

ZNACZENIE DANIO PRĘGOWANEGO W BADANIACH PROCESÓW EPILEPTOGENEZY ORAZ BADANIACH PRZESIEWOWYCH SUBSTANCJI PRZECIWDRGAWKOWYCH

The importance of zebrafish in the studies of epileptogenesis processes
and screening for anticonvulsants

Kinga Gawęł (Oslo, Lublin), Tomasz K. Prajsnar (Kraków), Marta Marszałek-Grabska,
Waldemar A. Turski (Lublin), Camila V. Esguerra (Oslo)

Streszczenie

Niniejsza praca omawia różne aspekty użycia ryby danio pręgowanego (*Danio rerio*, ang. zebrafish) w badaniach procesów epileptogenezy oraz badaniach przesiewowych substancji o działaniu przeciwdrgawkowym. W pierwszej części omówiono cechy danio, które czynią go atrakcyjnym organizmem modelowym w neurobiologii. Następnie scharakteryzowano model drgawek indukowanych pentylenetetrazolem u danio, a także jego zastosowanie w badaniach przesiewowych substancji o działaniu przeciwdrgawkowym. W drugiej części omówiono 3 modele genetyczne stosowane w badaniu procesów epileptogenezy. Na zakończenie przedstawiono perspektywy wykorzystania larw danio pręgowanego w medycynie personalizowanej, u chorych na epilepsję.

Abstract

This paper discusses several aspects of the use of zebrafish (*Danio rerio*) in epileptogenesis processes and in the screening for anticonvulsant/antiepileptic drugs. The first part briefly discusses the features of zebrafish that make it an attractive model organism in neuroscience. Next, an example of pentylenetetrazole-induced model of seizures in zebrafish is presented, as well as its application in screening for compounds with anticonvulsant activity. In the second part 3 genetic models of epilepsy are discussed, together with their role in the study of epileptogenesis processes. Finally, the prospects of using zebrafish larvae in personalized medicine in patients with epilepsy are briefly presented.

Podziękowania

Badania prowadzone przez Kingę Gawęł zostały sfinansowane przez Europejską Agencję ds. Badań Naukowych w ramach Stypendium Indywidualnego Marii Curie-Skłodowskiej. Tytuł projektu: „GEMZ-Genetic epilepsy models in zebrafish” (umowa nr: 798703 — GEMZ — H2020-MSCA-IF-2017).

Mała rybka, która „podbija” neurobiologię

Danio pręgowany (*Danio rerio*, ang. zebrafish) jest małą słodkowodną rybą z rodziny karpowatych, występującą naturalnie w zbiornikach wodnych Indii, Nepalu i Pakistanu. Genom danio został zsekwencjonowany i obecnie wiadomo, że w 70% odpowiada

genomowi człowieka. W przypadku genów istotnych dla ośrodkowego układu nerwowego (OUN) ta wielkość wzrasta do 80%. Co istotne, w początkowych etapach rozwoju ciało larw danio jest przezroczyste, co pozwala na śledzenie dynamicznych zmian w rozwoju z użyciem mikroskopu świetlnego. Liczba potomstwa z jednej pary hodowlanej wynosi do 300 embrionów, w związku z czym badania z użyciem danio są dużo szybsze niż z użyciem gryzoni. Mózg dorosłego danio zawiera ok. 100 000 neuronów, a struktury mózgu odpowiadające strukturom mózgu człowieka zostały stosunkowo dokładnie zbadane i opisane. Ze względu na niewielkie rozmiary larw (ok. 4 mm długości u 5-dniowej larwy) możliwe jest prowadzenie efektywnych badań przesiewowych przy użyciu 96-dołkowych płytek mikrotitracyjnych.

