест на острую токсичность для эмбрионов зебраданио (Zebrafish Embryo Acute Toxicity Test, ZFET) широко используется при исследовании токсичности водных ксенобиотиков на ранних стадиях развития рыб. В тесте производится инкубация эмбрионов с исследуемым

препаратом в течение 72 или 96 ч, после чего оценивают смертность и нарушение развития эмбрионов [13]. Каждые 24 ч регистрируют показатели летальности, в том числе коагуляцию оплодотворенных яиц, отсутствие образования сомитов, отсутствие отделения хвостовой почки от желточного мешка и отсутствие сердцебиения. В конце периода воздействия острая токсичность определяется на основании положительного результата в любом из четырех зарегистрированных показателей, а также рассчитывается средняя летальная доза LD₅₀ (средняя доза вещества, вызывающая гибель 50% организмов за определенный

срок) [13]. Межгосударственный стандарт, основанный на использовании метода ZFET, введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 01.03.2017⁵.

Определение острой токсичности для рыб (FAT)

Тест на острую токсичность для рыб (Fish Acute Toxicity Test, FAT) широко используется для оценки токсичности химических веществ⁶. Рыбы подвергаются воздействию исследуемого вещества в течение 96 ч. Смертность регистрируется через 24, 48, 72 и 96 ч, определяется концентрация исследуемого вещества, вызывающая гибель 50% особей в тестовой группе рыб. Межгосударственный стандарт, в котором закреплено использование метода FAT, введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 01.08.2014⁷.

Исследование роста молоди рыб (FJGT)

Исследование роста молоди рыб, или тест ювенального роста рыб (Fish Juvenile Growth Test, FJGT), используется для оценки влияния длительного воздействия химических веществ на рост молодых рыб, в том числе зебрданио [14]. В период активной фазы роста молодые особи помещаются в аквариумы и подвергаются воздействию сублетальных концентраций тестируемого вещества в воде (обычно в проточных или полустатических условиях) в течение 28 сут⁸. В течение теста зебрданио ежедневно оцениваются на выживаемость, необычный внешний вид, нетипичное поведение и изменение веса. В тесте также определяется самая низкая наблюдаемая эффективная концентрация вещества, а также диапазон неэффективных концентраций [14]. Межгосударственный стандарт, в котором закреплено использование метода FJGT, введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 01.08.2014⁹.

Тест краткосрочной репродукции рыб (FSTRA)

Оценка токсичности ЭД является важной задачей токсикологии и фармакологии.

⁵ ГОСТ 33774-2016. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Острая токсичность для эмбрионов рыбы.

⁶ OECD. Test No. 203. Fish, acute toxicity test. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 2. OECD Publishing; 2000.

⁷ ГОСТ 32473-2013. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Определение острой токсичности для рыб.

⁸ OECD. Test No. 215. Fish, juvenile growth test. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 2. OECD Publishing; 2000.

⁹ ГОСТ 32292-2013. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Определение токсичности для мальков рыб.

¹⁰ ГОСТ 32368-2013. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Оценка репродуктивной способности рыб.

Наибольший интерес представляют соединения, способные влиять на стероидогенез, в том числе на ароматазу цитохрома P450, регулирующую необратимое превращение андрогенов в эстрогены [15, 16]. У костных рыб присутствуют два гена, *cyp19a1a* и *cyp19a1b*, кодирующие данный фермент и участвующие в определении пола и репродукции, а также в нейрогенезе [17]. Тест краткосрочной репродукции рыб (Fish Short Term Reproduction Assay, FSTRA) проводится в несколько этапов. На первом этапе (первые 14 сут) оценивается исходный уровень репродукции смешанных групп самцов и самок в обычных аквариумах, уровень вителлогенина и вторичные половые признаки, также может оцениваться гистология гонад. Яйца собирают ежедневно в одно и то же время и сортируют на неоплодотворенные, нежизнеспособные (оплодотворенные яйцеклетки, не достигшие стадии 16 клеток) и жизнеспособные. В тесте определяется процент оплодотворенных и жизнеспособных яиц, после чего 50 из них инкубируются 24 и 96 ч для оценки процента выживаемости потомства. На втором этапе (на 21 сут теста) оценивается уровень репродукции при действии исследуемых соединений. Межгосударственный стандарт, регламентирующий использование метода FSTRA, введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 01.08.2014¹⁰.

21-дневный тест на рыбах (21-day Fish Assay)

Для оценки эффектов эстрогенов и андрогенов проводится 21-дневный тест (21-day Fish Assay: A Short Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition) на взрослых зебрданио возрастом не менее 4 мес. Во время подготовительного периода рыб содержат в течение одной недели в аквариумах, соответствующих тестовым. Затем в течение 21 сут рыбы содержатся в воде, содержащей исследуемые концентрации веществ. Далее проводится отбор животных (5 самок и 5 самцов) для последующей оценки уровня вителлогенина, вторичных половых признаков, общей смертности животных,

а также любых признаков токсичности (гипервентиляции, нарушения плавания или равновесия, кровотечения, изменения окраски, нетипичного замирания или нарушения пищевого поведения)¹¹. Межгосударственный стандарт, основанный на использовании теста 21-Day Fish Assay, введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 01.08.2014¹².

Иммунофлуоресцентный количественный анализ разрушения тироксина (TIQDT)

Гормоны щитовидной железы играют важную роль в иммунной системе и регуляции роста, энергетического метаболизма, стресс-ответа, а также пролиферации, дифференцировке, миграции, синаптогенезе и миелинизации нейронов и развитии нервной системы человека и животных. Недостаток или избыток тиреоидных гормонов во время беременности ведет к развитию у плода тяжелых неврологических и иных нарушений, включая умственные расстройства и кретинизм [18]. Иммуноферментный количественный анализ разрушения тироксина (Thyroxine Immunofluorescence Quantitative Disruption Test, TIQDT) на зебраданио представляет собой быструю и экономичную методику тестирования соединений природного и синтетического происхождения, способных нарушать функции щитовидной железы. Во время теста элеутерозембрионы зебраданио (эмбриональная стадия, начинающаяся с вылупления и заканчивающаяся, когда большая часть или весь желток поглощается, и рыба начинает питаться) через 48 ч после оплодотворения экспонируются с исследуемым соединением. Каждое соединение и каждая концентрация исследуется в трех независимых повторностях минимум на 18 зебраданио. Личинки помещаются в культуральные чашки (по одной в ячейку) с добавлением 2 мл среды, содержащей исследуемое соединение, и содержатся в стандартных условиях. Спустя 3 сут личинки фиксируются, перфузируются и хранятся до иммуногистохимического анализа с применением антител против T4. Далее личинки промываются блокирующим буфером и инкубируются с флуоресцентными вторичными антителами при комнатной

температуре в течение 2 ч, после чего образцы анализируются с помощью флуоресцентного микроскопа. Снижение иммунофлуоресценции свидетельствует о снижении иммунореактивности гормонов щитовидной железы в результате действия тестируемых ЭД [19].

Тест на токсичность, определяемую на протяжении жизненного цикла рыб (FLCTT)

Тест на токсичность, определяемую на протяжении жизненного цикла рыб (Fish Life Cycle Toxicity Test, FLCTT), позволяет проанализировать токсичность химических веществ на различных возрастных группах зебраданио. Тест начинают со взрослых самцов и самок (поколение P), у которых отбирают примерно 50–100 оплодотворенных икринок до начала стадии гастрюляции, которые затем подвергаются воздействию не менее 5 различных концентраций исследуемого вещества в проточных условиях. Затем отбирают 25–50 созревших мальков первого поколения (F1) и на 21 сут проводят повторную экспозицию в исследуемом веществе. В тесте оценивают фертильность эмбрионов F1, а также развитие, половое созревание, репродукцию и жизнеспособность их потомства (поколение F2). В исследованиях ежедневно отмечают признаки аномального поведения взрослых рыб, в том числе нескоординированное плавание, потерю равновесия, нетипичное замирание (фризинг) и нарушение пищевого поведения.

Расширенный тест на воспроизводство одного поколения зебраданио (ZEOGRT)

Расширенный тест на воспроизводство одного поколения зебраданио (Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test, ZEOGRT)¹³ – комплексный тест, основанный на мониторинге нескольких поколений зебраданио после воздействия химического агента на первое из них (F0) во взрослом состоянии в течение 4 нед. Тест применяют для оценки экологической опасности и рисков химических веществ, в том числе ЭД, оценивая после 15 нед. у потомства рыб F0 (поколение F1) вылупление, рост, выживаемость, плодовитость самок, фертильность самцов, а также уровень вителлогенина в печени, строение анального плавника (маркер гендера),

¹¹ OECD. Test No. 230. 21-day fish assay. A short-term screening for oestrogenic and androgenic activity, and aromatase inhibition. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 2. OECD Publishing; 2009.

¹² ГОСТ 32429-2013. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Краткосрочное определение ингибирования ароматазы и эстрогенной и андрогенной активности: 21-дневный тест.

