

УДК 578.064

©Коллектив авторов

ЗЕБРАФИШ КАК МОДЕЛЬ В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Н.Ф. Беляева^{1}, В.Н. Каширцева¹, Н.В. Медведева¹, Ю.Ю. Худоклинова²,
О.М. Ипатова¹, А.И. Арчаков¹*

¹Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва, Погодинская ул., 10; тел.: (495) 246-43-56; эл. почта: natalia.belyaeva@ibmc.msk.ru
²ООО “Экобиофарм”

В настоящее время зебрафиш (*Danio rerio*) надежно утвердилась в качестве успешной модели для исследований во многих областях биологии и медицины. В обзоре мы рассматриваем некоторые достижения в использовании зебрафиш при создании новых лекарств и моделировании болезней человека. Модель зебрафиш наиболее эффективна на ранних этапах разработки лекарственных препаратов для обнаружения их эффективности и токсичности до того как будут использованы более дорогие модели млекопитающих. В обзоре приведены примеры известных соединений, обладающих как физиологической активностью, так и токсичностью для людей и зебрафиш. Основными преимуществами эмбрионов зебрафиш является то, что они легко проницаемы для небольших молекул, добавленных непосредственно в инкубационную среду, а прозрачный хорион позволяет легко наблюдать за развитием. Исследование острой токсичности (определение LC_{50}) на эмбрионах, может также включать выявление отклонений в развитии (тератогенность). Модель зебрафиш используется нами для определения токсичности разрабатываемых новых форм лекарственных препаратов (в частности, доксорубина) на основе фосфолипидных наночастиц. Организация генома и пути, контролирующие передачу сигналов, по-видимому, в высокой степени консервативны у зебрафиш и человека, что позволяет использовать зебрафиш для моделирования болезней человека, некоторые примеры которых проиллюстрированы в обзоре.

Ключевые слова: зебрафиш (*Danio rerio*), разработка лекарств, острая токсичность, тератогенность, апоптоз, рак.

ВВЕДЕНИЕ. Биомедицинские исследования, направленные на понимание патогенеза заболеваний человека на клеточном и молекулярном уровне и создание новых терапевтических средств, основаны на использовании различных моделей животных. Зебрафиш (*Danio rerio*) – маленькая (размером до 4,5 см) пресноводная тропическая рыбка, обитающая в Индии и Южной Азии и хорошо известная любителям аквариумных рыб. Традиционно эту рыбку использовали в исследованиях в области молекулярной генетики и биологии развития, однако в последнее время она становится привлекательной в работах по созданию новых лекарственных препаратов и моделировании различных физиологических и патологических процессов [1-6].

Эмбрион зебрафиш развивается быстро. Уже через три дня после оплодотворения у него функционирует сердце, кровеносная и нервная системы. Через четыре дня появляются личинки (мальки), способные есть и плавать. Эпителиальные клетки кишечника выделяют пищеварительные ферменты, гепатоциты секретируют желчь, панкреатические клетки продуцируют инсулин и карбоксипептидазы. Так как эмбрионы прозрачны, за их развитием можно наблюдать визуально с помощью микроскопа. Эмбрионы зебрафиш легко поглощают низкомолекулярные соединения из воды через кожу и жабры, а после 7 суток развития поглощение происходит через рот (а не через кожу) [7].

Срок жизни полосатого *Danio* 3-5 лет.

* - адресат для переписки

1. Токсикологические исследования и разработка новых лекарственных препаратов.

Как взрослые особи, так и эмбрионы зебрафиш используют для определения острой токсичности различных соединений (включая тяжёлые металлы, пестициды и множество других соединений, загрязняющих окружающую среду). При этом определяется летальная концентрация для 50% популяции (LC_{50}). Аналогичный подход может быть использован и для скрининга острой токсичности лекарственных препаратов. Для проведения тестов на токсичность описаны стандартные методы, рекомендованные Международной организацией стандартизации (International Standardization Organization (ISO) [8], Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) [9], the U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), the American Society for Testing and Materials (ASTM) и другими организациями. Страны ЕС в основном используют методы, предложенные ISO. Стандарты по определению острой токсичности, разработанные ISO, очень близки к рекомендациям OECD [10]. Подобно международным рекомендациям для определения острой токсичности на взрослых рыбках разработаны методы оценки острой токсичности на эмбрионах [11-14]. При исследовании острой токсичности с использованием зебрафиш учитывается только концентрация тестируемого вещества в воде, а точное количество поглощённого соединения не определяется. Абсорбция, распределение, метаболизм и экскреция веществ на модели зебрафиш только начинают исследоваться [5, 15] и, вероятнее всего, эти параметры отличаются от аналогичных у млекопитающих. Тем не менее, определение LC_{50} для зебрафиш помогает в исследовании токсических эффектов потенциальных лекарственных препаратов у млекопитающих [2]. В исследованиях Pang и соавторов [16] проведено сравнение величин LC_{50} для 18 химических соединений (включающих лекарственные препараты) на эмбрионах зебрафиш и грызунах (рис. 1). В этой работе значения LC_{50} для эмбрионов зебрафиш выражали в мг на л раствора, а для млекопитающих – в мг на кг веса животного (LD_{50}). В результате такого сравнения был сделан вывод о том, что эмбрионы зебрафиш более чувствительны к токсическому действию, чем млекопитающие.

