

Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Zebrafish dotyczące wykorzystania modelu danio pręgowanego (*Danio rerio*) w badaniach biomedycznych

Piotr Podlasz^{1*}, Marta Migocka-Patrzalek², Tomasz K. Prajsnar³, Anna Sarosiak⁴ oraz Przemko Tylzanowski^{5,6}

¹Katedra Patofizjologii, Weterynarii Sądowej i Administracji, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Olsztyn, Polska; ²Zakład Biologii Rozwoju Zwierząt, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław, Polska; ³Zakład Immunologii Ewolucyjnej, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska; ⁴Uniwersyteckie Centrum Zdrowia Kobiety i Noworodka, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska; ⁵Skeletal Biology and Engineering Research Center, Department of Development and Regeneration, KU Leuven, Leuven, Belgia; ⁶Zakład Genetyki Molekularnej, Katedra Nauk Biomedycznych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Lublin, Polska

Danio pręgowane (*Danio rerio*) jest dziś szeroko stosowanym modelem kręgowca w badaniach biomedycznych, łącząc wysoką wartość translacyjną z realizacją zasad 3R (Zastąpienie, Ograniczenie, Udoskonalenie). Polskie Towarzystwo Zebrafish przedstawia kompleksowe, dziedziczne rekomendacje dotyczące odpowiedzialnego i efektywnego wykorzystania danio pręgowanego w głównych obszarach badań biomedycznych. Dokument omawia naukowe uzasadnienie i przewagi eksperymentalne podejść opartych na tym modelu w onkologii, toksykologii, neurologii i neuropsychiatrii, chorobach metabolicznych, immunologii, kardiologii oraz modelowaniu chorób genetycznych. Do kluczowych atutów modelu należą szybki rozwój, przezroczystość, podatność genetyczna oraz wysoka konserwacja szlaków molekularnych i fizjologicznych istotnych dla chorób człowieka. Cechy te umożliwiają analizę procesów patologicznych w czasie rzeczywistym *in vivo*, wysokoprzepustowy skrining farmakologiczny i toksykologiczny oraz walidację funkcjonalną genów chorobowych. Integrując kwestie etyczne z silnymi danymi eksperymentalnymi,

iniejsze rekomendacje mają wspierać standaryzację stosowania modelu danio w badaniach akademickich, rozwoju leków oraz naukach regulacyjnych. Szerokie wdrożenie tego podejścia może przyspieszyć odkrycia przedkliniczne, zwiększyć trafność translacyjną i istotnie ograniczyć stosowanie wyższych kręgowców.

SŁOWA KLUCZOWE

zasady 3R, badania biomedyczne, danio pręgowane, *Danio rerio*, Polskie Towarzystwo Zebrafish, toksykologia, onkologia, badania translacyjne

Wprowadzenie

Odpowiedzialność za dobrostan zwierząt jest istotnym elementem badań wykorzystujących modele *in vivo*. Doprowadziło to do sformułowania koncepcji 3R: Zastąpienia, Ograniczenia i Udoskonalenia (ang. Replacement, Reduction, Refinement). Jej celem jest zminimalizowanie wykorzystania zwierząt i ich cierpienia przy zachowaniu wartości naukowej eksperymentów. W ostatnich latach koncepcję tę rozszerzono o czwarte R (Odpowiedzialność) i piąte R (Rehoming) (Harrell i wsp., 2024; Lauwereyns i wsp., 2024; MacArthur Clark, 2018).

Strategie zastąpienia polegają na przesunięciu badań z wyższych kręgowców (myszy, szczury) na organizmy ewolucyjnie prostsze. Jedno z takich podejść wykorzystuje danio pręgowane (*Danio rerio*), który zyskał ogromną popularność w ostatnich dwóch dekadach. Choć gryzonie pozostają najczęściej stosowanym modelem kręgowca, dane bibliometryczne wskazują, że liczba badań na danio rośnie szybko i w niektórych obszarach zbliża się do liczby badań na szczurach lub ją przewyższa (Bedell i wsp., 2025; Choi i wsp., 2021).

Danio pręgowane to mała ryba słodkowodna o ok. 70% homologii genetycznej z człowiekiem;

80% genów związanych z chorobami człowieka ma ortologów u tej ryby (Howe i wsp., 2013). Danio zachowuje konserwatywny plan budowy ciała kręgowca oraz podstawowe zasady rozwoju narządów, organizacji tkanek i regulacji fizjologicznej wspólne z ssakami. Choć niektóre narządy wykazują różnice anatomiczne specyficzne dla gatunku, większość ma wyraźne odpowiedniki u człowieka powstające w toku homologicznych szlaków rozwojowych. Wiele procesów komórkowych istotnych dla chorób człowieka, w tym przekazywanie sygnałów, regulacja hormonalna, odpowiedź immunologiczna i metabolizm ksenobiotyków, jest wysoce konserwatywnych. Danio posiada funkcjonalne ortologów kluczowych enzymów metabolizujących leki i transporterów, co umożliwia rzetelną ocenę farmakokinetyki, skuteczności i toksyczności na poziomie całego organizmu. Cechy te decydują o wysokiej trafności translacyjnej modelu mimo dużego dystansu ewolucyjnego od ssaków. Do dodatkowych zalet należą: zewnątrzustrojowe zapłodnienie i rozwój zarodkowy, bardzo szybki rozwój (większość narządów powstaje w pierwszych 24 h po zapłodnieniu) oraz przezroczystość zarodków w pierwszych dniach, umożliwiającą obserwację organogenezy w czasie rzeczywistym (Kimmel i wsp., 1995). Dojrzałość płciową ryby osiągają po ok. 3 miesiącach. Są małe, łatwe w hodowli, wysoce płodne (jedna para wytwarza setki jaj tygodniowo) i tanie w utrzymaniu w porównaniu z modelami ssaczymi. Dla danio dostępne są zaawansowane techniki molekularne — transgeneza, system Cre-lox oraz CRISPR/Cas9 — umożliwiające modelowanie chorób człowieka i wysokoprzepustowe eksperymenty *in vivo*. Przezroczystość zarodków i larw pozwala stosować zaawansowane techniki obrazowania całego organizmu *in vivo*.