¹³ OECD. Guidance Document on Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP). OECD Series on testing and assessment, No. 286. OECD Publishing; 2018. <https://doi.org/10.1787/9789264304796-en>

гистологию гонад и гистопатологию почек, печени и гонад особей каждого пола. После этого от половозрелых рыб F1 получают потомство (поколение F2), у которого на стадии 2-недельных мальков оценивают те же параметры, что и у F1. В течение всего теста рыбы всех поколений подвергаются воздействию препаратов в рамках общего 19-недельного протокола¹⁴.

Детекция веществ, действующих через эстрогенные рецепторы, с использованием трансгенных эмбрионов зебраданио *сyp10a1b* GFP (EASZY)

Среди токсических ЭД человека особо выделяются соединения, действующие как агонисты рецептора эстрогена, в том числе природные и синтетические эстрогены 17 β -эстрадиол, эстрон и 17 α -этинилэстрадиол, поскольку они интенсивно попадают из сточных вод в водные экосистемы [20–22]. Трансгенные зебраданио *сyp19a1b*-GFP экспрессируют флуоресцентный белок, управляемый промотором гена мозговой ароматазы *сyp19a1b* и находящийся в клетках радиальной глии, и используются для оценки эстрогенной активности ксеноэстрогенов и фитозэстрогенов [23]. В тесте на детекцию веществ, действующих через эстрогенные рецепторы, с использованием эмбрионов данных трансгенных зебраданио (Detection of Endocrine Active Substances, acting through estrogen receptors, using transgenic tg(*сyp19a1b*:GFP) Zebrafish embrYos, EASZY), оплодотворенные икринки подвергаются воздействию тестируемого вещества в течение 96 ч. Эмбрионы хранят в термостате при температуре 28 °C, после чего головы личинок зебраданио фотографируют сверху с помощью флуоресцентного микроскопа. При воздействии на трансгенных зебраданио синтетических и природных стероидных эстрогенов наблюдается значительная индукция флуоресценции GFP в развивающемся мозге эмбрионов [24].

Тест на половое развитие рыб (FSDT)

Тест на половое развитие рыб (Fish Sexual Development Test, FSDT) предназначен для оценки химических веществ-ЭД по индукции у рыб вителлогенина, гистологическим изменениям в гона-

дах и динамике соотношения полов¹⁵. После оплодотворения икринки зебраданио помещаются в аквариум с тестируемым веществом на 60 сут при температуре 28 \pm 1 °C. На 38 сут после вылупления проводится отбор рыб для оценки уровня вителлогенина. На 60 сут эксперимента оставшиеся рыбы выводятся из эксперимента и фиксируются для дальнейшего гистологического анализа гонад и подсчета соотношения полов. Гонады классифицируются как семенники или яичники на основании наличия сперматогенных клеток или ооцитов соответственно. Концентрация вителлогенина определяется с помощью иммуноферментного анализа и поликлональных аффинно-очищенных антител против липовителлина зебраданио. Межгосударственный стандарт, основанный на использовании модифицированного FSDT, введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 01.09.2016¹⁶.

Тест на токсичность для рыб на ранней стадии жизни (FELT)

Тест на токсичность для рыб на ранней стадии жизни (Fish Early-Life Stage Toxicity Test, FELT) является наиболее часто используемым тестом для оценки хронических эффектов химических соединений, которые не являются ЭД¹⁷. Оплодотворенные икринки зебраданио (30 шт.) через 3 ч после оплодотворения помещаются в чашки Петри, содержащие исследуемые соединения, на 5 сут. После экспозиции с исследуемым препаратом подсчитываются доля вылупления, время всплытия, выживаемость личинок, морфология, поведение и длина тела, сырой и сухой вес тела. Визуальную оценку морфологии и поведения проводят ежедневно с помощью стереомикроскопа. Кроме того, оценивается вздутие и пигментация плавательного пузыря, а также поведенческие реакции – всплытие, спонтанное плавание, аномальное плавание с поднятым или опущенным хвостом, зависание в вертикальном положении на дне, заваливание набок (атаксия, потеря равновесия) и лежание на боку [25]. Межгосударственный стандарт, в котором закреплено использование FELT, введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 01.08.2014¹⁸.

¹⁴ ГОСТ 33774-2016. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Острая токсичность для эмбрионов рыбы.

¹⁵ OECD. Test No. 234: Fish Sexual Development Test. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 2. OECD Publishing; 2013.

¹⁶ ГОСТ 33638-2015. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Испытания по воздействию на половозрелость рыб.

¹⁷ OECD. Test No. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 2. OECD Publishing; 2013.

¹⁸ ГОСТ 32294-2013. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Определение токсичности для рыб на ранних стадиях развития.

Тест на биоаккумуляцию соединений, содержащихся в пище или воде

Данный тест (Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure Test) предназначен для определения потенциала биоконцентрации веществ в организме рыб при воздействии вещества, растворенного в воде или попадающего в организм с пищей в проточных условиях¹⁹. Используются взрослые особи одного возраста. Тест состоит из двух фаз: непосредственно во время воздействия (обычно 28 сут) и после него. При проведении второй фазы теста зебраданию переносят в среду, свободную от тестируемого вещества, или кормят обычным кормом. Тест на биоконцентрацию с пищей используется для веществ, введение которых в водной среде невозможно или нецелесообразно. Тест повторяется трижды в каждой фазе. Для растворенного в воде вещества оценивают коэффициент биоконцентрации (bioconcentration factor, BCF), а при введении веществ с пищей определяют коэффициент биоусиления (biomagnification factor, BMF), отражающие общую концентрацию исследуемого соединения в организме рыбы, отнесенную к общей сырой ее массе²⁰.

Иные тесты на токсичность у рыб

Некоторые существующие международные стандарты тестирования химических веществ, например, 14-дневный тест на долговременную токсичность у рыб, оценивающий общую летальность (Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study), утратили силу²¹. При этом межгосударственный стандарт, регламентирующий использование теста на основе 14-Day Study, действует в качестве национального стандарта Российской Федерации с 01.08.2014²². Целесообразность отказа от данного теста в ряде стран не очевидна.

В целом, приведенные тесты широко применяются при токсикологических исследованиях химической продукции, однако относительно реже – для анализа ЛС.

Дополнительные аспекты биоскрининга фармакологической активности препаратов на зебраданию

Использование личинок зебраданию для тестирования препаратов

На сегодняшний день отсутствуют регуляторно принятые стандарты тестирования зебраданию в контексте специфических биомедицинских доменов, например, кардио-, нефро- или нейротоксичности. Тем не менее зебраданию активно применяются в подобных исследованиях, в том числе проводимых в ведущих национальных биомедицинских (например, Национальные институты здоровья США, NIH²³) и токсикологических (например, Food and Drug Administration (FDA) National Center for Toxicological Research, NCTR²⁴) центрах. Зебраданию также успешно используются для моделирования различных болезней мозга человека и оценки потенциальных фармакологических агентов для их терапии. Например, на рыбах разработаны многочисленные модели нейродегенеративных заболеваний [26], эпилепсии [27], аффективных расстройств [28] и аддиктивных состояний [29]. Существует целый ряд генетических [30–34] и фармакологических [35] моделей болезни Альцгеймера с использованием зебраданию.

Тестирование нейротропных препаратов проводится как на взрослых особях, так и на личинках зебраданию [3]. Например, у последних можно оценивать двигательную активность, уровень тревожности и зрительно-моторную реакцию. Двигательная активность зебраданию проявляется начиная с 17 ч после оплодотворения, и к 48 ч после оплодотворения личинки демонстрируют координированное плавание [36]. Для оценки локомоторной активности личинки помещают индивидуально в многолучный планшет и анализируют различные параметры движения, например общее пройденное расстояние и среднюю скорость движения [37–39]. Данный тест может использоваться в качестве первичного скрининга при анализе

¹⁹ OECD. Test No. 305: Bioaccumulation in fish: Aqueous and dietary exposure. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 3. OECD Publishing; 2012.

²⁰ ГОСТ 32473-2013. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Определение острой токсичности для рыб.

²¹ https://www.oecd.org/env/ehs/testing/E204_Fish_Prolonged_Toxicity_Test.pdf

²² ГОСТ 32428-2013. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Определение хронической токсичности для рыб: 14-дневный тест.

²³ Burke E. Why use zebrafish to study human diseases? <https://irp.nih.gov/blog/post/2016/08/why-use-zebrafish-to-study-human-diseases>

²⁴ Zebrafish make a splash in FDA research. FDA; 2013. https://www.zeclinics.com/wp-content/uploads/2016/05/zebrafish_0413.pdf

эффективности противосудорожных препаратов [40] и при оценке уровня тревожности, о чем может свидетельствовать хаотичное плавание или замирание [41]. Другим показателем уровня тревожности является фототаксис (тревожные личинки зебрданио характеризуются положительным фототаксисом, выходя из темных областей в освещенные) [42]. Данные поведенческие тесты могут использоваться для изучения препаратов, направленных на коррекцию различных патологических состояний, а также для оценки их рисков [43, 44].