Mimo różnic w budowie anatomicznej i odmienności wielu procesów fizjologicznych wynikających z przystosowania do bytowania w zasadniczo innym środowisku życia ryb i gryzoni, opracowano i zwalidowano podobne zachowania, które zostały uznane za wiarygodne testy behawioralne wykorzystywane w badaniach naukowych i przesiewowych. Między innymi testy oceniające lęk, pamięć czy uzależnienie u danio zostały zwalidowane i są już szeroko stosowane w wielu laboratoriach na świecie. Opisano także szereg zachowań socjalnych, które stanowią pole zainteresowania naukowców zajmujących się m.in. badaniem autyzmu, niekiedy współtowarzyszącemu padaczce [10]. Badania z użyciem larw danio, przeprowadzone na niespotykaną dotąd skalę przez badaczy z uniwersytetu Harvarda, pozwoliły także na wytypowanie genów o nieznannej funkcji biologicznej, które predysponują do wystąpienia schizofrenii [21].

Modele farmakologiczne drgawek u danio przegowanego i ich wykorzystanie w badaniach przesiewowych

W 2005 r. Scott Baraban wraz ze współpracownikami [3] po raz pierwszy opisał model drgawek chemicznych u 7-dniowych larw danio. Podanie pentylentetrazolu (PTZ), tj. związku hamującego przekazywanie dla kwasu γ -aminomasłowego (GABA), skutkowało dawkozależnym wzrostem aktywności lokomotorycznej u larw danio, które korelowało z liczbą i czasem wyładowań w obrazie EEG. Na poziomie molekularnym PTZ indukował wzrost ekspresji czynnika transkrypcyjnego *c-fos*, który jest markerem aktywności neuronalnej, a jego ekspresja wzrasta w mózgu chorych na padaczkę oraz u zwierząt, u których padaczkę indukuje się chemicznie, np. w modelu padaczki/drgawek indukowanych kwasem kainowym [16] czy pilokarpiną [4].

Scott Baraban [3] w swojej pionierskiej pracy wyróżnił 3 fazy zmian w zachowaniu larw pod wpływem PTZ. Faza I obejmuje bardzo duży wzrost aktywności lokomotorycznej larwy, która porusza się różnych kierunkach. Faza II polega na ciągłym, szybkim poruszaniu się larwy wzdłuż okrągłej ściany studzienki, co przypomina obroty wokół osi i dlatego została nazwana przez autorów „whirlpool-like”. W III fazie obserwuje się serię krótkotrwałych konwulsji prowadzących do utraty postawy, np. larwa upada na jeden bok i pozostaje w tej pozycji przez 1-3 sekund. Obecnie przyjmuje się, że opisane powyżej obserwowane u larw zmiany behawioralne odzwierciedlają drgawki toniczno-kloniczne u ludzi. Model ten jest dobrze zwalidowany i powszechnie stosowany w wielu labo-

ratoriach na świecie. Podobieństwo profilu działania przeciwdrgawkowego leków i substancji w modelu drgawek wywołanych PTZ u larw danio i u gryzoni [1, 7, 14] świadczy o wysokiej wartości translacyjnej tego modelu zwierzęcego.

Z technicznego punktu widzenia przeprowadzenie doświadczeń z użyciem PTZ do badań przesiewowych u larw nie nastęrcza trudności. Obecnie istnieją specjalne aparaty rejestrujące ruch larw (m.in. Zebra-box Viewpoint czy Noldus), które umożliwiają jednoczesne śledzenie nawet 96 zwierząt w tym samym czasie. Larwy umieszcza się pojedynczo w studzienkach, dodając do wody różne stężenia PTZ. PTZ bardzo szybko przenika przez powłoki ciała larw i po 5 minutach od dodania PTZ rozpoczyna się badanie. Czas trwania całego eksperymentu jest ściśle zależny od zastosowanej dawki. Dawka 20 mM PTZ powoduje bardzo szybki wzrost aktywności lokomotorycznej larw, osiągając punkt szczytowy ok. 15. minuty trwania badania. Następnie obserwuje się szybki spadek aktywności na skutek osiągnięcia przez larwy fazy III drgawek. W przypadku, gdy zastosowane dawki są mniejsze (10 lub 15 mM), czas trwania badania należy wydłużyć nawet do dwóch godzin, gdyż czas osiągnięcia przez larwy maksymalnego wzrostu aktywności lokomotorycznej jest przesunięty do ok. 30–45 minut od dodania PTZ. W analizie wyników najczęściej stosowanym parametrem jest pomiar drogi przebytej przez larwę wyrażonej w milimetrach [12].