Polskie Towarzystwo Zebrafish (ang. Polish Zebrafish Society) zaleca wykorzystywanie zarodków i larw danio do etapu poprzedzającego samodzielne odżywianie w eksperymentach *in vivo*. Rekomendacja ta jest zgodna z Dyrektywą UE 2010/63/UE, która definiuje zakres ochrony w odniesieniu do samodzielnie odżywiających się form larwalnych; wcześniejsze stadia rozwojowe ryb pozostają poza formalnym zakresem Dyrektywy. U danio etap ten osiągany jest zwykle ok. 5 dni po zapłodnieniu (dpf), choć dokładny moment zależy od warunków rozwojowych i hodowlanych. Zasady te zostały włączone do prawa polskiego ustawą z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz.U. 2015, poz. 266, z późn. zm.), która również wyłącza spod ochrony stadia zarodkowe i larwalne ryb przed rozpoczęciem samodzielnego odżywiania. Wykorzystanie zarodków i wczesnych larw danio może zatem — zgodnie z prawem polskim i unijnym — stanowić alternatywę dla klasycznych eksperymentów prowadzonych na

chronionych stadiach zwierząt, co przyczynia się do zastąpienia lub ograniczenia wykorzystania ssaków (zwłaszcza myszy i szczurów) w badaniach, gdy jest to naukowo uzasadnione.

W sytuacjach naukowo uzasadnionych, gdy nie istnieje alternatywne podejście pozwalające uzyskać wiarygodne wyniki, Polskie Towarzystwo Zebrafish uznaje za uzasadnione wykorzystanie późniejszych stadiów rozwojowych lub osobników dorosłych, pod warunkiem spełnienia wymogów prawnych i etycznych. W takich przypadkach należy uzyskać zgodę właściwej lokalnej komisji etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach zgodnie z obowiązującymi przepisami.

Danio pręgowane stało się jednym z głównych modeli zwierzęcych dzięki unikalnemu połączeniu zewnątrzustrojowego, szybkiego rozwoju i przezroczystości ciała we wczesnych etapach życia. Jest powszechnie stosowany w biologii rozwoju, ponieważ pozwala zintegrować w obrębie jednego systemu kręgowca podejścia genetyczne, obrazowanie w żywym organizmie i ilościowe analizy wielomarkerowe (multi-omics). Model ten dostarcza wglądu w epigenetyczną regulację decyzji liniowych, organogenezę oraz kontrolę hormonalną i endokrynną (Dawid, 2004; Kemmler i wsp., 2021; Lazcano i wsp., 2023; Marchione i wsp., 2021; Meyers, 2018;

Vacaru i wsp., 2014). W połączeniu z technologiami analizy transkrypcyjnej w populacjach komórek umożliwia tworzenie kompleksowych atlasów transkrypcyjnych wczesnego rozwoju (Daniocell; Sur i wsp., 2023). Inicjatywy społeczności, takie jak wielkoskalowe screeningi mutagenety i repozytoria ZFIN, zapewniają otwarty dostęp do map regulatorów kręgowców i stanowią solidną podstawę nowych odkryć (Baranasic i wsp., 2022).

W kolejnych rozdziałach przedstawiono rekomendacje dziedzinowe oraz przykłady literaturowe ilustrujące zastosowanie zarodków i larw danio w onkologii, toksykologii, neurologii (w tym neuropsychiatrii), chorobach metabolicznych, immunologii, kardiologii i chorobach genetycznych (Rycina 1).

Onkologia

Polskie Towarzystwo Zebrafish zaleca wykorzystanie modelu ksenograftu ludzko-rybiego do szybkiego skryningu w onkologii. Strategia ta polega na implantacji ludzkich komórek nowotworowych — pochodzących z linii komórkowych lub od pacjentów — do zarodków lub larw danio. Na tym etapie rozwoju larwy nie mają w pełni funkcjonalnego układu odpornościowego. Brak

odpowiedzi immunologicznej w pierwszych dniach życia umożliwia wszczepienie i proliferację komórek ludzkich bez konieczności immunosupresji.

Przezroczyste ciało larw pozwala na bezpośrednią wizualizację *in vivo* rozwoju guza i procesów towarzyszących, takich jak angiogeneza, z rozdzielczością pojedynczej komórki. Co istotne, w odróżnieniu od modeli mysich, ludzkie komórki nowotworowe w danio łatwo migrują i tworzą przerzuty, co pozwala oceniać wpływ leków na ten kluczowy aspekt biologii nowotworu w warunkach *in vivo* (Fior i wsp., 2017; Pruvot i wsp., 2011). Eksperymenty ksenograftowe na danio można zakończyć w niespełna tydzień, podczas gdy analogiczne badania na myszach wymagają zwykle kilku tygodni. Znacząco obniża to koszty i przyspiesza uzyskanie klinicznie istotnych wyników. Model określany jako „Avatar” jest już stosowany w kontekstach klinicznych, m.in. do optymalizacji schematów chemioterapii w ramach medycyny spersonalizowanej (Costa i wsp., 2020; Lunina i wsp., 2024), choć jego zastosowanie kliniczne pozostaje w fazie walidacji. Podejście to wykorzystuje krótkotrwałe testy na larwach z implantowanymi komórkami guza pochodzącymi od pacjenta i umożliwia ocenę wrażliwości guza na różne schematy chemioterapii w ciągu kilku dni. W translacyjnym badaniu raka piersi wykazano pełną zgodność odpowiedzi obserwowanej w modelu larwalnym z rzeczywistą odpowiedzią kliniczną pacjentek, co potwierdza wysoką wartość predykcyjną metody i jej potencjał w medycynie spersonalizowanej (Mendes i wsp., 2025). Jednoczesna implantacja komórek nowotworowych do dziesiątek lub setek larw umożliwia równoległe testowanie *in vivo* wielu kandydatów na leki w skali nieosiągalnej dla klasycznych modeli mysich. Większość genów związanych z nowotworami człowieka ma konserwowane odpowiedniki u danio, podobnie jak szlaki regulujące proliferację, migrację i różnicowanie komórek (Howe i wsp., 2013).