Личинки зебрданио могут применяться для оценки офтальмотоксичности. Например, в тесте зрительно-моторной реакции личинки рыб помещаются в условия с чередованием светлых и темных полей, где регистрируется их локомоторная активность — следование за оптическим потоком [45, 46]. Еще одним методом анализа состояния зрительной системы личинок зебрданио является оценка врожденных оптокинетиических реакций (движение глаз в направлении оптического потока) [36]. В обоих тестах при действии офтальмотоксических агентов нормальные реакции зебрданио в данных тестах нарушены.

Нейрофенотипические тесты на взрослых зебрданио

Для оценки влияния препаратов на поведение взрослых зебрданио обычно адаптируются тесты, традиционно применяемые на грызунах [4, 47–49]. Например, в незнакомых условиях в тесте открытого поля реализуются две стратегии — оценка риска и ориентировочно-исследовательское поведение [50]. Аналогичным ему тестом у рыб является тест незнакомого аквариума, где защитная реакция зебрданио проявляется в стремлении уйти в придонную область и замереть [51, 52]. Для оценки стресса у рыб используется и тест черно-белой камеры, где взрослые особи (в отличие от личинок) предпочитают более безопасную темную зону [51, 53, 54]. Тест построения косяка также может применяться для изучения тревожности рыб [55]. Показано, что расстояние между отдельными особями в косяке зависит от уровня беспокойства рыб, более высокой в более плотной стае [56, 57].

Возможность нарушений когнитивных функций зебрданио при действии препаратов проводится с использованием различных акватических (крестообразного, Т- и У-образных) лабиринтов [58, 59]. Тесты с использованием

Т-образного и крестообразного лабиринтов служат для оценки долговременной памяти и используются в различных парадигмах обучения зебрданио. Для оценки когнитивных фенотипов рыб, в том числе при действии токсических препаратов, также можно использовать тест пассивного избегания [60, 61] и целый ряд других акватических когнитивных тестов [58].

Перспективы применения моделей зебрданио как дополнительных методов доклинического скрининга

Испытание на острую токсичность в акватических моделях является требованием большинства законодательных актов в Европе и других странах по химическим веществам, их производству и экспорту. При этом, в отличие от ЛС, испытание на хроническую токсичность химической продукции требуется, если результаты острого испытания указывают на значительные риски. Поскольку по своей научно-практической значимости модели на разных стадиях развития зебрданио соответствуют данным практическим запросам, представляется целесообразным сформулировать ряд перспектив дальнейшего развития данной области как в научном, так и прикладном аспектах.

В настоящее время активно обсуждается интеграция традиционных токсикологических скрининговых методов с новейшими достижениями омиксной биологии [62]. Например, концепция интегрированных подходов к тестированию и анализу (Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA) объединяет различные наборы токсикологических данных (*in silico*, *ex vivo*, *in vitro*) для оценки риска с тем, чтобы уменьшить потребность в тестировании на животных, в то же время существенно обогатив полученные данные за счет включения протеомных, геномных и метаболомных профилей препаратов [62]. И хотя применение данных подходов универсально и будет способствовать эффективности всех видов доклинических испытаний, в том числе и на традиционных моделях, их использование на зебрданио (в сочетании с их потенциалом высокопродуктивного скрининга) представляется особенно перспективным. Можно ожидать, что применение для подобных исследований зебрданио на всех стадиях их развития обусловит модернизацию системы доклинического тестирования за счет усиления данными молекулярной биологии, биохимии, а также системной биологии.

При работе с зебраданио необходимо учитывать их особенности как модельного организма [6]. В частности, зебраданио обладают хорошей нейрорегенерацией во взрослом возрасте, что может помешать при тестировании терапевтических препаратов против нейродегенерации, так как в этом случае может быть сложно выявить причину улучшения – действие ли это препарата или же произошла нейрорегенерация [63]. Модель зебраданио находит успешное применение в качестве платформы для скрининга препаратов с высокой пропускной способностью (high-throughput screening, HTS). Такой подход стал возможен не только благодаря преимуществам модельного объекта (например, на личинках зебраданио можно тестировать тысячи препаратов в день), но и за счет развития технологий, в том числе роста вычислительной мощности компьютера и развития инструментов регистрации, генерирующих данные с высоким пространственным и временным разрешением [64, 65]. Токсические эффекты при этом оцениваются не только по уровню смертности, но также и по другим (физиологическим) признакам, например по активности антиоксидантной системы организма [66].

Использование взрослых животных для оценки токсичности веществ требует увеличения времени экспозиции и вызывает снижение производительности скрининга. Несмотря на данные ограничения, применение взрослых особей зебраданио в тестировании малых молекул является крайне важным с биологической точки зрения и должно активно внедряться в практику наравне с использованием более производительных платформ на личинках рыб. Это обеспечит, например, более адекватную тест-систему (с точки зрения зрелости физиологических систем) для оценки эффектов препаратов на организм взрослого человека, чем тестирование на личинках рыб. Кроме того, при таком подходе учитывается тот факт, что тестирование эффектов ведется на глобальной популяции (где взрослые особи преобладают), а не избирательно (например, на педиатрической популяции).

Определенную сложность при тестировании веществ на акватических моделях вызывает необходимость отличать общую токсичность препаратов от возможных более специфических аспектов действия, например их активности как ЭД. Решению данной задачи будет способствовать расширение спектра изучаемых профилей веществ, в том числе путем включения других физиологических систем в биоскрининговые

платформы, что позволит сформировать базы знаний по ткане- или системоспецифичным фенотипам для анализа в акватических тестах. Например, как уже отмечалось, зебраданио хорошо подходят в качестве модели для анализа нормальных и патологических процессов мозга [67, 68], поскольку при относительной простоте центральной нервной системы отличаются сложностью фенотипов, достаточной для изучения поведенческих процессов и эффективного биоскрининга [63].

Использование современных систем видеорегистрации позволяет анализировать широкий спектр фенотипов зебраданио, включая показатели общей активности, направленность движения, его угловые характеристики, а также особую геометрию паттернов плавания (мандр, ротации, угловая скорость и др.) [69, 70]. Возможность одновременной регистрации активности нескольких зебраданио в группе также позволяет анализировать социальное и тревожное поведение [71], а разработанные автоматизированные системы введения препаратов, подачи подкрепления (корма) и компьютерного предъявления стимулов (например, социального подкрепления в виде показа группы рыб или в аверсивных моделях при экспозиции образа или видео хищника на экране) [72] существенно оптимизируют процедуры тестирования, стандартизируют исследования [63] и обеспечивают эффективный сбор, надежность и воспроизводимость полученных данных [73, 74].

Применение данных подходов будет способствовать эффективности всех видов доклинических испытаний, в том числе на традиционных моделях, при этом их использование на зебраданио (в сочетании с потенциалом высокопродуктивного скрининга) представляется особенно перспективным. Более того, локомоцию зебраданио, в том числе при действии различных химических препаратов, возможно регистрировать в трехмерном (3D) пространстве [75]. Это особенно важно для тестирования нейротропных препаратов, так как рыбы (в отличие от человека и грызунов) обладают трехмерной локомоцией, свободно плавают в толще воды по всем трем осям X–Y–Z. Таким образом, по сравнению со стандартными моделями у зебраданио имеется дополнительное пространственное измерение для экспрессии их поведенческих параметров [63], некоторые из которых (например, атаксия, спиральное плавание и циркуляции) в 3D могут отражать токсичность препаратов

и легко регистрируются на зебраданио в ходе биоскрининга.

Использование систем искусственного интеллекта (ИИ) приобретает особую популярность в последние годы в биомедицинских исследованиях [76] и может быть применено к тестированию препаратов на рыбах. Например, системы ИИ, работающие с визуальными данными (видеофайлами или изображениями), способны детектировать пространственные паттерны поведения зебраданио (особенно в 3D) и анализировать наблюдаемые эффекты [77]. Также существует возможность проводить мониторинг сразу нескольких точек тела рыбы, включая нос, центр тела и хвост, что не только экономит время при оценке базовых поведенческих паттернов, но и позволяет оценивать сложные формы поведения и проводить количественный анализ двигательной активности [63]. Кроме того, можно использовать алгоритмы машинного обучения для анализа поведенческих паттернов рыб [75] на основе библиотек траекторий движения при введении нейротропных агентов разных классов. Далее создается система ИИ (нейросеть), которая тестируется на препаратах с разным фармакологическим профилем действия [77]. При сравнении пространственных паттернов такие системы могут автоматически классифицировать активность новых фармакологических агентов и тем самым существенно облегчать отбор соединений с потенциальными свойствами [63].