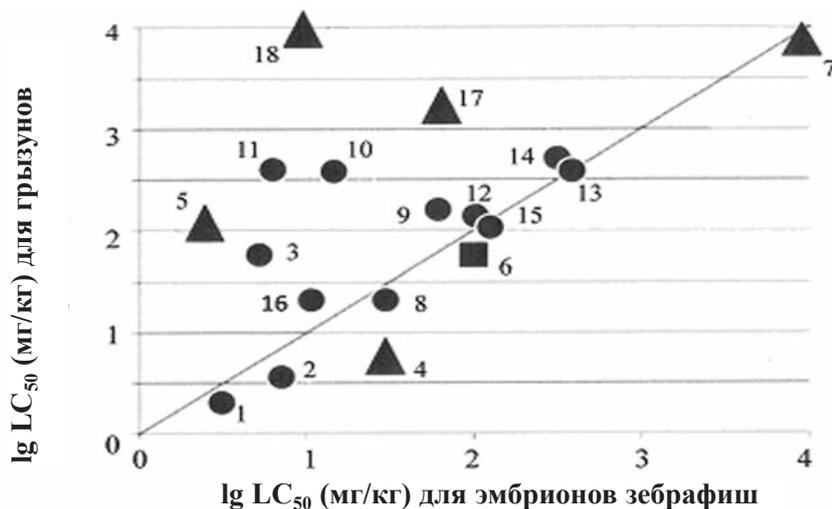


Рисунок 1.

Сравнение токсичности некоторых соединений для эмбрионов зебрафиш и млекопитающих (по [2] с изменениями).

Протестированные соединения: (1) гелданамицин; (2) дидемнин В; (3) мербарон; (4) пептид Фуджисава; (5) тертиофен; (6) 4-ипоменол; (7) этанол; (8) доксорубицин; (9) циклоспорин А; (10) напрофен; (11) ибупрофен; (12) аспирин; (13) дексаметазон; (14) ацетаминофен; (15) кофеин; (16) такрин; (17) дихлоруксусная кислота; (18) дифенилполихлорины.

Каждому значению величины $lg LC_{50}$ (мг/л) для зебрафиш соответствует значение $lg LC_{50}$ (мг/кг) для грызунов: для мышей (кружки), крыс (треугольники) и кроликов (квадрат). Прямая линия отображает точное совпадение обоих значений.

Поскольку эмбрионы зебрафиш развиваются вне материнского организма и прозрачны, они представляют собой идеальную модель для скрининга лекарств на тератогенность. С использованием этой модели проводится изучение механизмов тератогенного действия этанола, которое у людей может проявляться как фетальный алкогольный синдром [17-19]. В недавних исследованиях для обоснования использования зебрафиш в качестве предсказательной модели для оценки эмбриотоксичности и безопасности применения лекарств, протестированы 12 соединений, для которых определяли значения LC_{50} , а также (используя протокол визуальной оценки) отклонения в развитии эмбрионов *Danio rerio* [20]. Результаты сравнивали с тератогенностью этих соединений в исследованиях на млекопитающих. При идентификации нетератогенных соединений совпадение наблюдалось в 75% случаев, а для тератогенных - в 100% случаев [6].

При разработке новых лекарств, предсказание токсичности является решающим звеном, так как из-за неприемлемо высокой токсичности клинические испытания обречены на провал. По мнению A.L. Rubinstein [1], оценить предсказательность исследований разрабатываемых лекарственных препаратов на модели зебрафиш можно лишь тогда, когда они будут включены в программу доклинических испытаний на токсичность и появятся результаты по тестированию большого количества соединений.

Национальный Институт Здоровья в США активно поддерживает исследования, проводимые на зебрафиш в качестве альтернативной модели позвоночных [16]. Эта модель, благодаря всесторонним клеточным, молекулярным и генетическим подходам может способствовать созданию новых лекарств и выяснению механизмов многих болезней человека.