Innym klasycznym przykładem zastosowania danio w onkologii jest identyfikacja i charakterystyka leków antyangiogennych. Larwalny model odegrał kluczową rolę w ponownym odkryciu przeciwnowotworowego mechanizmu talidomidu — wykazano jego silne hamowanie angiogenezy guza poprzez supresję sygnalizacji VEGF w badaniach rozwoju naczyń krwionośnych u danio (Yabu i wsp., 2005). Wyniki te przyczyniły się do ustalenia pozycji talidomidu i jego pochodnych jako leków stosowanych w nowotworach zależnych od neowaskularyzacji, takich jak szpiczak mnogi, potwierdzając wartość modelu w identyfikacji i walidacji klinicznie istotnych leków przeciwnowotworowych.

Ograniczenia onkologicznego modelu danio należy rozumieć w kontekście przewidzianego zastosowania. Model jest szczególnie przydatny do szybkiej oceny *in vivo* zachowania guza, angiogenezy, potencjału przerzutowego i porównawczej wrażliwości na leki, oferując przewagi w przepustowości, wizualizacji, kosztach i tempie eksperymentów. Niektóre aspekty onkologii człowieka — długofalowa progresja guza, w pełni dojrzała odpowiedź immunologiczna oraz część procesów zależnych od mikrośrodowiska — mogą wymagać uzupełniającego potwierdzenia w modelach ssaczych. Przy interpretacji danych należy też uwzględniać różnice gatunkowe w temperaturze, farmakokinetyce i architekturze tkanek. Uwagi te definiują jednak ramy translacyjne modelu, a nie jego słabość, i mocno wspierają wykorzystanie danio jako sprawnej, informatywnej i etycznie korzystnej platformy w onkologii wczesnoetapowej oraz w priorytetyzacji terapii.

Toksykologia

Polskie Towarzystwo Zebrafish rekomenduje danio jako model ułatwiający wczesne wykrywanie toksyczności substancji. Model znajduje zastosowanie w toksykologii żywnościowej, środowiskowej i farmaceutycznej, zwłaszcza w badaniach przesiewowych dużej liczby związków wymagających szybkiej oceny bezpieczeństwa. Główną przewagą jest wysokie podobieństwo fizjologii i metabolizmu do człowieka, podnoszące wartość predykcyjną wyników (Batir-Marin i wsp., 2025; Hou i wsp., 2023; Zhao i wsp., 2024).

We wczesnym rozwoju leków danio pozwala oceniać toksyczność ostrą oraz efekty teratogenne i embriotoksyczne testowanych związków. Szybki rozwój umożliwia ocenę embriotoksyczności, w tym opóźnień rozwojowych i śmiertelności, co pozwala wcześniej identyfikować substancje potencjalnie niebezpieczne, przed kosztownymi i etycznie wymagającymi badaniami na większych zwierzętach lub u ludzi (Bauer i wsp., 2021; Dubińska-Magiera i wsp., 2016; Hamm i wsp., 2024; Miao i wsp., 2025; Shen i Zuo, 2020).

W toksykologii danio jest stosowane jako pełna alternatywa klasycznych testów ssaczych. Tradycyjne testy gryzoniowe wyznaczają wartości LD₅₀ (dawka letalna), natomiast Fish Embryo Acute Toxicity Test (FET, OECD TG 236) (Hamm i wsp., 2024; Kalueff i wsp., 2016; OECD, 2025) opiera się na wyznaczeniu wartości LC₅₀ (stężenie letalne) w 96-godzinnej ekspozycji. Punkty końcowe nie są równoważne, ale dostarczają porównywalnych informacji o toksyczności ostrej, umożliwiając wczesną

identyfikację zagrożeń bez użycia dorosłych kręgowców. Wartości LC_{50} z zarodków danio służą głównie do skringingu i priorytetyzacji, a nie bezpośredniego regulacyjnego zastąpienia danych LD_{50} . Rozwój zarodkowy umożliwia jednocześnie ocenę potencjału teratogennego i embriotoksycznego dzięki bezpośredniej obserwacji organogenezy oraz identyfikacji morfologicznych nieprawidłowości wywołanych lekami lub zanieczyszczeniami chemicznymi. Dostarcza to wglądu w procesy odpowiedzi, takie jak stres oksydacyjny, apoptoza i zaburzenia endokrynne (Jiang i wsp., 2015; Zhou i wsp., 2020). Danio jest także powszechnie wykorzystywane w ocenie ryzyka środowiskowego nowych leków.

Zarodki danio oferują szereg cech ułatwiających skringing wysokoprzepustowy: przezroczystość i jednolitość, mały rozmiar. Można je automatycznie dystrybuować i utrzymywać w standardowych płytkach wielodołkowych zgodnych z aparaturą laboratoryjną do dozowania związków, inkubacji, obrazowania i analizy. Komputerowe czytniki i robotyczne mikroskopy pozwalają automatycznie wykrywać orientację zarodków i identyfikować interesujące obszary (np. serce, mózg, naczynia). Połączenie z odpowiednim oprogramowaniem i sztuczną inteligencją umożliwia szybką, szczegółową analizę efektów farmakologicznych, toksykologicznych i genetycznych *in vivo* (Bassi i wsp., 2025; Gierten i wsp., 2020; Letamendia i wsp., 2012; Lubin i wsp., 2021).

Środowisko naukowe i agencje regulacyjne uznają danio za istotną kręgowcową alternatywę dla modeli gryzoniowych i króliczych. Wdrożenie standaryzowanych protokołów istotnie zmniejsza liczbę ssaków używanych w testach toksyczności, obniża koszty i czas analiz oraz zapewnia zgodność z aktualnymi wymogami etycznymi i regulacyjnymi. Test FET został włączony do wytycznych OECD jako akceptowana metoda alternatywna w ocenie bezpieczeństwa chemikaliów. FDA uznaje danio jako narzędzie eksploracyjnych i wczesnoprzesiewowych procedur przedklinicznych w procesie rejestracji leków. Europejska Agencja Leków (EMA) wyraziła silne zainteresowanie tym modelem we wstępnych przeglądach regulacyjnych (Ball i wsp., 2025; Cassar, 2022; European Medicines Agency, 2018).

