

Статья принята в печать в журнал «Обзоры клинической фармакологии и лекарственной терапии» 20 ноября 2021 года, главным редактором, профессором, д.м.н. П.Д. Шабановым.

## Моделирование и оценка судорожной активности у зебраданио (*Danio rerio*)

2021 г. Д.С. Галстян<sup>1,2</sup>, Т.О. Колесникова<sup>3</sup>,  
Ю.М. Косицын<sup>1</sup>, К.Н. Забегалов<sup>3</sup>, М.А. Губайдуллина<sup>3</sup>, Г.О. Маслов<sup>3,5</sup>  
К.А. Демин<sup>1,3,4</sup>, А.В. Калуев<sup>1,3,4,5,6,7,8 \*</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова  
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия

<sup>4</sup>Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup>Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

<sup>6</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>7</sup>Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

<sup>8</sup>Московский физико-технический институт, Москва, Россия

\* [avkalueff@gmail.com](mailto:avkalueff@gmail.com)

Поступила в редакцию xx.xx.2021 г.

После доработки xx.xx.2021 г.

Принята к публикации xx.xx.2021 г.

### **Аннотация.**

Эпилепсия – распространенное неврологическое заболевание, которое имеет множество причин с невыясненными патофизиологическими механизмами. Эпилепсию, обычно изучаемую на грызунах, можно успешно моделировать и на зебраданио. Существуют эффективные фармакологические и генетические модели на зебраданио, чувствительные как к про-, так и к антиконвульсантным воздействиям, которые с большой вероятностью помогут расширить фундаментальные знания о механизмах патогенеза эпилепсии и развить терапию эпилепсии.

### **Abstract.**

Epilepsy is a common neurological disease that has many causes with unclear pathophysiological mechanisms. Epilepsy, commonly studied in rodents, can also be modeled in zebrafish. There are effective pharmacological and genetic models for zebrafish, sensitive to both pro and anticonvulsant effects. These aquatic models are likely to help expand the

fundamental knowledge about the mechanisms of epilepsy pathogenesis and develop epilepsy therapy.

**Ключевые слова:** зебраданио, эпилепсия, судороги, гиперактивность, стрихнин.

**Keywords:** zebrafish, epilepsy, seizures, hyperactivity, strychnine.

### **Введение: оценка судорожной активности**

Эпилепсия – распространенное неврологическое заболевание, которое имеет множество причин с невыясненными патофизиологическими механизмами (1). Патогенез эпилепсии основан на нарушении возбуждающей и тормозной активности нейронов. При генерализованной эпилепсии широко вовлечены эпилептогенные сети, включающие таламокортикальные структуры. При фокальной эпилепсии задействованы обычно лимбические или неокортикальные пути в одном полушарии. Припадки возникают в основном из-за аномальной активности корковых нейронов, хотя глиальные клетки и аксоны в белом веществе могут также участвовать в этом процессе. Вклад генетических факторов в патогенез эпилепсии также значителен. Часто эпилепсия сопровождается мутациями в генах, кодирующих ионные каналы; однако были обнаружены мутации и в других генах, например, нейрональных рецепторов, факторов транскрипции и ферментов.

Эпилепсию, обычно изучаемую на грызунах, можно смоделировать и на зебраданио. Например, поведенческие и физиологические реакции, подобные припадкам, вызывают у зебраданио различными экспериментальными манипуляциями. Электроэнцефалографические ответы при вызванной эпилепсии могут быть зарегистрированы как у мальков, так и у взрослых рыб, и помимо гиперактивности включают тремор, винтообразное и круговое плавание, которое как правило не наблюдается у обычных рыб. Повышенная экспрессия в мозге раннего протоонкогена *c-fos* является молекулярным маркером нейрональной активации и обычно повышается во время судорожных припадков как у грызунов, так и у зебраданио (2).

Более того, зебраданио чувствительны к химическим соединениям и генетическим мутациям, которые вызывают эпилепсию у людей и грызунов, что может послужить мощным инструментом при изучении различных нейрхимических и генетических аспектов эпилепсии (2). Кроме того, зебраданио имеют высокий потенциал для проведения массового скрининга различных проэпилептических и противоэпилептических препаратов. Существует большое количество моделей

эпилепсии на зебраданию - фармакологических, генетических и других. Далее приводится протокол модели эпилепсии под действием кофеина (3).