Используя двух- или трехмерные локомоторные данные, ИИ также может быть обучен детектировать специфические паттерны рыб, имеющие отношение к острой или хронической токсичности препаратов. Например, признаки общей атаксии (заваливание на бок) и аномального плавания (гиполокомоция, вертикальное зависание, винтовое или циркулярное плавание) в полной мере могут распознаваться и анализироваться у зебраданио системами ИИ. При этом применение данных систем не ограничивается только тестированием нейротропных препаратов на поведение рыб – например, ИИ может также быть применен в акватических моделях для анализа цитологических или морфологических эффектов тестируемых препаратов, а также для многомерной интеграции поведенческих и иных данных. Возможность одновременного мониторинга множества организмов (например, стай рыб), а также высокая производительность тест-систем на зебраданио позволят более полно (по сравнению с другими, традиционными

моделями) использовать потенциал данной акватической модели для создания платформ на основе ИИ.

Перспективным представляется использование различных методов визуализации для проведения токсикологических исследований препаратов, например функционального магнитного резонанса (fMRI), позитронно-эмиссионной томографии (PET), оценки экспрессии ранних проонкогенов, а также различных молекулярных сенсоров, например генетически кодируемых кальциевых индикаторов (genetically encoded calcium indicators, GECIs) [78]. Одним из них является модулируемый кальцием фотоактивируемый ратиометрический индикатор (calcium-modulated photoactivatable ratiometric integrator, CaMPARI), который изменяет свой цвет от зеленого к красному при повышении уровня кальция в нейронах [78]. Применение данного индикатора в сочетании с поведенческим анализом действия ряда токсических веществ на личинок зебраданио выявило как чувствительность модели к действию токсических веществ, так и некоторые расхождения в поведенческих и кальциевых ответах [78]. Это обстоятельство указывает, что простые неврологические тесты на зебраданио могут быть недостаточны для понимания профиля токсичности препарата, требуя их интеграции с молекулярно-генетическими маркерами как стратегии доклинического тестирования. Небольшие размеры тела и отдельных органов, оптическая прозрачность личинок и отдельных линий взрослых рыб (например, линии *casper*), а также существенная прозрачность кожи головы и черепа позволят более полно (чем на традиционных моделях на грызунах) использовать зебраданио для тестирования препаратов с использованием методов неинвазивного биоимиджинга.

Отличительной особенностью зебраданио от человека и других млекопитающих является наличие нескольких (чаще двух) копий многих генов, появившихся в результате дополнительного цикла дупликации генома у костных рыб [79]. Так, около 20–25% человеческих генов гомологичны двум и более родственным паралогам зебраданио [80, 81]. На сегодня лишь некоторые из таких генов изучены и функционально охарактеризованы, и недостаток информации о таких дублированных генах-ортологах осложняет использование зебраданио в трансляционной биомедицине [63]. Более того, для моделирования генетически обусловленных расстройств с потерей функции гена

необходимо инактивировать оба паралога у зебраданио [82]. Например, только мутации, нарушающие работу обоих ортологов гена *TDP-43*, ответственного за развитие амиотрофического склероза, приводят к появлению у зебраданио фенотипа мышечной дегенерации [10, 82].

Вместе с тем наличие дублированных копий одного гена может стать и большим преимуществом зебраданио как модельного организма [63]. Так, в отличие от млекопитающих, где отсутствие одной копии витального гена может привести к смерти, у зебраданио возможны жизнеспособные нокауты таких генов по одной из копий, что позволяет изучать их функции и разрабатывать новые методы лечения различных заболеваний [83]. Более того, наличие двух копий конкретного гена при создании нокаутных моделей на зебраданио позволяет вместо классического распределения генотипов: $+/+$ (дикий тип), $+/-$ (мутанты-гетерозиготы) и $-/-$ (гомозиготные мутанты) иметь гораздо более гранулярную картину генотипов: $+/+/+$, $+/+/-$, $+/-/-$, $+/-+/-$, $+/-/-$, $-/-/-$ и т.д. [63]. Это не только позволяет более полно изучить ген-дозозависимые эффекты при генетических модификациях на зебраданио, но и использовать данный арсенал линий в фармакогенетических исследованиях.

При тестировании эффектов препаратов наиболее часто применяется их введение зебраданио при помощи водной иммерсии, где вещество проникает в системный кровоток рыб через жабры, богатые кровеносными сосудами [63]. С одной стороны, это требует использования либо водорастворимых препаратов, либо дополнительного разведения в растворителе, например диметилсульфоксиде (ДМСО), в физиологически инертных концентрациях [63]. С другой стороны, проникнув в кровоток через жабры (и также частично всосавшись через кожу), препарат может оказывать быстрое действие, по сути, напоминая внутривенное введение [63]. Помимо водной иммерсии существует ряд альтернативных способов острого и хронического введения препаратов зебраданио, например пероральное [84], внутрижелудочковое [85], внутрибрюшинное, подкожное, внутримышечное и внутривенное введение [86], которые также позволяют методически решить проблемы введения препаратов и их дозировки [63]. Целесообразно параллельно проводить анализ содержания препаратов в тканях и органах-мишенях (особенно при наличии выраженных поведенческих и физиологических ответов), результаты которого позволяют доказать, что тестируемые

вещества способны достичь целевых тканей [63]. Наконец, следует учитывать, что фармакокинетика препаратов может отличаться у зебраданио по сравнению с человеком и грызунами [87], особенно с учетом холоднокровности рыб и теплокровности млекопитающих, таким образом требуя дополнительных фармакокинетических исследований на максимально широком спектре экспериментальных моделей, включая зебраданио [63].

При этом как модель для доклинического скрининга зебраданио обладают некоторыми дополнительными объективными ограничениями по сравнению с другими лабораторными животными, например мышами [63]. В частности, существуют десятки генетически гомогенных (инбредных) линий мышей, которые удобны для проведения генетических манипуляций с целью получения мутантных или трансгенных животных. Такие линии мышей не только хорошо охарактеризованы генетически, но и подробно изучены фенотипически, в том числе с точки зрения их поведенческих, нейрохимических и нейроморфологических особенностей. Для зебраданио выведение инбредных линий происходило гораздо меньшее время исторически и также осложнено генетическим дрейфом у рыб, в силу чего существует лишь несколько условно-инбредных линий зебраданио [63].

Возникает вопрос о том, насколько целесообразно преференционно сужать биомедицинские исследования к инбредным линиям модельных объектов. С одной стороны, применение инбредных линий позволяет минимизировать индивидуальную вариабельность ответов, тем самым повышая воспроизводимость (а следовательно, и саму валидность) результатов исследований, а также позволяя более четко вычлнить изменения исследуемых биологических параметров как таковых (за счет снижения вариабельного «шума») в ответ на конкретное экспериментальное вмешательство. С другой стороны, такие исследования будут иметь незначительную популяционную валидность, поскольку они используют искусственные популяции, лишенные естественной вариабельности [63]. Поэтому с учетом данных факторов при тестировании токсичности препаратов на зебраданио важно не исключать, а активно использовать беспородные популяции, генетическая неоднородность и фенотипическая вариабельность которых максимально приближена к чрезвычайно неоднородной человеческой популяции.

Несмотря на преимущества зебраданио как модельного объекта для исследования фармакологических препаратов, они имеют ряд ограничений, которые необходимо учитывать для успешного использования данного модельного организма [63]. Например, немаловажный аспект при изучении токсичности препаратов на зебраданио — это чувствительность зебраданио к условиям окружающей среды, так как различные факторы могут оказать влияние на базовый уровень стресса [63]. В частности, показано, что на рыб оказывает воздействие уровень вибрации, который может исходить от лабораторных аквариумных систем, и уровень освещения [88]. При создании биоскрининговых платформ важно также учитывать особенности анатомии зебраданио. Так, одним из наиболее ярких отличий мозга рыб (от человека и грызунов) является отсутствие коры и гиппокампа, функции которых в мозге выполняют аналогичные структуры [89].

При этом зебраданио являются удобным модельным организмом для создания генетических моделей заболеваний человека, поскольку (в силу особенностей генетики) у рыб создание генетически модифицированных (мутантных или трансгенных) линий, с одной стороны, облегчено наличием гораздо большего (чем у грызунов) арсенала генетических методов и технологий (например, систем редактирования генома TALEN и CRISPR/Cas9) [63], а с другой стороны, требует на порядок меньше времени, финансовых и других лабораторных ресурсов [30–34, 90].

Зебраданио являются перспективным объектом для фармакогенетических исследований, позволяя сочетать генетические манипуляции с действием препаратов и потенциалом высокопроизводительного скрининга [91]. Например, антагонист гистаминовых рецепторов клемизол эффективен для подавления судорог на модели генетической эпилепсии у зебраданио-мутантов по гену *scn1lab*, кодирующему альфа-субъединицу натриевого канала 1.1 [92], которая используется в качестве модели тяжелой младенческой миоклонической эпилепсии (синдром Драве) [63, 93].