Zgodnie z zasadą 3R danio należy preferować nad modelami gryzoniowymi wszędzie tam, gdzie cel naukowy można osiągnąć w testach na wczesnym, całoorganizmowym kręgowcu, dających wiarygodne i powtarzalne punkty końcowe niższym kosztem etycznym i wyższą przepustowością. Dotyczy to zwłaszcza wczesnej identyfikacji zagrożeń, oceny toksyczności ostrej, embriotoksyczności i teratogenności, skringingu zaburzeń endokrynnych oraz priorytetyzacji dużych bibliotek związków przed badaniami ssaczymi. W tych zastosowaniach danio dostarcza szybkich i wartościowych odczytów *in vivo*, istotnie ograniczając użycie ssaków.

Danio może też uczestniczyć w badaniach toksyczności przewlekłej i reprodukcyjnej — zwłaszcza w długoterminowych ekspozycjach, badaniach płodności, endokrynnych punktach końcowych reprodukcji oraz analizach mechanistycznych efektów rozwojowych i międzypokoleniowych. Nie należy go jednak obecnie uznawać za uniwersalne zastąpienie testów ssaczyc, gdy ramy regulacyjne wymagają danych ssaczyc, lub gdy konieczna jest ocena fizjologii specyficznej dla ssaka (ciąża, laktacja, punkty wielopokoleniowe, długotrwała toksyczność narządowa). Przy interpretacji wyników należy uwzględniać różnice gatunkowe w warunkach ekspozycji, farmakokinetyce, metabolizmie i złożoności tkanek. Polskie Towarzystwo Zebrafish zaleca stosowanie danio przede wszystkim w warstwowej strategii badań toksykologicznych, w której może ono zastąpić lub ograniczyć wybrane eksperymenty gryzoniowe na etapach wczesnych i pośrednich, filtrować związki przed badaniami ssaczymi, optymalizować projekt eksperymentu i wzmacniać wdrożenie zasad 3R przy zachowaniu trafności translacyjnej.

Neurologia i neuropsychiatria

Polskie Towarzystwo Zebrafish rekomenduje danio jako model analizy mechanizmów padaczki, zaburzeń lękowych, depresyjnych, uzależnień oraz funkcji poznawczych w badaniach neurologicznych i neuropsychiatrycznych, w tym neuropsychofarmakologicznych. Modele larwalne są szczególnie wartościowe, ponieważ umożliwiają wysokoprzepustowe analizy behawioralne i farmakologiczne przy wysokich standardach etycznych. Eksperymenty na larwach do 5 dpf uznaje się za akceptowalną alternatywę dla badań na dorosłych kręgowcach, umożliwiając ocenę substancji psychoaktywnych bez istotnego naruszenia dobrostanu zwierząt (Costalonga Rodrigues i wsp., 2025; Hillman i wsp., 2026).

Danio wykazuje wysoki stopień konserwacji szlaków neurologicznych i neuroendokrynnych w porównaniu z człowiekiem (Kalueff i wsp., 2016; Stewart i wsp., 2012). Dotyczy to m.in. obecności osi podwzgórze-przysadka-międzynerczo (HPI), homologicznej do ssaczej osi podwzgórze-przysadka-nadnercze (HPA), z konserwowaną syntezą kortyzolu jako głównego hormonu stresu (Alsop i Vijayan, 2009). Danio ma także dobrze zorganizowane układy neuroprzebieżnikowe: serotonergiczny,

dopaminergiczny, glutaminianergiczny i GABA-ergiczny (Panula i wsp., 2006).

Istotnym obszarem zastosowań jest padaczka. U larw można indukować napady pentylentetrazolem (PTZ), co stanowi wiarygodną alternatywę dla testów ssaczych. Równolegle opracowano genetyczne modele padaczki oparte na mutacjach genów homologicznych do epileptogennych genów człowieka. Przykładem jest *scn1lab*, odpowiednik ludzkiego *SCN1A* związanego z zespołem Draveta. Mutacje *SCN1A* u człowieka prowadzą do upośledzenia funkcji hamujących interneuronów i zaburzenia równowagi pobudzająco-hamującej, a mutanty *scn1lab* odtwarzają te mechanizmy: zmniejszoną sygnalizację GABA-ergiczną, napady spontaniczne i indukowane oraz nieprawidłowe wzorce aktywności neuronalnej (Baraban i wsp., 2013; Dinday i Baraban, 2015).

Mutanty te wykazują spontaniczne lub indukowane napady, zmienioną aktywność neuronalną i fenotypy behawioralne odpowiadające ciężkim postaciom padaczki u człowieka (Baraban i wsp., 2007). Zarówno modele indukowane PTZ, jak i oparte na *scn1lab*, umożliwiają ocenę dysfunkcji sieci neuronalnej z użyciem elektrofizjologii i obrazowania wapniowego, dostarczając bezpośredniego wglądu w dynamikę napadów. Modele te nie odtwarzają pełnej złożoności padaczki człowieka — zwłaszcza przewlekłej progresji choroby i funkcji wyższych — ale wiernie odwzorowują kluczowe mechanizmy nadpobudliwości neuronalnej i dysfunkcji obwodów.

Układ serotoninergiczny — enzymy syntezujące serotoninę, transportery i receptory — pełni u danio funkcje analogiczne do ssaczych: regulację nastroju, lęku, impulsywności, snu i zachowań społecznych. Zbieżność neurochemii i neurofizjologii sprawia, że behawioralne modele danio odzwierciedlają kluczowe elementy ludzkich zaburzeń neuropsychiatrycznych i neurodegeneracyjnych, wykazując wysoką wartość predykcyjną (Stewart i wsp., 2012).