Wykorzystanie modelu PTZ w badaniach przesiewowych pozwoliło z sukcesem zidentyfikować różne nowe substancje o działaniu przeciwdrgawkowym izolowane z organizmów morskich [7], pochodzenia roślinnego [11, 17] oraz uzyskanych syntetycznie [14].

Chociaż pierwsza praca odnośnie wykorzystania modelu PTZ u larw danio ukazała się w 2005 r., dopiero 7 lat później po raz pierwszy wykorzystano ten model do badań przesiewowych na dużą skalę. Sarah Baxendale i wsp. [5] wykorzystali w tym celu bibliotekę leków (ok. 2000 substancji) zatwierdzonych przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków (*Food and Drug Administration*, FDA). Badania przeprowadzili z użyciem testu aktywności lokomotorycznej oraz ocenili ekspresję czynnika transkrypcyjnego *c-fos* metodą hybrydyzacji *in-situ*. Na bazie wyników wytypowali 46 substancji z różnych grup leków o potencjalnym działaniu przeciwdrgawkowym. Wśród tych substancji znalazły się steroidy, niesterydowe leki przeciwzapalne czy leki przeciwgrzybicze.

Równie ciekawe badania z wykorzystania modelu PTZ u larw danio przeprowadził Leo Brueggeman

i wsp. [6]. Analiza próbek hipokampa pobranych od 6 pacjentów z padaczką skroniową (*mesial temporal lobe epilepsy*) wykazała zmiany w ekspresji 689 genów. Z tej grupy 148 genów było już wcześniej klasyfikowanych jako geny związane z wystąpieniem padaczki. Autorzy w swojej pracy podzielili je na 3 podgrupy, tj. odpowiadające za interakcję białko-białko, za ubykwytnację białek oraz za migrację neuronów. Na bazie tych informacji wyselekcjonowali z biblioteki leków FDA 184 substancje do dalszych testów z użyciem modelu indukowanych PTZ drgawek u larw danio. Co ciekawe, w zastosowanym przez autorów modelu skuteczne okazały się 3 leki z zupełnie różnych grup terapeutycznych: (1) pyrantel - lek przeciwpasożytniczy, (2) metformina – lek przeciwcukrzycowy oraz (3) nifedypina – stosowana w leczeniu choroby wieńcowej i nadciśnienia tętniczego. Uzyskane wyniki są interesujące ze względów medycznych, ale sugerują również przydatność larw danio w badaniach przesiewowych o wysokiej przepustowości.