Процесс развития сосудов у позвоночных консервативен [21] и эмбрионы зебрафиш успешно используются в качестве модели позвоночных для скрининга лекарств, влияющих на ангиогенез. Известно, что усиленный ангиогенез необходим для роста и метастазирования опухоли. Препараты, обладающие антиангиогенной активностью, уже используются при лечении рака и больше 40 лекарственных субстанций, обладающих в той или иной степени выраженной антиангиогенной активностью, находятся в США на стадии клинических испытаний в качестве противораковых средств [22]. С другой стороны, стимуляторы ангиогенеза важны при лечении регенерирующих тканей. Использование эмбрионов зебрафиш позволяет проводить скрининг лекарственных препаратов на живом организме. Сосуды эмбриона могут быть прокрашены и визуализированы под микроскопом. Визуализировать сосудистую систему можно с помощью специфических флуоресцирующих микросфер, которые не проникают внутрь сосудов, но связываются с их поверхностью [23]. Помимо этого, для исследования ангиогенеза используют трансгенных рыбок с экспрессированным зелёным флуоресцентным белком кораллового рифа [2, 24, 25].

Взрослых особей зебрафиш и эмбрионы используют для определения как общей токсичности, так и специфической токсичности по отношению к различным органам и тканям [6, 26-28]. Данные по органотоксичности различных соединений, протестированных на эмбрионах зебрафиш, суммированы в недавно вышедшем обзоре Каги и соавторов [2] и представлены в таблице 1. Эти результаты свидетельствуют о том, что в действие лекарств на различные органы у зебрафиш и млекопитающих есть много общего.

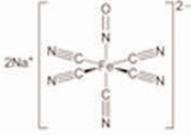
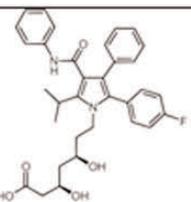
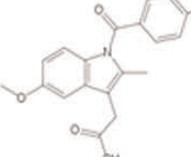
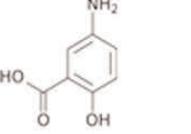
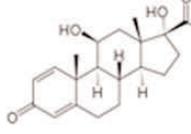
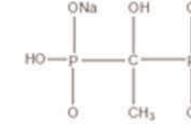
Следует сказать, что большинство генов человека имеют гомологи у зебрафиш, а функциональные домены белков, такие, например, как АТР-связывающие домены киназ, имеют 100% идентичность. Поскольку связывание лекарств часто происходит на функциональных доменах, использование модели зебрафиш для исследования действия лекарств на человека является вполне обоснованным [29]. В таблице 2 приведены примеры известных лекарств, относящихся к разным фармакологическим группам, действие которых на человека и зебрафиш эквивалентны [30]. Показано также, что лекарственные препараты, которые вызывают у людей удлинение интервала QT, вызывали брадикардию и AV-блокаду у зебрафиш [31].

ЗЕБРАФИШ - МОДЕЛЬ В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Таблица 1. Токсическое действие различных лекарственных препаратов на зебрафиш (по [21] с изменениями).

Препарат	Фармакологическая активность	Концентрация	Наблюдаемый эффект/токсичность
Камптоцетин	Противораковый агент (ингибитор топоизомеразы I)	500 нМ	Задержка роста
Гентамицин Неомицин Цисплатин Винбластин Хинин	Антибиотик Антибиотик Противораковый агент Противоопухолевое средство растительного происхождения Противомалярийное средство	5 мкМ 10 мкМ 50 мкМ 100 мкМ 200 мкМ	Потери волосковых клеток
Доксорубин	Противораковое средство (антибиотик из группы антрациклинов, ингибитор топоизомеразы II)	30 мг/л	Тератогенность, нефротоксичность, гепатотоксичность, кардиотоксичность
Дексаметазон	Кортикостероид	324 мг/л	Нефротоксичность, гепатотоксичность, поражение желудочно-кишечного тракта
Метотрексат	Цитостатик из группы антиметаболитов (антагонист фолиевой кислоты)	454 мг/л	Тератогенность, нефротоксичность, гепатотоксичность, поражение желудочно-кишечного тракта
Фторурацил	Цитостатик из группы антиметаболитов	3,3 мг/л	Нефротоксичность, гепатотоксичность
Циклоспорин А	Иммуносупрессор	69 мг/л	Тератогенность, нефротоксичность, гепатотоксичность, кардиотоксичность
Кофеин	Алкалоид из группы метилксантинов (ингибитор фосфодиэстеразы), стимулятор ЦНС	108 мг/л	Изменение моторной активности, спастичность мышц

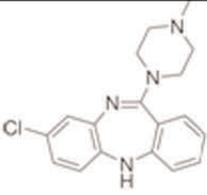
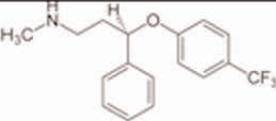
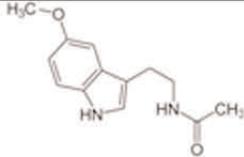
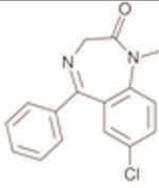
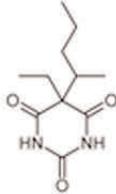
Таблица 2. Действие некоторых известных лекарств на зебрафиш (по [30] с изменениями и дополнениями).