Badania zachowań lękowych u danio wykorzystują standaryzowane testy prowadzone na larwach w okolicach 5 dpf (Kalueff i wsp., 2016; Stewart i wsp., 2012): test otwartego pola (tigmotaksja), test preferencji światło-ciemność oraz reakcje na nagłe zmiany oświetlenia (light-dark challenge). W tych warunkach związki anksjolityczne redukują zachowania interpretowane jako lękowe (unikanie otwartych przestrzeni lub ciemności) w sposób porównywalny do klasycznych modeli gryzoniowych (Blaser i Gerlai, 2006; Maximino i wsp., 2010).

Danio nadaje się także do analizy zachowań społecznych i interakcji. Ocenia się shoaling oraz

preferencje społeczne starszych larw i osobników młodocianych, co pozwala badać genetyczne i farmakologiczne wpływy na funkcje społeczne (Dreosti i wsp., 2015; Hoffman i wsp., 2016). Testy te stosowano do modelowania stanów neurorozwojowych istotnych dla zaburzeń ze spektrum autyzmu i do identyfikacji związków poprawiających fenotypy społeczne w genetycznie wrażliwych liniach. Ekspozycja na substancje działające na OUN zmienia te zachowania, co potwierdza przydatność danio w translacyjnej neuronauce społecznej (Dreosti i wsp., 2015; Geng i wsp., 2023). Modele te pozwoliły zidentyfikować i scharakteryzować związki terapeutyczne, których skuteczność potwierdzono następnie w badaniach ssaczych i ludzkich. Wysokoprzepustowy skrining fenotypowy w modelach padaczkowych (PTZ i *scn1lab*) prowadzi się zwykle w formatach wielodołkowych z automatycznym śledzeniem lokomocji i/lub odczytami elektrograficznymi (lokalne potencjały polowe) w celu kwantyfikacji aktywności napadowej (Dinday i Baraban, 2015). Związki są identyfikowane jako „hity” na podstawie istotnej redukcji zachowań napadowych (np. wysokopędkich zrywów ruchowych) i normalizacji sygnatur elektrograficznych w porównaniu z mutantami nieleczonymi. Klasycznym przykładem jest klemizol, zidentyfikowany w skriningu jako silny supresor napadów w modelu *scn1lab* zespołu Draveta (Baraban i wsp., 2013). Po skriningu pierwotnym kandydaci przechodzą ustrukturyzowaną walidację: (i) potwierdzenie skuteczności w niezależnych testach (behawioralnych i elektrofizjologicznych), (ii) analizę zależności dawka-odpowiedź dla wyznaczenia okien terapeutycznych, (iii) ocenę toksyczności i efektów off-target oraz (iv) testy w uzupełniających paradygmatach napadowych (np. PTZ). Walidację mechanistyczną wspiera profilowanie farmakologiczne (modulacja serotoninergiczna, GABA-ergiczna) i — gdy to możliwe — badania interakcji genetycznych. Obiecujący kandydaci są następnie walidowani w modelach gryzoniowych, a w niektórych przypadkach przechodzą do oceny klinicznej, co świadczy o translacyjnej wartości tej ścieżki. Skrining w danio przyczynił się do identyfikacji i oceny wielu klas związków istotnych w zespole Draveta — modulatorów serotoninergicznych, takich jak fenfluramina (Sourbron i wsp., 2016), a także klas nieklasycznych odkrytych w skriningu fenotypowym, np. syntetycznych kannabinoidów (Griffin i wsp., 2020). Łącznie podkreśla to zdolność testów na danio nie tylko do walidacji znanych mechanizmów, ale i do odkrywania nieoczywistych kandydatów przeciwnapadowych poza klasycznymi rodzinami leków przeciwpadaczkowych, co wspiera ich

użyteczność w odkrywaniu terapii precyzyjnej.

W badaniach neuropsychiatrycznych klasyczne leki serotonergiczne, fluoksetyna i citalopram, wywołują u danio efekty behawioralne zgodne z ich działaniem przeciwdepresyjnym i anksjolitycznym u człowieka. Trafność translacyjną tych obserwacji potwierdzają badania zarówno na dorosłych rybach, jak i larwach w 5 dpf (Airhart i wsp., 2007; Egan i wsp., 2009; MacRae i Peterson, 2015; Wong i wsp., 2013).

Danio jest szczególnie użytecznym kręgowcowym systemem do badania konserwowanych procesów neurobiologicznych leżących u podłoża podatności na napady, reaktywności na stres i zachowań lękowych. Jego siła polega na możliwości łączenia manipulacji genetycznej, obrazowania *in vivo* i ilościowych odczytów behawioralnych w stosunkowo szybkim, skalowalnym układzie. Interpretacja powinna pozostać ostrożna, zwłaszcza przy rozszerzaniu wniosków na złożone ludzkie schorzenia neurologiczne i psychiatryczne. Modele danio nie odtwarzają pełnej klinicznej i poznawczej złożoności zaburzeń takich jak przewlekła padaczka, ciężkie zaburzenia afektywne czy zaawansowane zespoły lękowe. Z tego powodu są szczególnie cenne w badaniach mechanistycznych, wczesnym fenotypowaniu funkcjonalnym i porównawczym skryningu farmakologicznym, podczas gdy wybrane pytania dotyczące długoterminowego przebiegu choroby, złożonych stanów emocjonalnych lub zaawansowanej dysfunkcji poznawczej mogą nadal wymagać walidacji w modelach ssaczych.

Choroby metaboliczne

Polskie Towarzystwo Zebrafish rekomenduje danio do badań chorób metabolicznych — otyłości, dyslipidemii, cukrzycy, niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby, chorób spichrzeniowych oraz zaburzeń metabolicznych związanych z chorobami sercowo-naczyniowymi. Danio jest ugruntowanym modelem patogenezy i leczenia cukrzycy typu 1 i 2, otyłości, stłuszczenia wątroby i zaburzeń metabolizmu lipidów (Angom i Nakka, 2024; Benchoula i wsp., 2019; Vivekaa i wsp., 2025; Yang i wsp., 2025). Zarówno larwy, jak i osobniki dorosłe są rekomendowane do badań mechanistycznych, wczesnego modelowania choroby i wysokoprzepustowego skryningu *in vivo*, zależnie od badanego procesu. Larwy szczególnie nadają się do badań wczesnej dysregulacji metabolicznej, sygnalizacji insuliny, obróbki glukozy i skryningu lekowego. Dorosłe ryby są właściwsze dla długoterminowych fenotypów metabolicznych — otyłości, dyslipidemii, stłuszczenia wątroby i

zmian naczyniowych indukowanych dietą.