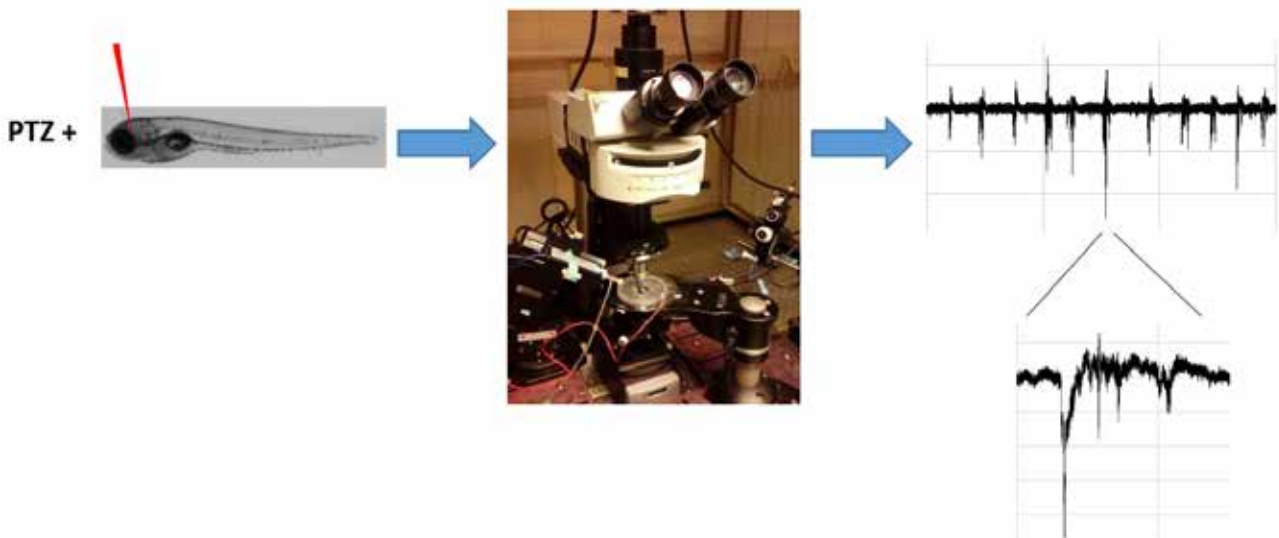
Modele genetyczne padaczki u danio przegowanego - ich wykorzystanie w badaniach procesów epileptogenezy oraz w badaniach przesiewowych

Epileptogeneza jest procesem, w którym dochodzi do utrwalonych zmian patologicznych w obrębie mózgu, których konsekwencją są okresowe, nawracające wyładowania padaczkowe. Istnieje wiele hipotez odnośnie mechanizmów epileptogenezy, ale należy

zaznaczyć, że większość tych hipotez bazuje na badaniach z użyciem zwierząt zdrowych, u których padaczkę indukowano chemicznie.

Dynamiczny rozwój badań i w jego konsekwencji dostępność metod manipulacji w genomie danio (m.in. metoda CRISPR/Cas9 czy TALEN) wraz ze spadkiem kosztów oraz walidacją tych metod przyczyniły się w bardzo krótkim czasie do powstania wielu różnych modeli padaczek wczesnodziecięcych o podłożu genetycznym. Użycie larw danio, zwłaszcza na wczesnych etapach rozwoju, kiedy larwy są przezroczyste, pozwala na ocenę zmian w mózgu przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Istnieje obecnie kilka linii transgenicznych danio pozwalających na wizualizację w 3D m.in. neuronów GABA- lub glutaminianergicznych [12].

Najpowszechniej obecnie stosowanym modelem genetycznym padaczki jest model choroby Draveta [2, 19, 22], w którym zahamowanie ekspresji genu *scn11ab* (odpowiednik genu *SCN1A* u ludzi) kodującego kanały sodowe typu Nav1.1 skutkuje wystąpieniem w obrazie elektroencefalograficznym (EEG) wyładowań o charakterze toniczno-klonicznym (Ryc. 1). Cechą charakterystyczną tego syndromu u ludzi jest to, że pierwsze napady drgawek indukowane są u niemowląt pod wpływem wysokiej temperatury. Następnie obserwuje się zahamowanie rozwoju intelektualnego oraz nasilenie, a niekiedy zmianę charakteru napadów. Szczególną trudnością w leczeniu tego syndromu jest wysoka lekooporność i niewielka liczba dostępnych opcji terapeutycznych.