Лекарственный препарат	Структурная формула	Наблюдаемое действие
Нитропруссид натрия (активатор растворимой гуанилатциклазы)		Периферическая вазодилатация
Аторвастатин (ингибитор гидрокси-метилглутарил-КоА-редуктазы)		Снижение синтеза холестерина
Индометацин (ингибитор циклооксигеназы)		Ингибирование синтеза простагландинов, снижение агрегации тромбоцитов
5-аминосалициловая кислота (ингибитор циклооксигеназы)		Противовоспалительное действие
Преднизолон (синтетический глюкокортикоид)		Противовоспалительное действие
Этидронат		Противоостеопорозное действие

Ряд авторов [32-35] исследовали эффект седативных соединений на двигательную активность зебрафиш. Эти данные, суммированные в обзоре Vargas и соавторов [36], свидетельствуют о применимости данной модели для тестирования действия лекарств на локомоторную активность (см. табл. 3).

ЗЕБРАФИШ - МОДЕЛЬ В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Таблица 3. Действие некоторых седативных веществ на локомоторную активность личинок зебрафиш (по [36] с изменениями и дополнениями).

Концентрация лекарственного препарата (мкМ)	Структурная формула	Действие на человека	Действие на зебрафиш
клозапин (12,5-50)		седативное	седативное
флуоксетин (4,6)		седативное	седативное
мелатонин (0,01-100)		седативное	седативное
Диазепам (0,01-100)		седативное	седативное
Пентобарбитал (0,01-100)		седативное	седативное
этанол (1-2%) (4%)	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{OH}$	стимулирующее/ седативное	стимулирующее/ седативное

Heiden и соавторы [37] использовали эмбрионы зебрафиш для определения токсичности полиамидамин (ПАМАМ) - дендримеров и их конъюгатов с RGD-пептидом. Исследование острой и подострой токсичности различных дендримеров показано, что наименьшую токсичность проявляют G3.5 дендримеры, конъюгированные с RGD-пептидом. Авторы считают, что эта модель идеальна для определения токсичности новых нанотерапевтических средств.

В 2007 году были опубликованы результаты исследования транспорта и накопления наночастиц серебра на ранних стадиях развития эмбрионов зебрафиш [38]. Уникальные оптические свойства наночастиц серебра позволяют

наблюдать их внутри развивающегося эмбриона в реальном времени. Оказалось, что транспорт наночастиц Ag размером от 5 до 46 нм осуществляется путём пассивной диффузии через поровые каналы хориона, диаметр которых составляет 0,5-0,7 мкм. В концентрации до 0,08 нМ наночастицы серебра не оказывают токсического действия на развивающийся эмбрион. При повышении концентрации наночастиц до 0,19 нМ нормально развивающихся эмбрионов обнаружено не было. Выявлены следующие нарушения в развитии: дефект плавника, искривление хвоста, отеки в области сердца, головы и желточного мешка, а также нарушения в развитии глаз.

В лаборатории нанолечарств Института биомедицинской химии РАН модель зебрафиш используется для определения токсичности разрабатываемых новых форм лекарственных препаратов на основе фосфолипидных наночастиц.

Доксорубин относится к группе антрациклиновых антибиотиков и в настоящее время используется в качестве цитостатика при лечении различных злокачественных новообразований. Высокая токсичность этого препарата накладывает большие ограничения на его применение. Исследования многих лабораторий направлены на создание лекарственных форм доксорубина, обладающих большей эффективностью и меньшей токсичностью.

Ниже приведены результаты наших исследований по эмбриотоксичности доксорубина. По сравнению с нормально развивающимися эмбрионами (рис. 2А) у эмбрионов, развивавшихся в присутствии доксорубина (в концентрации от 0,08 до 0,2 мг/мл), наблюдались различные нарушения: искривление хвоста (рис. 2Б); отёк в области головы и сердца (рис. 2В) с урежением сердечных сокращений (вплоть до остановки сердца); а при высоких концентрациях – отёк желточного мешка (рис. 2Г) и нарушение двигательной активности. Отметим, что при повышении концентрации доксорубина число нарушений в развитии индивидуальной особи возрастало. Подобное накопление дефектов развития зебрафиш наблюдали и при увеличении концентрации наночастиц серебра [38].