Obrazowanie *in vivo* narządów istotnych dla metabolizmu oraz wysoka konserwacja szlaków metabolicznych między danio a człowiekiem sprawiają, że danio zachowuje homologiczne hormony i mechanizmy regulujące homeostazę glukozy i lipidów, w tym insulinę, glukagon, receptory jądrowe oraz szlaki kontrolujące apetyt i magazynowanie lipidów. Cechy te czynią model wysoce odpowiednim do reprezentowania kluczowych aspektów ludzkiego metabolizmu i wczesnych odpowiedzi na interwencje farmakologiczne i dietetyczne (Elo i wsp., 2007; Mullapudi i wsp., 2018; Toyoshima i wsp., 2008).

W badaniach cukrzycy typu 2 modele insulinooporności wytwarza się u larw przez ekspozycję na podwyższone stężenia glukozy, czynniki diabetogenne (np. glikokortykosteroidy jak deksametazon) lub egzogenną insulinę, często w połączeniu z manipulacjami genetycznymi zwiększającymi podatność na hiperglikemię i zaburzenia węglowodanowe (Nam i wsp., 2021; Salehpour i wsp., 2021; Titalii-Torres i Morris, 2022). Modele te nie obejmują pełnej ogólnoustrojowej złożoności ludzkiej cukrzycy typu 2, ale wykazują cechy insulinooporności i upośledzonego metabolizmu glukozy oraz umożliwiają ocenę skuteczności i toksyczności kandydatów na leki

przeciwcukrzycowe *in vivo* (Nam i wsp., 2021; Salehpour i wsp., 2021). Ponad 70% genów metabolizmu węglowodanów/glukozy jest konserwowanych między danio, żabą, kurą, myszą i człowiekiem, a 57% z nich wiąże się z cukrzycą typu 2 u człowieka (Mullapudi i wsp., 2018; Zhang i wsp., 2018). Danio dzieli z człowiekiem kluczowe geny i szlaki metabolizmu węglowodanów — wydzielanie insuliny, insulinooporność i sygnalizację adipocytokinową — na zbliżonym poziomie (Md Razip i wsp., 2022; Sanni i wsp., 2023; Zang i wsp., 2017). Modele larwalne nie odwzorowują jednak w pełni przewlekłego zapalenia tkanki tłuszczowej i długoterminowej, zależnej od wieku progresji dysfunkcji metabolicznej (Cao i wsp., 2023; Mullapudi i wsp., 2018; Van De Venter i wsp., 2020; Zhang i wsp., 2018).

Danio jest także solidnym modelem cukrzycy typu 1 — opartym na selektywnej ablacji lub dysfunkcji komórek β trzustki. Linie transgeniczne ekspresjonujące nitroreduktazę pod kontrolą promotora insuliny pozwalają na indukowane, wysoce specyficzne zniszczenie komórek β po ekspozycji na metronidazol, co prowadzi do szybkiego, powtarzalnego niedoboru insuliny i hiperglikemii. Modele larwalne odtwarzają kluczowe cechy patofizjologiczne cukrzycy typu 1: utratę

endogennej produkcji insuliny, upośledzoną homeostazę glukozy i aktywację kompensacyjnych szlaków metabolicznych. Umożliwiają również wizualizację *in vivo* struktury i regeneracji wysp trzustkowych w czasie rzeczywistym (Curado i wsp., 2007; Pisharath i wsp., 2007). Systemy te są szeroko stosowane do badania utraty i regeneracji komórek β , mechanizmów cukrzycy niezależnych od układu odpornościowego oraz do skringingu drobnocząsteczek wspomagających przeżycie lub regenerację komórek β w warunkach bezpośrednio istotnych dla cukrzycy typu 1.

Danio jest również modelem chorób spichrzeniowych powodowanych niedoborem enzymu rozkładającego określoną substancję. Obejmuje to zaburzenia peroksysomalne, choroby lizosomalne i glikogenowe oraz deficyty enzymów mitochondrialnych. Zaburzenia te to często wrodzone patologie metaboliczne prowadzące do patologicznej akumulacji lipidów, glikogenu czy glikoprotein, co skutkuje dysfunkcją i uszkodzeniem komórek oraz tkanek.

Model danio dostarcza pogłębionego wglądu w szlaki metaboliczne: nietypowy handel pęcherzykowy, upośledzoną autofagię, dysregulowane szlaki sygnałowe, zmienioną homeostazę wapniową i dysfunkcję mitochondrialną (Boustany, 2013; Parenti i wsp., 2021). Na przykład model choroby Fabry'ego u danio — wywołany brakiem aktywności α -galaktozydazy A na skutek mutacji — odsłania dalsze aspekty patomorfologii: akumulacja globotriaosyloceramidu (Gb3) w lizosomach prowadzi do niewydolności narządów, a wyniki wskazują na niezależny mechanizm uszkodzenia nerek związany z alteracjami mitochondrialnymi i zaburzeniami glikolizy oraz metabolizmu galaktozy (Elsaid i wsp., 2023).