Ryc. 1. Rycina przedstawia schemat analizy EEG u danio na przykładzie drgawek wywołanych PTZ. Larwy są inkubowane przez 5 min w 20 mM roztworze PTZ, a następnie unieruchamiane w 2% żelu agarozowym na szkiełku. Szklana elektroda wypełniona sztucznym płynem mózgowo-rdzeniowym zostaje umieszczona w mózgu (*optic tectum* lub przodmózgowie) – panel po lewej stronie. W środku stanowisko do zapisu aktywności elektrycznej mózgu larwy (sprzęt firmy Scientifica, UK). Czas trwania badania wynosi 20 min. Panel po prawej stronie przedstawia przykład 10-minutowego zapisu EEG u larw danio po ekspozycji na działanie PTZ, z odpowiednim powiększeniem typowego wyładowania o charakterze toniczno-klonicznym. Autor zdjęć: Kinga Gaweł.

Podobnie jak w przypadku modelu drgawek wywołanych PTZ, po raz pierwszy model choroby Draveta u danio opisał Scott Baraban i wsp. [2]. Mutacja nonsensowna, prowadząca do zahamowania ekspresji *scn11ab*, powoduje u kilkudniowych (3–7 dni) mutantów nasiloną aktywność lokomotoryczną, która w połączeniu z dużą liczbą wyładowań w obrazie EEG świadczy o występowaniu drgawek toniczno-klonicznych. Co ciekawe, we wspomnianej pracy autorzy zbadali bibliotekę FDA zawierającą 320 różnych leków i z nich wytypowali klemizol (lek przeciwhistaminowy) jako lek potencjalnie skuteczny w leczeniu pacjentów z syndromem Draveta. Jego weryfikacja pod kątem leczenia syndromu Draveta u ludzi wymaga dalszych badań.

Na uwagę zasługuje praca Jo Sourbrona i wsp. [19]. W niniejszej pracy autorzy zbadali różne leki oddziałujące na układ serotoninoergiczny w modelu choroby Draveta u danio. Z kilku przetestowanych leków tylko lizuryd, stosowany w leczeniu choroby Parkinsona, okazał się być skuteczny w tym modelu. Wydaje się, że lizuryd może być nowym kandydatem w leczeniu syndromu Draveta.

Bardzo ciekawe badania odnośnie mechanizmów epileptogenezy leżących u podłoża wystąpienia choroby Draveta zostały przeprowadzone przez naszą grupę pod przewodnictwem prof. Camili Esguerra [22]. W naszej pracy wykazaliśmy, że u larw z wyłączoną funkcją genu *scn11ab* (mutacja missensowna) dochodzi do zmiany w liczbie dendrytów w neuronach GABA-ergicznych. Już u 3-dniowej larwy obserwuje się zmniejszenie liczby dendrytów w stosunku do larw kontrolnych. U 6-dniowych homozygot ich liczba spada o 40% w stosunku do kontroli, co skutkuje znaczącą przewagą układu glutaminianergicznego nad układem GABA. Zmiany w ilości dendrytów korelują w czasie ze zwiększającą się liczbą wyładowań w obrazie EEG. Co ciekawe, fenfluramina (agonista receptorów serotoninoergicznych typu 2A i 2B), będąca obecnie w III fazie badań klinicznych w syndromie Draveta, podawana przewlekle larwom odwraca wspomniane defekty. Chociaż nasze wyniki po raz pierwszy wskazują na możliwość modyfikowania przebiegu choroby przez fenfluraminę, wymaga to dalszej weryfikacji.

Stwardnienie guzowate (*tuberous sclerosis complex*, TSC) jest rzadką, lekooporną chorobą, u podłoża której leżą mutacje w genach *TSC1* (kodujący białko hamartynę) lub *TSC2* (kodujący białko tuberynę), skutkujące zahamowaniem funkcji tych genów. Wspomniana jednostka choroby charakteryzuje się występowaniem zmian wielonarządowych, a u ponad 90% chorych obserwuje się również zaburzenia neu-

rologiczne – różne typy napadów padaczkowych oraz stany lękowe. TSC jest klasyfikowane jako choroba lekooporna, chociaż część chorych odpowiada na leczenie wigabatryną (analog GABA).