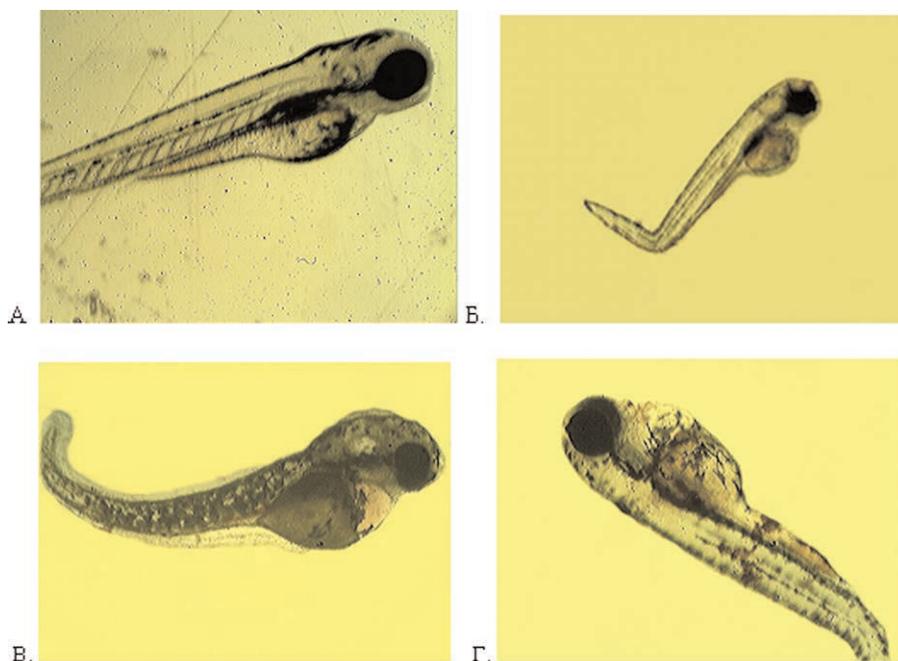


Рисунок 2.

Эмбриотоксическое действие доксорубина.

А – нормально развившийся эбрион зебрафиш на стадии 72 часов после оплодотворения;
Б – Г эмбрионы зебрафиш, развивавшиеся в присутствии различных концентраций доксорубина: Б - доксорубин - 0,08 мг/мл (искривление хвоста); В – доксорубин – 0,1 мг/мл (искривление хвоста, отек в области головы и сердца); Г – доксорубин – 0,2 мг/мл (искривление хвоста, сильный отёк в области сердца и желточного мешка).

Протеомный подход, используемый для анализа белкового состава клеток органов или целых организмов в данный конкретный момент времени, даёт возможность регистрации токсических эффектов на молекулярном уровне. Изменение белкового состава после воздействия токсикантов позволяет обнаружить новые диагностические биомаркеры токсического стресса. Поэтому протеомный подход с использованием эмбрионов зебрафиш может дать ранний и более чувствительный метод анализа токсичности. Так, Gundel и соавторы [39] показали, что продукты расщепления вителлогенинов, являющихся основными белками желтка, могут служить индикаторами токсического стресса у эмбрионов зебрафиш.

Ферменты, участвующие в метаболизме ксенобиотиков у зебрафиш, охарактеризованы не достаточно полно. Проводятся сравнительные исследования регуляции CYP3A, метаболизирующего до 50% всех лекарственных препаратов у человека и зебрафиш [40]. Показано, что в присутствии дексаметазона у зебрафиш происходит индукция CYP3A4, подобно тому, как это имеет место у человека [41]. Картирован целый ряд ферментов семейства цитохромов P450, но полная последовательность сДНК установлена только для *cyp19a*, *cyp19b*, *cyp26b* и *cyp3A65* [1, 40]. Накопление и выведение ксенобиотиков из клетки регулируется белками семейств ABC транспортеров, которые высоко активны в раковых клетках и определяют развитие резистентности к лекарствам, являющееся одной из серьезных проблем противоопухолевой терапии. В геноме зебрафиш идентифицирован 41 ABC транспортер [42].

В настоящее время зебрафиш используется в различных фармакологических исследованиях, таких как скрининг и изучение механизма действия биологически активных соединений, фармакогеномика и токсикогеномика.

2. Использование зебрафиш для моделирования болезней человека.

Этот подход основывается на знаниях механизма патогенеза и затрагивает болезни крови, мышечную дистрофию, нейродегенеративные заболевания, диабет, нарушения липидного обмена, неоплазию, болезни иммунной системы [2]. Ни одна из экспериментальных моделей болезней человека не является совершенной [3]. Для моделирования болезней человека на зебрафиш применяются различные подходы. Одним из них является использование химических соединений, вызывающих появление симптомов, характерных для того или иного заболевания. Так, например, нейротоксин - 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин, применяли для моделирования паркинсонизма у зебрафиш, так как механизм действия этого соединения, связанный с разрушением кластеров дофаминергических нейронов, у зебрафиш и млекопитающих один и тот же [43].