1. Животных ( $n = 12-15$  во всех экспериментальных и контрольной группе) индивидуально подвергают воздействию 250 мг/л (1.3 ммоль) кофеина в течении 20 мин в пластиковом контейнере объемом 3 л.
2. В контейнер с контрольной группой добавляют эквивалентный объем чистой воды без препарата.
3. Анализ поведения проводится в стандартном аппарате ТНА объемом 1.5 л, максимально заполненном свежей водой. Емкость аппарата также разделена на две равные горизонтальные части, предварительно обозначенные линией снаружи. Аквариумы для наблюдения важно располагать на ровной устойчивой поверхности.
4. Поведенческое тестирование лучше проводить с 11:00 до 16:00, чтобы уменьшить потенциальные вариации поведенческих и эндокринных реакций.
5. После предварительной подготовки животных аккуратно перемещают в аквариумы для наблюдения, где поведенческие характеристики анализируют в течение 6 мин вручную обученные наблюдатели, или же осуществляется видеозапись поведения с последующей обработкой при помощи специализированного программного обеспечения.
6. Если исследование предполагает дальнейший нейрохимический, эндокринный или нейрогенетический анализ экспериментальных животных, то производится процедура эвтаназии на следующий день после поведенческого анализа с последующим помещением биологического материала в морозильную камеру на  $-70^{\circ}\text{C}$  или же непосредственным началом экспериментальных процедур.

Поведенческие параметры, регистрируемые в модели эпилепсии у рыб, включают:

1. время, проведенное в верхней половине аппарата ТНА,
2. количество переходов наверх,
3. количество и продолжительность актов замирания более 2 с
4. эрратические движения (определялись как резкие хаотические движения с изменением направления и/или скорости)

Эпизоды гиперактивности (определялись как продолжительные ( $> 3$  с) периоды резких изменений направления и / или скорости, отличающиеся по продолжительности от беспорядочных движений),

5. спазмы (регистрировали как внезапные подергивания тела, которые могут приводить или не приводить к движению),

6. винтообразное и круговое плавание,
7. общее пройденное расстояние (м),
8. скорость (м / с) и повороты (°).

Показатели, связанные с эпилептоподобным состоянием, для экспериментальной и контрольной групп дополнительно оценивают с использованием характерных систем оценки. Во-первых, рыбам присваивают балл 1 или 0 для каждого эпилептического фенотипа (гиперактивность, судорога, винтообразное и круговое плавание) в зависимости от того, проявлялось ли конкретное поведение за 6 мин поведенческого анализа). Затем подсчитывают процент рыб, демонстрирующих соответствующий эпилептический фенотип. Кроме того, могут быть получены кумулятивные баллы по шкале от 0 до 4 для уникального поведения каждой рыбы (как сумма баллов с использованием системы 0 или 1, описанной выше).

Средние кумулятивные показатели приступов были рассчитаны для каждой экспериментальной группы и сравнивались с соответствующими контрольными показателями, обеспечивая количественный анализ степени выраженности приступов, аналогичный шкале Рэйцина, широко используемой в экспериментальных моделях эпилепсии на грызунах (4, 5). Кроме того, может быть использовано визуализация траектории исследуемого объекта в ТНА в программе для автоматического анализа поведения (EthoVision XT).

Рассмотрим примеры воздействия препаратов при моделировании эпилепсии на зебраданию (Табл. 1). Как правило, проконвульсанты вызывают судорожную активность у мальков и взрослых особей, которая варьирует от незначительного повышения локомоции до ярко-выраженных судорог и паралича. Например, проконвульсант 1,3,5-тринитропергидро1,3,5-триазин вызывает эпилептические реакции, включая гиперактивность, спазмы и винтообразное плавание (6). Вместе с тем, такие препараты также имеют некоторые различия в поведенческих эффектах. Например, пикротоксин и пентилентетразол вызывают генерализованные моторные судороги (3), тогда как каинат вызывает спазмы и клональные судороги (7). Антисудорожные препараты вызывают противоположный эффект. Например, антиконвульсант ваноксерин (GBR12909) снижает судорожную локомоторную активность, индуцированную пентилентетразолом (8). Аналогичные результаты показывает вальпроевая кислота (вальпроат), которая уменьшает интенсивность хаотичных судорожных движений (9).