Bardzo ciekawe badania odnośnie mechanizmów epileptogenezy w modelu TSC przeprowadziła grupa polskich badaczy pod kierunkiem prof. Jacka Jaworskiego i dr Justyny Zmorzyńskiej. W swojej pracy wykorzystali larwy danio z wyłączoną funkcją genu *tsc2* [15], którego produkt jest negatywnym modulatorem kompleksu mTOR1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*). W tym badaniu autorzy stwierdzili, że wyłącznie genu *tsc2* u danio skutkowało heterotopią i hiperaktywacją szlaku mTOR1 w obrębie „pallium” - regionu mózgu danio, który jest homologiczny do kory ssaków. Ponadto u mutantów zaobserwowano rozrzedzenie spoidła wielkiego mózgu, które jest odpowiedzialne za rozłączenie półkul mózgu, co jest charakterystyczne dla chorych na TSC. Brak ekspresji *tsc2* opóźniał również rozwój aksonów i powodował nieprawidłowy rozwój dróg nerwowych w mózgu mutantów. U larw *tsc2^{-/-}* obserwowano napady padaczkowe o charakterze niemotorycznym oraz objawy lękowe. Wspomniane objawy były odwracane wskutek zahamowania receptora dla kinazy tyrozynowej B (TrkB). Ponadto autorzy wykazali, że w przeciwieństwie do wigabatryny (analog GABA) i rapamycyny (modulator mTOR1), hamowanie TrkB zapobiegało zmianom patologicznym w obrębie mózgu. Podsumowując, dane te ujawniły, że istnieje funkcjonalna zbieżność między ścieżkami spoidła mózgu a występowaniem lęku w modelu *tsc*, zapewniając mechanistyczny związek między anatomią mózgu a objawami choroby u ludzi. Ponadto wspomniana praca po raz pierwszy opisuje receptor TrkB jako nowy punkt uchwytu dla leków w syndromie TSC [15].

W 2013 r. po raz pierwszy opisano mutację w genie *DEPDC5* (domena DEP zawierająca białko 5) w rodzinnej padaczce ogniskowej [8, 9]. Od tego czasu mutacje w *DEPDC5* (prowadzące do przedwczesnego wystąpienia kodonu stop) zidentyfikowano w 12–37% wszystkich przypadków padaczek ogniskowych [13]. *DEPDC5* koduje białko, które jest członkiem kompleksu GATOR1 (Gap Activity Towards Rags), będące ujemnym regulatorem mTORC1. Używając technologii CRISPR/Cas9 Swaminathan i wsp. [20] zaprojektowali model padaczki u danio z utratą funkcji *depdc5*. U larw *depdc5^{-/-}* zaobserwowano zwiększoną fosforylację białka pS6, które jest markerem aktywności szlaku mTOR oraz spontaniczne wyładowania w obrazie EEG. Sekwencjonowanie mRNA mózgu larw *depdc5^{-/-}* ujawniło zmiany

w poziomie ekspresji wielu różnych genów, np. odpowiedzialnych za morfogenezę, aksonogenezę, tworzenie synaps lub przekazywanie sygnałów za pośrednictwem GABA. W odniesieniu do genów związanych z funkcją GABA barwienie immunologiczne Gad1/2 (enzymy dekarboksylazy kwasu glutaminowego 1 i 2, katalizujące reakcję przekształcania glutaminianu do GABA) ujawniło zmniejszoną liczbę projekcji Gad1/2 u larw *depdc5*^{-/-}. Ponieważ agoniści receptora GABA nie byli w stanie zapobiegać zmianom patologicznym u larw *depdc5*^{-/-}, podczas gdy wigabatryna, przynajmniej częściowo, odwracała te objawy, autorzy doszli do wniosku, że bardziej prawdopodobne jest, że efekt kompensacyjny GABA jest spowodowany przez GABA *per se*, a nie poprzez receptory GABA. To kompleksowe badanie wskazało na nowy, niezależny od mTOR, wpływ niedoboru *Depdc5* na sygnalizację GABA, której zaburzenia mogą leżeć u podstaw patogenezy padaczki ogniskowej [20].