Одним из примеров *метаболических моделей*, может служить исследование обмена глюкозы. В регуляции метаболизма глюкозы инсулином у зебрафиш и млекопитающих есть много общего. Основные белки – участники инсулинсигнальной системы, по-видимому, структурно и функционально близки к таковым у млекопитающих [44]. Показано, что чувствительность взрослых особей зебрафиш к действию антидиабетических препаратов подобна таковой у млекопитающих. В регуляции экспрессии фосфоенолпируваткарбоккиназы, фермента, катализирующего одну из ключевых стадий глюконеогенеза, транскрипция которого контролируется глюкагоном и инсулином, у зебрафиш и млекопитающих есть много общего. Предлагается использовать изменения в экспрессии этого фермента в качестве маркера при изучении действия антидиабетических препаратов [45].

Зебрафиш используется и как модельная система для исследования механизмов апоптоза, знание которых необходимо для лечения онкологических и дегенеративных заболеваний [46, 47]. Индукция апоптоза является важным механизмом эффективной противоопухолевой терапии [48]. Установлено, что процесс апоптоза у зебрафиш и млекопитающих имеет много общего [49]. Так у зебрафиш идентифицировано большинство генов, связанных с апоптозом,

семь каспаз (каспазы-2, -3, -4, -6, -8, -9, -13), четыре ингибитора апоптоза, 10 участвующих в процессе апоптоза киназ, факторы транскрипции и многие другие молекулы, связанные с гибелью клетки [16, 49]. Для идентификации гибнущих клеток используются различные методы, в том числе, прижизненное окрашивание акридиновым оранжевым; иммунологический метод выявления активированной каспазы-3; а также окрашивание трипановым синим для выявления целостности клеточной мембраны.

Генетические подходы, применяемые для создания моделей на основе зебрафиш, включают использование химического мутагенеза с идентификацией стабильных мутаций, а также специфической инактивации генов, участвующих в генезе определённых заболеваний. Примеры таких генов приведены в таблице 4 [50].

Таблица 4. Примеры генов, связанных с болезнями человека, идентифицированные у зебрафиш (по [50] с изменениями).

Болезнь	Гены
Болезнь Альцгеймера	Пресенилин-1 Пресенилин-2 Ацетилхолинэстераза Белок предшественник амилоида <i>apoE</i>
Боковой амиотрофический склероз	<i>Sod-1</i>
Мышечная дистрофия	Дистрогликан Дистрофин <i>Dp71</i>
Лейкемия	<i>Runx1</i> <i>Cbfb</i>
Тромбоз	Фактор VII <i>COX-1</i> <i>COX-2</i> (<i>COX</i> – циклооксигеназа)
Кардиомиопатия	Сердечный тропонин T Титин (TTN)
Диабет	Инсулин IA-2 аутоантиген IA-2 β аутоантиген (IA-островковый антиген)

3. Модели злокачественной трансформации.

3.1 Химический канцерогенез.

Возможность использования *Danio rerio* для изучения канцерогенной активности химических соединений обусловлена их высокой чувствительностью к канцерогенным агентам, а также относительно быстрым получением ответа.

Существуют мутантные линии зебрафиш, у которых развитие опухоли происходит в 70-90% случаев в течение 6-12 месяцев после обработки канцерогеном [51]. Химический канцерогенез с использованием этилнитрозомочевины позволил получить линию зебрафиш с мутацией гена опухолевого супрессора (*p53*). У этих мутантных рыб через 8,5 месяцев развиваются опухоли периферических нервов. Мутация другого опухолевого супрессора (APC) приводит к развитию у взрослых гетерозигот неоплазии кишечника, печени и поджелудочной железы. Злокачественные опухоли, индуцированные химическими канцерогенами, могут быть трансплантированы клонированным зебрафиш [52]. Помимо аутологических опухолевых моделей возможна также ксенотрансплантация опухолевых клеток человека эмбрионам зебрафиш.

3.2 Трансгенные модели неоплазии.

Ряд опухолей человека смоделирован на зебрафиш путем трансгенеза, что подтверждает тот факт, что молекулярные механизмы, лежащие в основе развития злокачественных опухолей млекопитающих и человека, применимы и к зебрафиш. Так, у трансгенных зебрафиш, экспрессирующих *BRAF* онкоген человека, образуется пигментный невус, а при инактивации опухолевого супрессора *p53* развивается меланома. [53]. Созданы модели трансгенных зебрафиш для исследования разных форм лейкемии [2, 54].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В настоящее время более 400 лабораторий во всём мире использует зебрафиш в фундаментальных и прикладных исследованиях (<http://zfish.org>, [55]). Относительно невысокая, по сравнению с экспериментами на млекопитающих, стоимость работ позволяет использовать зебрафиш в качестве недорогой альтернативы тест-системам на грызунах. Этот объект уникален в отношении уровня достигнутых знаний, технологий и экспериментальных подходов. Постоянно растущий интерес к моделям, использующим зебрафиш, позволяет совершенствовать понимание патогенеза заболеваний и в конечном итоге может способствовать созданию новых эффективных лекарственных препаратов.