**Таблица 1.** Примеры активности ряда препаратов в модели судорог зебраданию (6)

**Table 1.** Effects of selected drugs in zebrafish seizure models (6)

Препарат	Эффекты	Ссылки
Пентилентетразол	Генерализованные моторные судороги	(3)
Каинат	Клонусоподобные судороги, спазмы головного отдела	(7)
Стрихнин	Гиперактивность (резкие движения), спазмы, круговое плавание	(10)
1,3,5-тринитро-пергидро1,3,5-триазин	Гиперактивность, судороги, винтообразное плавание	(11)

### Генетические модели эпилепсии (по (11))

Генетические факторы играют важную роль в эпилепсии и их широко исследуют на моделях зебраданио, включая мутанты, демонстрирующие спонтанные припадки или гиперчувствительность к судорожным препаратам (Табл. 2). Например, мутация гена, кодирующего убиквитин E3 лигазу у мальков нарушает передачу сигналов Notch сигналинга в *mib<sup>hi904</sup>* мутантах зебраданио, что отражается на поведении, подобному припадкам, и подавлению активности генов, кодирующих участников ГАМК-ергической системы.

Другим примером являются мутанты зебраданио *Nav1.1* с нарушенным геном *scn1Lab* (который обычно кодирует потенциал-зависимые натриевые каналы). У людей мутации в *SCN1A* вызывают характерный синдром Драве с тяжелой умственной отсталостью, нарушением социального развития и лекарственно-устойчивыми припадками. Параллельно с клиническими данными, мутантные зебраданио «*scn1Lab*» обнаруживают сходный неврологический фенотип, включая спонтанную эпилептическую активность, гиперактивность и судороги. Зебраданио *scn1Lab* используют также для моделирования детской эпилепсии (и моногенных эпилептических расстройств в целом), эти мутанты также чувствительны к различным клинически используемым противоэпилептическим препаратам (например, кетогенной диете, диазепаму, вальпроату, бромиду калия, стирипентолу и клемизолу (12).

Ингибирование калиевых потенциал-зависимых каналов *KCNQ3* посредством антисмысловых морфолиноолигонуклеотидов влияет на регуляцию возбудимости центральных нейронов, вызывая судорожное поведение у свободно плавающих мальков зебраданио. Нокдаун гена предрасположенности к эпилепсии 1a (*lgila*) вызывает сходный эпилептический фенотип у мальков зебраданио, при этом мутанты с низкими дозами проявляют гиперчувствительность к припадкам пентилентетразола, а мутанты, получившие высокие дозы, гиперактивны и проявляют судорожную активность.

**Таблица 2.** Примеры генетических моделей эпилепсии зебраданио (по (6))

**Table 2.** Selected examples of genetic models of zebrafish epilepsy (6)

Гены	Эффекты нокдауна гена	Ссылка
<i>KCNQ3</i>	Судорожное поведение у личинок	(13)
<i>lgi1a</i>	Гиперчувствительность к проконвульсанту пентилентетразолу	(14)
<i>ube3a</i>	у личинок	(15, 16)
<i>gabrg2</i>	Судорожное поведение у личинок, снижение экспрессии ГАМК-ергических генов в мозге Судороги индуцируемые светом у личинок	(17)

### Заключение

Модели на животных - бесценный инструмент для изучения эпилепсии человека, и востребованность зебраданио в качестве модельного объекта в этой области быстро растет. В дополнение к генетическому и фармакологическому скринингу, картирование функциональных связей позволяет расшифровывать нейронные механизмы, участвующие в эпилептогенезе. Продолжающаяся интеграция и моделирование эпилептогенеза на различных видах важны для выяснения механизмов эпилепсии и ее лечения. Стратегические направления дальнейших исследований в этой области, изложенные выше, включают моделирование эпилепсии в поведенческом, генетическом и электрофизиологическом направлении; выявление новых биомаркеров эпилепсии; усиление скрининга препаратов и мутантов; и улучшение методик поведенческого выявления фенотипов, связанных с эпилепсией. Сегодня существуют эффективные фармакологические и генетические модели на зебраданио (Табл. 1-3), чувствительные как к про-, так и к антиконвульсантным воздействиям, которые с большой вероятностью помогут расширить фундаментальные знания о механизмах патогенеза эпилепсии и развить терапию эпилепсии.