Podsumowanie, czyli perspektywy wykorzystania danio przegowanego w medycynie personalizowanej

Omówione przez nas wyżej badania wskazują wysoki potencjał larw danio w badaniach genetycznego podłoża epilepsji. Wiele wskazuje również na to, że w niedalekiej przyszłości będzie można modele genetyczne wykorzystać również w medycynie personalizowanej, a więc indywidualizacji leczenia pod konkretnego pacjenta. Nastrzykując mutanty (homozygoty) wariantami ludzkimi sekwencjami kodującymi z określonymi mutacjami, możliwe jest określenie, który z wariantów ma charakter patologiczny i odpowiada za fenotyp choroby [8, 18]. Dzięki temu w przyszłości będzie można wykonywać badania przesiewowe biblioteki leków pod kątem ich skuteczności w mutacji, której nosicielem jest dany chory.

Bibliografia

1. Aourz N, Serruys AK, Chabwine JN, Balegamire PB, Afrikanova T, Edrada-Ebel R, et al. (2019). Identification of GSK-3 as a Potential Therapeutic Entry Point for Epilepsy. *ACS. Chem. Neurosci.* 10:1992-2003.
2. Baraban SC, Dinday MT, Hortopan GA (2013) Drug screening in *Scn1a* zebrafish mutant identifies clemizole as a potential Dravet syndrome treatment. *Nat. Commun.* 4:2410.
3. Baraban SC, Taylor MR, Castro PA, Baier H (2005). Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience.* 131(3):759-768.
4. Barone P, Morelli M, Cicarelli G, Cozzolino A, DeJoanna G, Campanella G, DiChiara G (1993). Expression of c-fos protein in the experimental epilepsy induced by pilocarpine. *Synapse.* 14:1-9.
5. Baxendale S, Holdsworth CJ, Meza Santoscoy PL, Harrison MR, Fox J, Parkin CA, et al. (2012). Identification of compounds with anti-convulsant properties in a zebrafish model of epileptic seizures. *Dis. Model. Mech.* 5:773-784.
6. Brueggeman L, Sturgeon ML, Martin RM, Grossbach AJ, Nagahama Y, Zhang A, et al. (2019). Drug repositioning in epilepsy reveals novel antiseizure candidates. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 6:295-309.
7. Copmans D, Kildgaard S, Rasmussen SA, Ślęzak M, Dirkx N, Partoens M, et al. (2019). Zebrafish-Based Discovery of Antiseizure Compounds from the North Sea: Isoquinoline Alkaloids TMC-120A and TMC-120B. *Mar. Drugs.* 17, 607.
8. de Calbiac H, Dabacan A, Marsan E, Tostivint H, Devienne G, Ishida S, et al. (2018). *Depdc5* knockdown causes mTOR-dependent motor hyperactivity in zebrafish. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 5:510-523.
9. Dibbens LM, de Vries B, Donatello S, Heron SE, Hodgson BL, Chintawar S, et al. (2013). Mutations in *DEPDC5* cause familial focal epilepsy with variable foci. *Nat. Genet.* 45:546-51.
10. Gawel K, Banono NS, Michalak A, Esguerra CV (2019). A critical review of zebrafish schizophrenia models: Time for validation? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 107:6-22.