Основываясь на имеющихся в литературе данные можно сделать заключение о том, что модель зебрафиш не заменяет классические модели млекопитающих, а может служить первой ступенью при разработке лекарств и моделировании болезней человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rubinstein A.L. (2006) Expert Opin. Drug Metabol. Toxicol., **2**, 231-240
2. Kari G., Rodeck U., Dicker A.P. (2007) Clin. Pharmacol. Therapet., **82**, 70-80.
3. Lieschke G.J., Currie P.D. (2007) Nature Reviews| Genetics, **8**, 353-367.
4. Crawford A.D., Esguerra C.V., de Witte P.A.M. (2008) Planta Med., **74**, 624-632.
5. Berghmans S., Butler P., Goldsmith P., Waldron G., Gardner I., Golder Z., Richards F.M., Kimber G., Roach A., Alderton W., Fleming A. (2008) J. Pharmacol. Toxicol. Methods, **58**, 59-68.
6. McGrath P., Li Chun-Q. (2008) Drug Discov. Today, **13**, 394-401.
7. Langheinrich U. (2003) Bioassays, **25**, 904-912.
8. ISO 7346-1:1996.
9. OECD (1992) Test Guideline 203. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Fish, Acute Toxicity Test.
10. Vosylieniė Z. (2007) Acta Zoolog. Lituanica, **17**, 3-15.
11. Braunbeck T., Böttcher M., Holler H., Kosmeh T., Lammer E., Leist E., Rudolf M., Seitz N. (2005) ALTEX, **22**, 87-102.
12. Nagel R. (2002) ALTEX, **19**, 38-48.
13. Braunbeck T., Lammer E. (2006) Background Paper on Fish Embryo Toxicity Assays (UBA Contract Number 20385422) GERMAN FEDERAL ENVIRONMENT AGENCY, Dessau, Germany.

14. OECD (2006) Guideline for Testing of Chemicals. DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE. Fish Embryo Toxicity (FET) Test.
15. Scholz S., Fischer S., Gündel U., Küster E., Luckenbach T., Voelker D. (2008) *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **15**, 394-404.
16. Parng C., Wen Lin Seng, Semino C., McGrath P. (2002) *Assay and Drug Develop. Technol.*, **1**, 1-8.
17. Tanguay R.L. (2006) *Neurotoxicol. and Teratol.*, **28**, 497-508.
18. Arenzana F.J., Carvan M.J., Aijón J., Sánchez-González R., Arévalo R., Porteros A. (2006) *Neurotoxicol. and Teratol.*, **28**, 342-348.
19. Carvan M.J., Loucksa E., Weberb D.N., Williams F.E. (2004) *Neurotoxicol. and Teratol.*, **26** 757-768.
20. Seng W.L. (2007) *Toxicologist*, **96**(Suppl.), 145.
21. Zon L., Peterson R.T. (2005) *Nature. Rev. Drug Discov.*, **4**, 35-44.
22. Folkman J. (2007) *Nature Rev. Drug Discov.*, **6**, 273-286.
23. Serbedzija G. N. (1999) *Angiogenesis*, **3**, 353-359.
24. Kidd K.R., Weinstein B.M. (2003) *British J. Pharmacol.*, **140**, 585-594.
25. Cross L.M., Cook M.A., Lin S., Chen J.N., Rubinstein A.L. (2003) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**, 911-912.
26. Langheinrich U., Hennen E., Stot G., Vacun G. (2002) *Curr. Biol.*, **12**, 2023-2028.
27. Ton C., Parng C. (2005) *Hear. Res.*, **208**, 79-88.
28. Zhang C., Willett C., Fremgen T. (2003) *Curr. Protoc. Toxicol.*, 1.7.1-1.7.18.
29. Chaoyong M.A. (2004) *Amer. Chem. Soc. Modern Drug Discovery*, 30-36.
30. Goldsmith P. (2004) *Curr. Opinion in Pharmacol.*, **4**, 504-512.
31. Mlan D.J., Peterson T.A., Ruskin J.N., Peterson R.T., MacRae C.A. (2003) *Circulation*, **107**, 1355-1358.
32. Boehmler W., Carr T., Thisse C., Thisse B., Canfield V.A., Levenson R. (2007) *Genes Brain Behav.*, **6**, 155-166.
33. Airhart M.J., Lee D.H., Wilson T.D., Miller B.E., Miller M.N., Skalko R.G. (2007) *Neurotoxicol. Teratol.*, **29**, 652-664.
34. Zhdanova I.V., Wang S.Y., Leclair O.U., Danilova N.P. (2001) *Brain Res.*, **903**, 263-268.
35. Lockwood B., Bjerke S., Kobayashi K., Guo S. (2004) *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **77**, 647-654.
36. Barros T.P., Alderton I W.K., Reynolds H. M., Roach A.G., Berghmans S. (2008) *British J. Pharmacol.*, 1400-1413.
37. Heiden T.C., Dengler E., Kao W.J., Heideman W., Peterson R.E. (2007) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **225**, 70-79.
38. Lee K.J., Nallathamby P.D., Browning L.M., Osgood C.J., Xu X.N. (2007) *ACS NANO*, **1**, 133-144.
39. Gundel U., Benndorf D., von Bergen M., Altenburger R., Kuster E. (2007) *Proteomics*, **7**, 4541-4554.
40. Tseng H.P., Hseu T.H., Buhler D.R., Wang W.D., Hu C.H. (2005) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **205**, 247-258.
41. Li C.Q. (2008). *Toxicologist*, **97**(Suppl.), 148.
42. Dean M., Annilo T. (2005) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **6**, 123-142.
43. Lam C.S., Korz H.V., Strahl E.U. (2005) *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 1758-1762.
44. Gerhard G.S. (2003) *Experimen. Gerontol.*, **38**, 1333-1341.
45. Elo B., Villano C.M., Govorco D., White L.A. (2007) *J. Mol. Endocrinol.*, **38**, 433-440.
46. Pyati U.J., Look A.T., Hammerschmidt M. (2007) *Seminars in Cancer Biol.*, **17**, 154-165.
47. Silva M.T., Vale A., dos Santos N.M.S. (2008) *Curr. Pharmac. Design*, **14**, 170-183.
48. Meng X.W., Lee S.H., Kaufmann S.H. (2006) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **18**, 668-676.
49. dos Santos N.M.S., do Vale A., Reis M.I.R., Silva M.T. (2008) *Curr. Pharmaceut. Design*, **14**, 148-169.
50. Rubinstein A.L. (2003) *Curr. Opinion in Drug Discov. Develop.*, **6**, 218-223.