Помимо экономической и практической выгоды применение зебраданио для скрининга препаратов позволяет снижать этическую и регуляторную нагрузку на исследования (табл. 1). В частности, использование зебраданио в доклинических исследованиях фармакологических препаратов хорошо соотносится с концепцией

3R проведения доклинических исследований [63]. Данная концепция предполагает модернизацию доклинических испытаний в сторону замены (replacement) используемых животных на организмы, которые находятся эволюционно дальше от человека, чем грызуны, сокращение (reduction) количества используемых животных, а также оптимизацию (refinement) применяемых протоколов и моделей за счет сокращения частоты использования или тяжести процедур, которые необходимо использовать для получения сведений о безопасности и эффективности препарата [94]. Следует отметить, что модель зебраданио в полной мере соответствует всем аспектам данной концепции [63]. Во-первых, данный организм можно использовать в качестве дополнительной альтернативы (как минимум, на ранних стадиях доклинических испытаний) существующим тестам на грызунах. Во-вторых, оценка токсичности на личинках зебраданио позволит уже на ранних этапах элиминировать из исследований препараты, обладающие выраженным токсическим эффектом, что в дальнейшем сократит суммарное количество используемых для исследований животных. В-третьих, использование эмбриональных моделей на зебраданио позволяет уменьшить количество необходимых манипуляций с организмами при оценке токсичности ЛС, а благодаря прозрачности эмбрионов можно оценивать токсичность напрямую, без дополнительных манипуляций [95].

Действующие международные рекомендации (например, руководство по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов²⁵), в том числе в странах Евразийского экономического союза, внедряют в практику доклинических испытаний передовой подход, основанный на сокращении объема доклинических тестов за счет проведения поисковых клинических исследований в рамках I фазы с использованием микродоз ЛС и других приемов, обеспечивающих безопасность первого применения ЛС у человека при ограниченном (или минимальном) объеме доклинических исследований. Расширение программы доклинических испытаний происходит уже на последующих этапах разработки препарата, когда его перспективность подтверждают совокупные доклинические и клинические данные на ранних этапах разработки.

²⁵ ICH M3 (R2) Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals. Scientific guideline. CPMP/ICH/286/95. EMA; 2013.

В этой связи методы оценки токсичности фармакологически активных веществ с использованием тест-системы на зебраданию могут быть включены в программу доклинических исследований для получения дополнительных токсикологических данных на ранних этапах разработки и скрининга соединений-кандидатов. При этом ценность зебраданию заключается в возможности применения (при необходимости) методов высокопроизводительного биотестирования при первичном скрининге потенциально фармакологически активных веществ или для изучения механизма их действия [63], а также для применения в исследованиях с новыми технологиями (например, при прогнозировании активности в моделях *in silico* или *in vitro*).

Стратегические направления развития доклинического тестирования лекарственных препаратов на зебраданию

В настоящее время отсутствуют стандарты применения зебраданию в доклинических исследованиях ЛС, а также сведения о валидации методов их тестирования на зебраданию. Использование новых альтернативных методов оценки безопасности для замены существующих стандартных подходов возможно только при их надлежащей валидации и одобрении соответствующими экспертными организациями²⁶. При разработке принципов доклинического тестирования лекарственных препаратов на зебраданию важно сопоставить данные по токсичности веществ *in vivo* с использованием рыб и грызунов, оценить условия экспериментов по острой и хронической токсичности, сравнить качественные и количественные параметры токсичности, провести их экстраполяцию на экспериментальных животных и человека (органы-мишени, токсические эффекты, их обратимость, безопасные дозы), описать критерии и формулы пересчета для трансформации фактических данных, полученных в эксперименте, провести комплексный анализ влияния на функцию центральной нервной системы, маркерные параметры сердечно-сосудистой системы, дыхание, гематологические, биохимические, патоморфологические и токсикокинетические исследования, соотношение экспозиции у человека и зебраданию, а также определить границы безопасности и безопасной стартовой дозы для первого применения ЛС у человека и рыб.

Для повышения эффективности токсикологических исследований препаратов на зебраданию можно использовать следующие методологические подходы:

- более широкое использование данного организма (после надлежащей валидации) на различных этапах доклинической разработки лекарственного препарата – от обнаружения нового потенциального кандидата до проведения регуляторных токсикологических исследований;
- более широкое тестирование рыб на всех стадиях развития, в том числе взрослых и стареющих особей (геронтоксичность);
- повышение высокопроизводительности биоскрининговых платформ *in vivo* за счет автоматизации (в том числе роботизации) процедур тестирования;
- более широкое включение и анализ гендерных данных;
- тестирование взаимодействий нескольких препаратов;
- расширение спектра тестируемых линий за счет включения инбредных, аутбредных и гетерогенных диких популяций зебраданию;
- использование современных методов химической биологии (химическое моделирование, докинг) при анализе результатов скрининга *in vivo* фармакологических препаратов;
- анализ популяционной валидности полученных токсикологических данных (с учетом стратификации тестируемой популяции по количеству чувствительных, мало- и нечувствительных особей), а также активное применение методов ИИ для анализа широкого спектра фенотипических данных.

Для дальнейшего развития доклинического тестирования фармакологически активных веществ на зебраданию можно сформулировать ряд конкретных, вполне достижимых стратегических задач:

- более широкое применение акватических моделей в доклинических тестах; расширение видового разнообразия используемых акватических моделей за счет включения других видов рыб (медака, гольяна) наряду с зебраданию;
- разработка программ валидации и всесторонняя валидация методов тестирования на зебраданию путем сопоставления их результатов с результатами, полученными при использовании стандартных методов

²⁶ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

изучения фармакологической активности и токсичности ЛС;

- переход от относительно неспецифических показателей токсичности (летальность, нарушение активности) к более детальному фенотипическому анализу широкого массива токсикологических данных на зебраданио;
- расширение спектра исследуемых доменов (например, включение многочисленных других показателей, помимо тестирования ЭД, в том числе кардио-, нефро- и нейротоксичности) на зебраданио;
- более широкое внедрение моделей на зебраданио в национальные и международные протоколы доклинического тестирования;
- расширение спектра фенотипических данных по токсичности за счет включения геномных, метаболомных, протеомных и других профилей;
- интеграция традиционных токсикологических тестов на зебраданио с молекулярными биомаркерами (например, генетическими кальциевыми сенсорами);
- повышение стандартов воспроизводимости (репродуцибельности) полученных результатов скрининга за счет анализа и контроля за внешними (феномными) факторами при проведении экспериментов;
- более широкое применение генетически модифицированных (мутантных и трансгенных) зебраданио для доклинического скрининга препаратов; создание фармакогенетических платформ на основе зебраданио;
- изучение эпигенетических механизмов действия препаратов, в том числе в ряду нескольких поколений зебраданио;
- более широкое использование кросс-таксонного сравнительного анализа данных, полученных при скрининге токсичности препаратов на рыбах, грызунах и человеке.

Заключение

Зебраданио в настоящее время широко применяются в регуляторных исследованиях безопасности химической продукции, однако их использование в доклинических исследованиях лекарственных препаратов в настоящее время ограничено. Необходимы как разработка стандартов применения зебраданио в данной области, так и тщательная валидация методов тестирования лекарственных препаратов на зебраданио путем сопоставления их результатов с результатами, полученными при использовании стандартных методов изучения фармакологической активности и токсичности ЛС.

Использование зебраданио как модельного организма в токсикологических и фармакологических исследованиях позволит существенно ускорить отбор перспективных малых молекул с последующим исследованием их на более высоко организованных позвоночных животных, включая грызунов и приматов, а также на людях. Возможность применения систем ИИ в исследованиях существенно упростит изучение фармакологических свойств молекул, а чувствительность данной модели к большинству классов фармакологических агентов, сходство рецепторов, биохимических систем и наличие основных физиологических систем органов как у человека делает зебраданио незаменимым инструментом первичного скрининга лекарственных препаратов и последующей оценки безопасности ЛС. В этой связи представляется перспективным более широкое внедрение моделей зебраданио (эмбрионов, личинок и взрослых особей) в практику доклинических исследований в Российской Федерации с возможной перспективой их валидации и, в случае успеха, последующим включением как дополнительных моделей в национальные стандарты.