**Таблица 3.** Модели судорог у взрослых зебраданио (по (11))

**Table 3.** Models of adult zebrafish seizures (11)

Тесты	Препараты
Анализ судорожного поведения	Каинат (инъекция) (18)

Анализ судорожного поведения, кортизола и <i>c-fos</i>	Кофеин, пентилентетразол, пикротоксин (экспозиция в растворе) (3)
Анализ судорожного поведения	Стрихнин (экспозиция в растворе) (11)
Регистрация потенциалов мозга	Пентилентетразол (экспозиция в растворе) (19)
Анализ судорожного поведения, кортизола и <i>c-fos</i>	1,3,5-Тринитропергидро-1,3,5-триазин (экспозиция в растворе) (6)

**Благодарности:** Работа поддержана Госзаданием (проект 73026081) Санкт-Петербургскому Государственному Университету.

## Литература

1. 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 research bulletin*. 2012;87(2-3):135-43.
2. Stewart AM, Braubach O, Spitsbergen J, Gerlai R, Kalueff AV. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends in neurosciences*. 2014;37(5):264-78.
3. Wong K, Stewart A, Gilder T, Wu N, Frank K, Gaikwad S, et al. Modeling seizure-related behavioral and endocrine phenotypes in adult zebrafish. *Brain Res*. 2010;1348:209-15.
4. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1972;32(3):281-94.
5. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: cortical areas. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1975;38(1):1-12.
6. Williams LR, Wong K, Stewart A, Suci C, Gaikwad S, Wu N, et al. Behavioral and physiological effects of RDX on adult zebrafish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2012;155(1):33-8.
7. Alfaro JM, Ripoll-Gomez J, Burgos JS. Kainate administered to adult zebrafish causes seizures similar to those in rodent models. *Eur J Neurosci*. 2011;33(7):1252-5.
8. Goldsmith P, Golder Z, Hunt J, Berghmans S, Jones D, Stables JP, et al. GBR12909 possesses anticonvulsant activity in zebrafish and rodent models of generalized epilepsy but cardiac ion channel effects limit its clinical utility. *Pharmacology*. 2007;79(4):250-8.
9. Lee Y, Kim D, Kim YH, Lee H, Lee CJ. Improvement of pentylentetrazol-induced learning deficits by valproic acid in the adult zebrafish. *Eur J Pharmacol*. 2010;643(2-3):225-31.
10. Hirata H, Saint-Amant L, Downes GB, Cui WW, Zhou W, Granato M, et al. Zebrafish bandoneon mutants display behavioral defects due to a mutation in the glycine receptor beta-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(23):8345-50.
11. 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.
12. 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.
13. Chege SW, Hortopan GA, M TD, Baraban SC. Expression and function of KCNQ channels in larval zebrafish. *Dev Neurobiol*. 2012;72(2):186-98.
14. Teng Y, Xie X, Walker S, Rempala G, Kozlowski DJ, Mumm JS, et al. Knockdown of zebrafish *Lgi1a* results in abnormal development, brain defects and a seizure-like behavioral phenotype. *Hum Mol Genet*. 2010;19(22):4409-20.
15. Hortopan GA, Baraban SC. Aberrant expression of genes necessary for neuronal development and notch signaling in an epileptic mind bomb zebrafish. *Developmental Dynamics*. 2011;240(8):1964-76.

16. Hortopan GA, Dinday MT, Baraban SC. Spontaneous seizures and altered gene expression in GABA signaling pathways in a mind bomb mutant zebrafish. *Journal of Neuroscience*. 2010;30(41):13718-28.
17. Liao M, Kundap U, Rosch RE, Burrows DRW, Meyer MP, Ouled Amar Bencheikh B, et al. Targeted knockout of GABA-A receptor gamma 2 subunit provokes transient light-induced reflex seizures in zebrafish larvae. *Dis Model Mech*. 2019;12(11).
18. Alfaro JM, Ripoll-Gómez J, Burgos JS. Kainate administered to adult zebrafish causes seizures similar to those in rodent models. *European Journal of Neuroscience*. 2011;33(7):1252-5.
19. Pineda R, Beattie CE, Hall CW. Recording the adult zebrafish cerebral field potential during pentylenetetrazole seizures. *J Neurosci Methods*. 2011;200(1):20-8.