Dzięki trafności translacyjnej danio służy jako model nokautu genowego, umożliwiający analizę szlaków metabolicznych, mechanizmów kompensacyjnych i testowanie leków (Migocka-Patrzałek i wsp., 2020; Stefanik i wsp., 2024; T. Zhang i Peterson, 2020). Danio jest także uznanym modelem otyłości i dyslipidemii. Dorosłe ryby długotrwale przekarmiane lub żywione dietą wysokotłuszczową/wysokocholesterolową rozwijają fenotypy otyłości i zaburzeń lipidowych porównywalne do ssaczy. Diety wzbogacone cholesterolem indukują akumulację lipidów w ścianach naczyń i prowadzą do zmian podobnych do miażdżycy, podczas gdy kluczowe szlaki molekularne metabolizmu lipoprotein, zapalenia i utleniania lipidów pozostają konserwowane. Danio jest zatem użytecznym narzędziem badania patogenezy chorób sercowo-naczyniowych związanych z zaburzeniami metabolicznymi oraz testowania

interwencji dietetycznych i farmakologicznych poprawiających profil lipidowy i funkcję naczyń (Fang i wsp., 2014; Karimzadeh i wsp., 2025; Stoletov i wsp., 2009; Zang i wsp., 2018).

Modele danio w chorobach metabolicznych są szczególnie informatywne w badaniach utraty i regeneracji komórek β w cukrzycy, obróbki lipidów i odkładania lipidów w naczyniach w dyslipidemiach, wewnątrzkomórkowej akumulacji substratów w chorobach spichrzeniowych oraz wczesnych interakcji metaboliczno-sercowo-naczyniowych poprzedzających jawne uszkodzenie narządów. Niektóre aspekty wymagają ostrożnej interpretacji: długoterminowa progresja przewlekłych zaburzeń metabolicznych, pełna złożoność regulacji endokrynej i wybrane powikłania związane z fizjologią dorosłych narządów mogą nie być w pełni odwzorowane, zwłaszcza w modelach larwalnych. Różnice w fizjologii odżywiania, długości życia, składzie ciała i ogólnoustrojowej integracji metabolicznej należy uwzględniać przy ekstrapolacji wniosków na człowieka. Ograniczenia te definiują jednak głównie granice interpretacji i nie umniejszają znaczącej wartości danio dla badań mechanistycznych i translacyjnych w metabolizmie.

Polskie Towarzystwo Zebrafish zaleca stosowanie danio, gdy pytanie badawcze wymaga obrazowania *in vivo*, podatności genetycznej, szybkiego fenotypowania lub etycznie zoptymalizowanych podejść skringingowych, jednocześnie uznając, że zaawansowana złożoność endokrynną i długoterminowe konsekwencje choroby mogą wymagać walidacji w modelach ssaczy. Z perspektywy zasad 3R model może istotnie wspierać strategię zastąpienia i ograniczenia jako model komplementarny lub — gdy to właściwe — częściowe zastąpienie na wczesnych i pośrednich etapach badań, zwłaszcza w generowaniu hipotez, analizie szlaków i priorytetyzacji kandydatów lekowych przed walidacją u gryzoni.

Immunologia

Polskie Towarzystwo Zebrafish rekomenduje danio do badań odpowiedzi immunologicznej — mechanizmów zapalnych i modeli o wysokiej rozdzielczości służących analizie oddziaływań gospodarz-patogen na poziomie molekularnym, komórkowym i populacyjnym w zakażeniach bakteryjnych i wirusowych. Główną cechą modelu jest ontogeneza układu odpornościowego: w pierwszym tygodniu życia larwy danio dysponują wyłącznie funkcjonalną odpornością wrodzoną, a komponenty odporności nabytej rozwijają się dopiero po kilku

tygodniach (Lam i wsp., 2004). To czasowe rozdzielenie daje podwójną perspektywę: stanowi istotną przewagę eksperymentalną dla wybiórczego badania mechanizmów odporności wrodzonej (odpowiedzi neutrofilów i makrofagów) bez interferencji odporności nabytej, ale stanowi też ograniczenie dla badań złożonych odpowiedzi limfocytów lub długoterminowej pamięci immunologicznej w stadiach larwalnych.

Przezroczystość larw w połączeniu z bogatym zestawem linii transgenicznymi o fluorescencyjnie znakowanych komórkach układu immunologicznego umożliwia bezpośrednią wizualizację migracji leukocytów, dynamiki zapalenia i interakcji gospodarz-patogen w żywym organizmie. Powszechnie stosowane linie to *Tg(mpx:GFP)* do monitorowania neutrofilów (Renshaw i wsp., 2006) oraz *Tg(mpeg1:mCherry)* dla makrofagów (Ellett i wsp., 2011). Modele te są często wykorzystywane w badaniach neurozapaleń, zapaleń jelit, zapaleń skóry i stłuszczeniowego zapalenia wątroby, umożliwiając monitorowanie naciekania komórek immunologicznych *in vivo* oraz ocenę działania środków immunomodulujących i przeciwzapalnych w czasie rzeczywistym.

Ważnym zastosowaniem immunologicznego modelu danio są badania patogenezy i terapii zakażeń bakteryjnych i wirusowych. Klasycznym przykładem jest zakażenie larw *Mycobacterium marinum* — bliskim krewnym *Mycobacterium tuberculosis*. W zakażonych larwach powstają struktury podobne do ziarniniaków, a przebieg zakażenia i odpowiedź gospodarza można analizować w czasie rzeczywistym dzięki przezroczystości organizmu. Model ten umożliwił identyfikację kluczowych czynników wirulencji patogenu i mechanizmów obronnych gospodarza istotnych dla patogenezy gruźlicy oraz wysokoprzepustowy skrining nowych leków przeciwprątkowych. Model zakażenia *M. marinum* skutecznie odwzorowuje charakterystyczne cechy patologiczne gruźlicy człowieka — zwłaszcza formowanie zorganizowanych ziarniniaków zbudowanych z agregatów makrofagów przechodzących transformację epitelioidalną (Cronan i wsp., 2016). Model ma jednak swoje ograniczenia: stadium larwalne nie posiada odpowiedzi zależnych od limfocytów T charakteryzujących dojrzałe ziarniniaki ludzkie, a niższa fizjologiczna temperatura danio (28–30°C wobec 37°C u człowieka) może wpływać na tempo metaboliczne patogenu i kinetykę odpowiedzi immunologicznej (Tobin i Ramakrishnan, 2008). Mimo tych różnic siłą modelu jest możliwość wglądu w czasie rzeczywistym, z wysoką rozdzielczością, w najwcześniejsze etapy zakażenia i inicjację ziarniniaka — w dużej mierze niedostępne w modelach ssaczy (Ramakrishnan, 2012).