Литература / References

1. Cook D, Brown D, Alexander R, March R, Morgan P, Satterthwaite G, et al. Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(6):419–31. <https://doi.org/10.1038/nrd4309>
2. Waring MJ, Arrowsmith J, Leach AR, Leeson PD, Mandrell S, Owen RM, et al. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(7):475–86. <https://doi.org/10.1038/nrd4609>
3. Кротова НА, Лакстыгал АМ, Таранов АС, Ильин НП, Бытов МВ, Волгин АД и др. Зебраданио (zebrafish) как новая перспективная модель в трансляционной нейробиологии. *Российский физиологический журнал им И.М. Сеченова.* 2019;105(11):1417–35. Krotova NA, Lakstygala AM, Taranov AS, Ilyin NP, Bytov MV, Volgin AD, et al. Zebrafish as a new perspective model in translational neurobiology. *I.M. Sechenov Russian Journal of Physiology.* 2019;105(11):1417–35 (In Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0869813919110062>
4. Галстян ДС, Колесникова ТО, Косицын ЮМ, Забегалов КН, Губайдуллина МА, Маслов ГО и др. Моделирование и оценка судорожной активности у зебраданио (*Danio rerio*). *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.*

- 2022;20(2):193–9.
Galstyan DS, Kolesnikova TO, Kositsyn YuM, Zabegalov KN, Gubaydullina MA, Maslov GO, et al. Modeling and assaying seizure activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2022;20(2):193–9 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17816/RCF202193-199>
5. Державина КА, Ильин НП, Серединская МВ, Неруш МО, Захарченко КВ, Сорокин ДВ и др. Зебраданио (zebrafish) как модель редких (орфанных) заболеваний нервной системы. *Российский журнал персонализированной медицины*. 2022;2(2):17–32.
Derzhavina KA, Ilyin NP, Seredinskaya MV, Nerush MO, Zakharchenko KV, Sorokin DV, et al. Zebrafish as a model organism for rare diseases of nervous system. *Russian Journal for Personalized Medicine*. 2022;2(2):17–32 (In Russ.).
<https://doi.org/10.18705/2782-3806-2022-2-2-17-32>
 6. Калуев АВ. Принципы моделирования заболеваний мозга и их терапии на зебраданио (zebrafish). *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2022;20(2):119–22.
Kalueff AV. Principles of modeling brain diseases and their therapy based on zebrafish studies. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2022;20(2):119–22 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17816/RCF202119-122>
 7. Lowery LA, De Rienzo G, Gutzman JH, Sive H. Characterization and classification of zebrafish brain morphology mutants. *Anat Rec*. 2009;292(1):94–106.
<https://doi.org/10.1002/ar.20768>
 8. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013;496(7446):498–503.
<https://doi.org/10.1038/nature12111>
 9. Kalueff AV, Stewart AM, Gerlai R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 2014;35(2):63–75.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002>
 10. Burgess HA, Burton EA. A critical review of zebrafish neurological disease models–1. The premise: neuroanatomical, cellular, and genetic homology, and experimental tractability. *Oxford Open Neuroscience*. 2023;2:kvac018.
<https://doi.org/10.1093/oons/kvac018>
 11. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013;496(7446):498–503.
<https://doi.org/10.1038/nature12111>
 12. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. 1995;203(3):253–310.
<https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
 13. Suvorova M, Zharkova I, Sutuyeva L, Ondasynova A. ZFET (Zebrafish embryotoxicity test) as a model test for determination of heavy metals embryotoxicity. *Experimental Biology*. 2016;66(1):68–76.
 14. Rana J, Ansari E, Patel D, Prabhu P. Effect of 3, 4-dichloroaniline on growth of juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Int J Fish Aquat Stud*. 2020;2(3):456–60.
 15. Kazeto Y, Ijiri S, Place AR, Zohar Y, Trant JM. The 5'-flanking regions of CYP19A1 and CYP19A2 in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;288(3):503–8.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5796>
 16. Tang H, Chen Y, Liu Y, Yin Y, Li G, Guo Y, et al. New insights into the role of estrogens in male fertility based on findings in aromatase-deficient zebrafish. *Endocrinology*. 2017;158(9):3042–54.
<https://doi.org/10.1210/en.2017-00156>
 17. Diotel N, Charlier TD, Lefebvre d'Hellencourt C, Couret D, Trudeau VL, Nicolau JC, et al. Steroid transport, local synthesis, and signaling within the brain: roles in neurogenesis, neuroprotection, and sexual behaviors. *Front Neurosci*. 2018;12:84.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00084>
 18. Berbel P, Bernal J. Hypothyroxinemia: a subclinical condition affecting neurodevelopment. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2010;5(4):563–75.
<https://doi.org/10.1586/eem.10.37>
 19. Raldúa D, Babin PJ. Simple, rapid zebrafish larva bioassay for assessing the potential of chemical pollutants and drugs to disrupt thyroid gland function. *Environ Science Technol*. 2009;43(17):6844–50.
<https://doi.org/10.1021/es9012454>
 20. Kidd KA, Paterson MJ, Rennie MD, Podemski CL, Findlay DL, Blanchfield PJ, et al. Direct and indirect responses of a freshwater food web to a potent synthetic oestrogen. *Philos Trans R Soc B: Biol Sci*. 2014;369(1656):20130578.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0578>
 21. Brion F, Tyler C, Palazzi X, Laillet B, Porcher J-M, Garric J, et al. Impacts of 17 β -estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol*. 2004;68(3):193–217.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.01.022>
 22. Nash JP, Kime DE, Van der Ven LT, Wester PW, Brion F, Maack G, et al. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environ Health Perspect*. 2004;112(17):1725–33.
<https://doi.org/10.1289/ehp.7209>
 23. Tong SK, Mouriec K, Kuo MW, Pellegrini E, Gueguen MM, Brion F, et al. A cyp19a1b-gfp (aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. *Genesis*. 2009;47(2):67–73.
<https://doi.org/10.1002/dvg.20459>
 24. Brion F, De Gussem V, Buchinger S, Hollert H, Carere M, Porcher J-M, et al. Monitoring estrogenic activities of waste and surface waters using a novel in vivo zebrafish embryonic (EASZY) assay: Comparison with in vitro cell-based assays and determination of effect-based trigger values. *Environ Int*. 2019;130:104896.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.06.006>
 25. Di Paolo C, Groh KJ, Zennegg M, Vermeirssen EL, Murk AJ, Eggen RI, et al. Early life exposure to PCB126 results in delayed mortality and growth impairment in the zebrafish larvae. *Aquat Toxicol*. 2015;169:168–78.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.014>
 26. Wang J, Cao H. Zebrafish and medaka: important animal models for human neurodegenerative diseases.

- Int J Mol Sci.* 2021;22(19):10766.
<https://doi.org/10.3390/ijms221910766>
27. Stewart AM, Desmond D, Kyzar E, Gaikwad S, Roth A, Riehl R, et al. Perspectives of zebrafish models of epilepsy: what, how and where next? *Brain Res Bull.* 2012;87(2–3):135–43.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.11.020>
 28. de Abreu MS, Maximino C, Banha F, Anastácio PM, Demin KA, Kalueff AV, et al. Emotional behavior in aquatic organisms? Lessons from crayfish and zebrafish. *J Neurosci Res.* 2020;98(5):764–79.
<https://doi.org/10.1002/jnr.24550>
 29. Bao W, Volgin AD, Alpyshov ET, Friend AJ, Strekalova TV, de Abreu MS, et al. Opioid neurobiology, neurogenetics and neuropharmacology in zebrafish. *Neuroscience.* 2019;404:218–32.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.01.045>
 30. Sundvik M, Chen YC, Panula P. Presenilin1 regulates histamine neuron development and behavior in zebrafish, *danio rerio*. *J Neurosci.* 2013;33(4):1589–97.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.1802-12.2013>
 31. Pu YZ, Liang L, Fu AL, Liu Y, Sun L, Li Q, et al. Generation of Alzheimer's disease transgenic zebrafish expressing human APP mutation under control of zebrafish appb promoter. *Curr Alzheimer Res.* 2017;14(6):668–79.
<https://doi.org/10.2174/1567205013666161201202000>
 32. Paquet D, Bhat R, Sydow A, Mandelkow EM, Berg S, Hellberg S, et al. A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation. *J Clin Invest.* 2009;119(5):1382–95.
<https://doi.org/10.1172/jci37537>
 33. Lopez A, Lee SE, Wojta K, Ramos EM, Klein E, Chen J, et al. A152T tau allele causes neurodegeneration that can be ameliorated in a zebrafish model by autophagy induction. *Brain.* 2017;140(4):1128–46.
<https://doi.org/10.1093/brain/awx005>
 34. Bai Q, Garver JA, Hukriede NA, Burton EA. Generation of a transgenic zebrafish model of Tauopathy using a novel promoter element derived from the zebrafish eno2 gene. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(19):6501–16.
 35. Nada SE, Williams FE, Shah ZA. Development of a novel and robust pharmacological model of okadaic acid-induced Alzheimer's disease in zebrafish. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2016;15(1):86–94.
<https://doi.org/10.2174/1871527314666150821105602>
 36. Saint-Amant L, Drapeau P. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *J Neurobiol.* 1998;37(4):622–32.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4695\(199812\)37:4%3C622::aid-neu10%3E3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4695(199812)37:4%3C622::aid-neu10%3E3.0.co;2-s)
 37. Basnet RM, Zizioli D, Taweedet S, Finazzi D, Memo M. Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology. *Biomedicine.* 2019;7(1):23.
<https://doi.org/10.3390%2Fbiomedicine7010023>
 38. Suryanto ME, Audira G, Uapipatanakul B, Hussain A, Saputra F, Siregar P, et al. Antidepressant screening demonstrated non-monotonic responses to amitriptyline, amoxapine and sertraline in locomotor activity assay in larval zebrafish. *Cells.* 2021;10(4):738.
<https://doi.org/10.3390/cells10040738>
 39. Colwill RM, Cretton R. Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Behav Processes.* 2011;86(2):222–9.
<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2010.12.003>
 40. Afrikanova T, Serruys ASK, Buenafe OEM, Clinckers R, Smolders I, de Witte PAM, et al. Validation of the zebrafish pentylenetetrazol seizure model: locomotor versus electrographic responses to antiepileptic drugs. *PLoS One.* 2013;8(1):e54166.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054166>
 41. Blaser RE, Rosemberg DB. Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): dissociation of black/white preference and novel tank test. *PLoS One.* 2012;7(5):e36931.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036931>
 42. Chen AB, Deb D, Bahl A, Engert F. Algorithms underlying flexible phototaxis in larval zebrafish. *J Exp Biol.* 2021;224(10):jeb238386.
<https://doi.org/10.1242/jeb.238386>
 43. Zimmermann FF, Gaspary KV, Leite CE, De Paula Cognato G, Bonan CD. Embryological exposure to valproic acid induces social interaction deficits in zebrafish (*Danio rerio*): A developmental behavior analysis. *Neurotoxicol Teratol.* 2015;52(Pt A):36–41.
<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.10.002>
 44. Dwivedi S, Medishetti R, Rani R, Sevilimedu A, Kulkarni P, Yogeewari P. Larval zebrafish model for studying the effects of valproic acid on neurodevelopment: An approach towards modeling autism. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2019;95:56–65.
<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2018.11.006>
 45. Scott CA, Marsden AN, Slusarski DC. Automated, high-throughput, in vivo analysis of visual function using the zebrafish. *Dev Dyn.* 2016;245(5):605–13.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.24398>
 46. Thorn RJ, Dombroski A, Eller K, Dominguez-Gonzalez TM, Clift DE, Baek P, et al. Analysis of vertebrate vision in a 384-well imaging system. *Sci Rep.* 2019;9(1):13989.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-50372-0>
 47. Маслов ГО, Колесникова ТО, Забегалов КН, Калуев АВ. Подходы к экспериментальному моделированию делирия на зебраданио (*Danio rerio*). *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* 2022;20(2):177–83.
Maslov GO, Kolesnikova TO, Zabegalov KN, Kalueff AV. Experimental approaches to modeling delirium in zebrafish (*Danio rerio*). *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy.* 2022;20(2):177–83 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17816/RCF202177-183>
 48. Галстян ДС, Колесникова ТО, Косицын ЮМ, Забегалов КН, Губайдуллина МА, Маслов ГО и др. Использование зебраданио (*Danio rerio*) для оценки краткосрочной памяти – габитуация и определение домашней базы. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* 2022;20(2):169–75.
Galstyan DS, Kolesnikova TO, Kositsyn YuM, Zabegalov KN, Gubaidullina MA, Maslov GO, et al. Using zebrafish (*Danio rerio*) to assess short-term memory: the habituation and the homebase tests. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy.* 2022;20(2):166–75 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17816/RCF202169-175>