ЗЕБРАФИШ - МОДЕЛЬ В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

51. *Spitsbergen J.M., Kent M.L.* (2003). *Toxicol. Pathol.*, **31** (Suppl), 62–87.
52. *Mizgirev I.V., Revskoy S.Y.* (2006) *Cancer Res.*, **66**, 3120-3125.
53. *Patton E.E., Widlund H.R., Kutok J.L., Kopani K.R., Amatruda J.F., Murphey R.D., Berghmans S., Mayhall E.A., Traver D., Fletcher C.D., Aster J.C., Granter S.R., Look A.T., Lee C., Fisher D.E., Zon L.I.* (2005) *Curr. Biol.*, **15**, 249–254.
54. *Meeker N.D., Trede N.S.* (2008) *Develop. Compar. Immunol.*, **32**, 745-757.
55. <http://zfish.org>.

Поступила: 13. 04. 2009.

ZEBRAFISH AS A MODEL SYSTEM FOR BIOMEDICAL STUDIES

*N.F. Belyaeva¹, V.N. Kashirtseva¹, N.V. Medvedeva¹, Yu.Yu. Khudoklina²,
O.M. Ipatova¹, A.I. Archakov¹*

¹Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya 10, Moscow, 119121 Russia; tel. (495) 246-43-56;
e-mail: natalia.belyaeva@ibmc.msk.ru

²LLC “EcoBioPharm”, Moscow, Russia

Zebrafish (*Danio rerio*) are now firmly established as a powerful research model for many areas of biology and medicine. Here, we review some achievements of zebrafish - based assays for modeling human diseases and for drug discovery and development. For drug discovery, zebrafish are especially valuable in the earlier stages of research as they provide a model organism to demonstrate a new treatment's efficacy and toxicity before more costly mammalian models are used. This review provides examples of compounds known to be toxic to humans that have been demonstrated to function similarly in zebrafish. Major advantages of zebrafish embryos are that they are readily permeable to small molecules added to their incubation medium and the transparent chorion enables the easy observation of development. Assay of acute toxicity (LC₅₀ estimation) in embryos can also include the screening for developmental disorders as an indicator of teratogenic effects. We used zebrafish for toxicity testing of new drugs on the base of phospholipid nanoparticles. The organization of the genome and the pathways controlling signal transduction appear to be highly conserved between zebrafish and humans that allow using zebrafish for modeling of human diseases some examples of which are illustrated in this paper.

Key words: zebrafish (*Danio rerio*), drug discovery, acute toxicity, teratogenesis, apoptosis, cancer.