11. Gawel K, Kukula-Koch W, Nieoczym D, Katarzyna Stepnik K, van der Ent W, Banono NS, Tarabasz D, Turski WA, Esguerra CV (2020). The Influence of Palmatine Isolated from *Berberis sibirica Radix* on Pentylentetrazole-Induced Seizures in Zebrafish. 9:1233.
12. Gawel K, Langlois M, Martins T, van der Ent W, Tiraboschi E, Maxime Jacmin M, Crawford AD, Esguerra CV (2020). Seizing the moment: Zebrafish epilepsy models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 116:1-20.
13. Ishida S, Picard F, Rudolf G, Noé E, Achaz G, Thomas P, et al. (2013). Mutations of DEPDC5 cause autosomal dominant focal epilepsies. *Nat. Genet.* 45:552-555.
14. Kamiński K, Socała K, Zagaja M, Andres-Mach M, Abram M, Jakubiec M, et al. (2020). N-Benzyl-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)propanamide (AS-1) with Hybrid Structure as a Candidate for a Broad-Spectrum Antiepileptic Drug. *Neurotherapeutics.* 17:309-328.
15. Kedra M, Banasiak K, Kisielewska K, Wolinska-Nizioł L, Jaworski J, Zmorzynska J (2020) TrkB hyperactivity contributes to brain dysconnectivity, epileptogenesis, and anxiety in zebrafish model of Tuberous Sclerosis Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 117:2170-2179.
16. Lin K-C, Chia-Chuan Wang C-C, Su-Jane Wang S-J (2013). Bupropion attenuates kainic acid-induced seizures and neuronal cell death in rat hippocampus. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 45:207-214.
17. Nieoczym D, Socała K, Gawel K, Esguerra CV, Wyska E, Właż P (2019). Anticonvulsant Activity of Pterostilbene in Zebrafish and Mouse Acute Seizure Tests. *Neurochem. Res.* 44:1043-1055.
18. Siekierska A, Stamberger H, Deconinck T, Opreacu SN, Partoens M, Zhang Y, et al. (2019). Biallelic VARS variants cause developmental encephalopathy with microcephaly that is recapitulated in vars knockout zebrafish. *Nat. Commun.* 10:708.
19. Sourbron J, Partoens M, Scheldeman C, Zhang Y, Lagae L, de Witte P (2019). Drug repurposing for Dravet syndrome in *scn1Lab^{-/-}* mutant zebrafish. *Epilepsia.* 60:e8-e13.
20. Swaminathan A, Hassan-Abdi R, Renault S, Siekierska A, Riché R, et al. (2018). Non-canonical mTOR-Independent Role of DEPDC5 in Regulating GABAergic Network Development. *Curr. Biol.* 28:1924-1937.
21. Thyme SB, Pieper LM, Li EH, Pandey S, Wang Y, Morris NS, et al. (2019). Phenotypic Landscape of Schizophrenia-Associated Genes Defines Candidates and Their Shared Functions. *Cell.* 177:478-491.
22. Tiraboschi E, Martina S, van der Ent W, Grzyb K, Gawel K, Cordero-Maldonado ML, et al. (2020). New insights into the early mechanisms of epileptogenesis in a zebrafish model of Dravet syndrome. *Epilepsia.* 61:549-560.

Dr Kinga Gawel – pracownik naukowy (researcher) w Centrum Medycyny Molekularnej, Uniwersytet w Oslo (Norwegia) oraz asystent w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie. *Autor korespondencyjny: kingagawel@umlub.pl lub kingagawel@o2.pl

Dr Tomasz K. Prajsnar – adiunkt badawczy w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. E-mail: tomasz.prajsnar@uj.edu.pl

Dr Marta Marszałek-Grabska – adiunkt w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie. E-mail: marta.marszalek-grabska@umlub.pl

Prof. dr hab. Waldemar A. Turski – kierownik Katedry i Zakładu Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie. E-mail: waldemar.turski@umlub.pl

Prof. Camila V. Esguerra – lider grupy „Chemical Neuroscience” w Centrum Medycyny Molekularnej, Uniwersytet w Oslo, Norwegia. E-mail: c.v.esguerra@ncmm.uio.no