49. Галстян ДС, Колесникова ТО, Косицын ЮМ, Забегалов КН, Губайдуллина МА, Маслов ГО и др. Поведение отчаяния у рыб на примере модельного организма зебраданио (*Danio rerio*). *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2022;20(2):157–62.
Galstyan DS, Kolesnikova TO, Kositsyn YuM, Zabe-galov KN, Gubaidullina MA, Maslov GO, et al. Despair-like behavior in fish based on the zebrafish (*Danio rerio*). *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2022;20(2):157–62 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17816/RCF202157-162>
50. Stewart AM, Kalueff AV. The developing utility of zebrafish models for cognitive enhancers research. *Curr Neuropharmacol*. 2012;10(3):263–71.
<https://doi.org/10.2174%2F157015912803217323>
51. Галстян ДС, Колесникова ТО, Косицын ЮМ, Забегалов КН, Губайдуллина МА, Маслов ГО и др. Оценка общей двигательной активности и тревожности зебраданио (*Danio rerio*) с использованием тестов незнакомого аквариума, открытого поля, черно-белого аквариума и построения косяка. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2022;20(2):123–33.
Galstyan DS, Kolesnikova TO, Kositsyn YuM, Zabe-galov KN, Gubaidullina MA, Maslov GO, et al. Assessment of general locomotor activity and anxiety in zebrafish (*Danio rerio*) in the light-dark box (tank), the shoaling test, in the novel tank and the open field tests. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2022;20(2):123–33 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17816/RCF202123-133>
52. Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav*. 2007;90(1):54–8.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.08.026>
53. Serra EL, Medalha CC, Mattioli R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Braz J Med Biol Res*. 1999;32(12):1551–3.
<https://doi.org/10.1590/s0100-879x1999001200016>
54. Blaser RE, Chadwick L, McGinnis GC. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*. 2010;208(1):56–62.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.11.009>
55. Ward AJ, Duff AJ, Horsfall JS, Currie S. Scents and scents-ability: pollution disrupts chemical social recognition and shoaling in fish. *Proc Biol Sci*. 2008;275(1630):101–5.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1283>
56. Галстян ДС, Колесникова ТО, Косицын ЮМ, Забегалов КН, Губайдуллина МА, Маслов ГО и др. Моделирование социального поведения с использованием зебраданио (*Danio rerio*) в тестах социального взаимодействия, предпочтения, поведения в косяке и тесте на агрессию. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2022;20(2):135–47.
Galstyan DS, Kolesnikova TO, Kositsyn YuM, Zabe-galov KN, Gubaidullina MA, Maslov GO, et al. Studying social behavior in zebrafish (*Danio rerio*) in the tests of social interaction, social preference, behavior in the shoaling and aggression tasks. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2022;20(2):135–47 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17816/RCF202135-147>
57. Volgin AD, Bashirzade A, Amstislavskaya TG, Yakovlev OA, Demin KA, Ho YJ, et al. DARK classics in chemical neuroscience: arecoline. *ACS Chem Neurosci*. 2019;10(5):2176–85.
<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00711>
58. Галстян ДС, Колесникова ТО, Косицын ЮМ, Забегалов КН, Губайдуллина МА, Маслов ГО и др. Когнитивные тесты зебраданио (*Danio rerio*): Т- и Y-образные лабиринты. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2022;20(2):163–8.
Galstyan DS, Kolesnikova TO, Kositsyn YuM, Zabe-galov KN, Gubaidullina MA, Maslov GO, et al. Cognitive tests in zebrafish (*Danio rerio*): T- and Y-mazes. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2022;20(2):163–8 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17816/RCF202163-168>
59. Grossman L, Stewart A, Gaikwad S, Utterback E, Wu N, Dileo J, et al. Effects of piracetam on behavior and memory in adult zebrafish. *Brain Res Bull*. 2011;85(1–2):58–63.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.02.008>
60. Rajesh V, Mridhulmohan M, Jayaseelan S, Sivakumar P, Ganesan V. Mefenamic acid attenuates chronic alcohol induced cognitive impairment in zebrafish: possible role of cholinergic pathway. *Neurochem Res*. 2018;43(7):1392–404.
<https://doi.org/10.1007/s11064-018-2554-3>
61. de Castro MR, Lima JV, Salomão de Freitas DP, de Souza Valente R, Dummer NS, de Aguiar RB, et al. Behavioral and neurotoxic effects of arsenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*, Teleostei: Cyprinidae). *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol*. 2009;150(3):337–42.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.05.017>
62. Morash MG, Kirzinger MW, Achenbach JC, Venkatachalam AB, Cooper JP, Ratzlaff DE, et al. The contribution of larval zebrafish transcriptomics to chemical risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2023;138:105336.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2023.105336>
63. Колесникова ТО, Ильин НП, Котова ММ, Калуев АВ. Зебраданио как перспективная модель в трансляционной нейробиологии и биомедицине. *Успехи физиологических наук*. 2023;54(3):1–18.
Kolesnikova TO, Ilyin NP, Kotova MM, Kalueff AV. Zebrafish as a promising model in translational neurobiology and biomedicine. *Progress in Physiological Sciences*. 2023;54(3):1–18 (In Russ.).
64. Cachat J, Stewart A, Utterback E, Hart P, Gaikwad S, Wong K, et al. Three-dimensional neurophe-notyping of adult zebrafish behavior. *PLoS One*. 2011;6(3):e17597.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017597>
65. Branson K. Distinguishing seemingly indistinguishable animals with computer vision. *Nat Methods*. 2014;11(7):721–2.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3004>
66. Мирошникова ЕП, Косян ДБ, Аринжанов АЕ, Сизова ЕА, Калашников ВВ. О токсичности и прооксидантном эффекте наночастиц CeO₂ и SiO₂ (на модели *Danio rerio*). *Сельскохозяйственная биология*. 2016;51(6):921–8.

- Miroshnikova EP, Kosyan DB, Arinzhanov AE, Sizova EA, Kalashnikov VV. Assessment of general toxicity and prooxidant effects of CeO₂ and SiO₂ nanoparticles on *Danio rerio*. *Agricultural Biology*. 2016;51(6):921–8 (In Russ.).
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.6.921rus>
67. Jones LJ, Norton WH. Using zebrafish to uncover the genetic and neural basis of aggression, a frequent comorbid symptom of psychiatric disorders. *Behav Brain Res*. 2015;276:171–80.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.05.055>
 68. Purushothaman S, Saxena S, Meghah V, Meena Lakshmi MG, Singh SK, Brahmendra Swamy CV, et al. Proteomic and gene expression analysis of zebrafish brain undergoing continuous light/dark stress. *J Sleep Res*. 2015;24(4):458–65.
<https://doi.org/10.1111/jsr.12287>
 69. Pérez-Escudero A, Vicente-Page J, Hinz RC, Arganda S, De Polavieja GG. idTracker: tracking individuals in a group by automatic identification of unmarked animals. *Nat Methods*. 2014;11(7):743–8.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2994>
 70. Conklin EE, Lee KL, Schlabach SA, Woods IG. Video-Hacking: automated tracking and quantification of locomotor behavior with open source software and off-the-shelf video equipment. *J Undergrad Neurosci Educ*. 2015;13(3):A120–5. PMID: 26240518
 71. Stewart AM, Braubach O, Spitsbergen J, Gerlai R, Kalueff AV. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends Neurosci*. 2014;37(5):264–78.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.02.011>
 72. Saverino C, Gerlai R. The social zebrafish: behavioral responses to conspecific, heterospecific, and computer animated fish. *Behav Brain Res*. 2008;191(1):77–87.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.03.013>
 73. Love DR, Pichler FB, Dodd A, Copp BR, Greenwood DR. Technology for high-throughput screens: the present and future using zebrafish. *Curr Opin Biotechnol*. 2004;15(6):564–71.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.09.004>
 74. Stewart AM, Gerlai R, Kalueff AV. Developing high-throughput zebrafish screens for in-vivo CNS drug discovery. *Front Behav Neurosci*. 2015;9:14.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00014>
 75. Stewart AM, Grieco F, Tegelenbosch RA, Kyzar EJ, Nguyen M, Kaluyeva A, et al. A novel 3D method of locomotor analysis in adult zebrafish: Implications for automated detection of CNS drug-evoked phenotypes. *J Neurosci Methods*. 2015;255:66–74.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.07.023>
 76. Bali J, Garg R, Bali RT. Artificial intelligence (AI) in healthcare and biomedical research: Why a strong computational/AI bioethics framework is required? *Indian J Ophthalmol*. 2019;67(1):3–6.
https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_1292_18
 77. Bozhko DV, Myrov VO, Kolchanova SM, Polovian AI, Galumov GK, Demin KA, et al. Artificial intelligence-driven phenotyping of zebrafish psychoactive drug responses. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2022;112:110405.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110405>
 78. Biechele-Speziale D, Camarillo M, Martin NR, Biechele-Speziale J, Lein PJ, Plavicki JS. Assessing CaMPARI as new approach methodology for evaluating neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 2023;S0161-813X(23)00079-7.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2023.05.013>
 79. Glasauer SM, Neuhaus SC. Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Mol Genet Genomics*. 2014;289(6):1045–60.
<https://doi.org/10.1007/s00438-014-0889-2>
 80. Sato Y, Hashiguchi Y, Nishida M. Temporal pattern of loss/persistence of duplicate genes involved in signal transduction and metabolic pathways after teleost-specific genome duplication. *BMC Evol Biol*. 2009;9:127.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-127>
 81. Hoffman EJ, Turner KJ, Fernandez JM, Cifuentes D, Ghosh M, Ijaz S, et al. Estrogens suppress a behavioral phenotype in zebrafish mutants of the autism risk gene, CNTNAP2. *Neuron*. 2016;89(4):725–33.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.039>
 82. Schmid B, Hruscha A, Hogl S, Banzhaf-Strathmann J, Strecker K, van der Zee J, et al. Loss of ALS-associated TDP-43 in zebrafish causes muscle degeneration, vascular dysfunction, and reduced motor neuron axon outgrowth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(13):4986–91.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1218311110>
 83. de Abreu MS, Giacomini A, Genario R, Fontana BD, Parker MO, Marcon L, et al. Zebrafish models of impulsivity and impulse control disorders. *Eur J Neurosci*. 2020;52(10):4233–48.
<https://doi.org/10.1111/ejn.14893>
 84. Kulkarni P, Chaudhari GH, Sripuram V, Banote RK, Kirla KT, Sultana R, et al. Oral dosing in adult zebrafish: proof-of-concept using pharmacokinetics and pharmacological evaluation of carbamazepine. *Pharmacol Rep*. 2014;66(1):179–83.
<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2013.06.012>
 85. Nery LR, Eltz NS, Hackman C, Fonseca R, Altenhofen S, Guerra HN, et al. Brain intraventricular injection of amyloid-β in zebrafish embryo impairs cognition and increases tau phosphorylation, effects reversed by lithium. *PLoS One*. 2014;9(9):e105862.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105862>
 86. Parker MO, Millington ME, Combe FJ, Brennan CH. Development and implementation of a three-choice serial reaction time task for zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*. 2012;227(1):73–80.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.10.037>
 87. Fernandes Y, Tran S, Abraham E, Gerlai R. Embryonic alcohol exposure impairs associative learning performance in adult zebrafish. *Behav Brain Res*. 2014;265:181–7.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.02.035>
 88. Kalueff AV, Echevarria DJ, Homechaudhuri S, Stewart AM, Collier AD, Kaluyeva AA, et al. Zebrafish neurobehavioral phenomics for aquatic neuropharmacology and toxicology research. *Aquat Toxicol*. 2016;170:297–309.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.007>
 89. Panula P, Chen Y-C, Priyadarshini M, Kudo H, Semenova S, Sundvik M, et al. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems

- of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiol Dis.* 2010;40(1):46–57.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.010>
90. Wang Y, Li S, Liu W, Wang F, Hu L-F, Zhong ZM, et al. Vesicular monoamine transporter 2 (Vmat2) knock-down elicits anxiety-like behavior in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;470(4):792–7.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.079>
91. Cunliffe VT. Building a zebrafish toolkit for investigating the pathobiology of epilepsy and identifying new treatments for epileptic seizures. *J Neurosci Methods.* 2016;260:91–5.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.07.015>
92. Grone BP, Baraban SC. Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. *Nat Neurosci.* 2015;18(3):339–43.
<https://doi.org/10.1038/nn.3934>
93. Baraban SC, Dinday MT, Hortopan GA. Drug screening in Scn1a zebrafish mutant identifies clemizole as a potential Dravet syndrome treatment. *Nat Commun.* 2013;4:2410.
<https://doi.org/10.1038/ncomms3410>
94. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015;54(2):120–32. PMID: 25836957
95. Cassar S, Adatto I, Freeman JL, Gamse JT, Iturria I, Lawrence C, et al. Use of zebrafish in drug discovery toxicology. *Chem Res Toxicol.* 2020;33(1):95–118.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00335>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.В. Калуев – концептуализация и методология исследования, общее руководство проектом, написание и редактирование текста рукописи; М.М. Котова, А.Н. Икрин – методология исследования, написание и редактирование текста рукописи; Т.О. Колесникова – концептуализация и методология исследования, написание и редактирование текста рукописи.

Благодарности. Работа поддержана средствами Научно-технологического университета «Сириус» (субсидия Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-10-2021-093). Работа А.В. Калуева также финансово поддержана Санкт-Петербургским государственным университетом (проект № 93020614).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Allan V. Kalueff* conceptualised the study and developed the research methodology, managed the project, drafted and edited the manuscript. *Maria M. Kotova* and *Aleksey N. Ikrin* developed the research methodology, drafted and edited the manuscript. *Tatiana O. Kolesnikova* conceptualised the study and developed the research methodology, drafted and edited the manuscript.

Acknowledgements. The study was supported by the Sirius University of Science and Technology (subsidy from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Agreement No. 075-10-2021-093). A.V. Kalueff's work was also funded by St Petersburg State University (Project No. 93020614).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Калуев Алан Валерьевич, д-р биол. наук, профессор РАН

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7525-1950>
avkalueff@gmail.com

Котова Мария Михайловна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9287-1115>
kotova.maria522@yandex.ru

Икрин Алексей Николаевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5191-0974>
ikrin00@gmail.com

Колесникова Татьяна Олеговна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5561-8583>
philimontani@yandex.ru

Allan V. Kalueff, Dr. Sci. (Biol.), Professor of the RAS

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7525-1950>
avkalueff@gmail.com

Maria M. Kotova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9287-1115>
kotova.maria522@yandex.ru

Aleksey N. Ikrin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5191-0974>
ikrin00@gmail.com

Tatiana O. Kolesnikova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5561-8583>
philimontani@yandex.ru

Поступила 31.05.2023

После доработки 12.07.2023

Принята к публикации _____ 2023

Received 31 May 2023

Revised 12 July 2023

Accepted _____ 2023