Poza gruźlicą analogiczne podejścia służą badaniu zakażeń wywołanych przez inne patogeny, m.in. *Salmonella Typhimurium* i *Staphylococcus aureus*, co podkreśla szerokie zastosowanie modelu w immunologii i mikrobiologii (Meijer i Spaink, 2011).

Danio stało się ostatnio popularnym modelem badania odporności komórkowo-autonomicznej — sposobu, w jaki pojedyncze komórki wykorzystują odpowiedź autofagiczną do eliminacji patogenów wewnątrzkomórkowych. Linia reporterowa *Tg(CMV:GFP-Lc3)* umożliwia śledzenie rekrutacji markera autofagii LC3 do wakuoli bakteryjnych w czasie rzeczywistym (He i wsp., 2009). Poza *M. marinum*, badania z udziałem *S. aureus* i *S. Typhimurium* wykorzystywały ten model do wykazania, jak kanoniczne i niekanoniczne szlaki autofagii wpływają na interakcje gospodarz-patogen (Masud i wsp., 2019; Prajsnar i wsp., 2021; Zhang i wsp., 2019). Mechanizmy te analizuje się zwykle wysokorozdzielczą mikroskopią połączoną z wyciszaniem genów szlakospecyficznych, co daje wgląd w obsługę zakażenia przez gospodarza na poziomie subkomórkowym (Michno i wsp., 2025). Choć danio nie zastąpi całkowicie modeli ssaczy we wszystkich aspektach immunologii człowieka — zwłaszcza wymagających złożonej architektury

tkanek ssaczy lub kinetyki właściwej dla 37°C — pełni rolę kluczowego pomostu między analizami *in vitro* a badaniami *in vivo* u ssaków, realizując zasady 3R poprzez udoskonalanie projektu eksperymentu i ograniczanie wykorzystania wyższych kręgowców.

Kardiologia

Polskie Towarzystwo Zebrafish rekomenduje danio w badaniach sercowo-naczyniowych: zarówno podstawowych badaniach rozwoju i funkcji serca, jak i farmakologicznej oceny bezpieczeństwa, szczególnie kardiotoksyczności i potencjału proarytmicznego leków (Langheinrich i wsp., 2003; Maciag i wsp., 2022; Milan i wsp., 2003). Mimo prostszej budowy anatomicznej serce danio wykazuje istotne podobieństwa fizjologiczne do ludzkiego, zwłaszcza w zakresie elektrofizjologii i mechanizmów kurczliwości (Stainier, 2001).

Obecność homologów kluczowych kanałów jonowych serca, w tym kanału hERG, sprawia, że danio reaguje na leki wydłużające odstęp QT podobnie do człowieka. Wykazano to w badaniach farmakologicznych na zarodkach, larwach i osobnikach dorosłych (Langheinrich i wsp., 2003; Milan i wsp., 2003).

W badaniach przedklinicznych larwy danio służą do oceny wpływu związków na rytm i częstość serca oraz zaburzenia przewodzenia, z wykorzystaniem szybkiego obrazowania wideo i ilościowych metod analizy. Ocena tych parametrów umożliwia wczesną identyfikację związków o potencjale arytmogennym lub kardiotoksycznym, bez konieczności przechodzenia do badań ssaczy lub klinicznych. Jednocześnie przezroczystość larw pozwala na jednoczesną ocenę hemodynamiki sercowej i zmian strukturalnych serca oraz naczyń (Langheinrich i wsp., 2003; Maciag i wsp., 2022).

Kardiologiczne testy na danio dostarczyły wielu konkretnych i translacyjnie istotnych przykładów udanych zastosowań. We wczesnym, przełomowym badaniu związku znane z wywoływania zaburzeń repolaryzacji i wydłużania QT u człowieka konsekwentnie wywoływały bradykardię i blok przedsionkowo-komorowy u danio; 22 z 23 klinicznie istotnych związków zostało zidentyfikowanych w teście jako pozytywne, co potwierdza przydatność danio we wczesnym wykrywaniu zagrożenia proarytmicznego (Milan i wsp., 2003). Poza skринingiem toksykologicznym testy kardiologiczne na danio przyczyniły się do odkryć mechanistycznych: z użyciem strategii skринingu uwrażliwionego lekowo zidentyfikowano 15 genów wpływających na repolaryzację serca, w tym GINS3, którego ludzki ortolog mapuje do locus związanego z odstępem QT w badaniach asocjacyjnych całogenomowych, co potwierdza wartość modelu w odkrywaniu konserwowanych regulatorów elektrofizjologii mięśnia sercowego (Milan i wsp., 2009). Danio okazało się też użyteczne w odkrywaniu terapii: w modelu kardiomiopatii indukowanej doksorubicyną przesiew 3 000 związków wskazał wisnaginę i difenylomocznik jako cząsteczki kardioprotekcyjne, ratujące wydolność serca i wady krążenia, z następną walidacją u myszy — co podkreśla translacyjny potencjał testów na danio w identyfikacji kandydatów kardioprotekcyjnych (Liu i wsp., 2014). Łącznie badania te pokazują, że testy kardiologiczne na danio wspierają nie tylko wykrywanie związków kardiotoksycznych i arytmogennych, ale także odkrycia mechanistyczne i identyfikację terapeutycznie istotnych drobnocząsteczek.

Danio jest też szeroko wykorzystywane do badania mechanizmów chorób serca i regeneracji. Dorosłe osobniki potrafią regenerować mięsień sercowy po uszkodzeniu lub zawale przez deróżnicowanie i proliferację istniejących kardiomiocytów. Zdolność ta, nieobecna u dorosłych ssaków, czyni danio unikalnym modelem badania regeneracji serca i

identyfikacji szlaków molekularnych będących potencjalnymi celami terapeutycznymi w chorobach sercowo-naczyniowych człowieka (Jopling i wsp., 2010).

Niektóre aspekty badań sercowo-naczyniowych wymagają ostrożnej interpretacji w danio. Model odwzorowuje wiele konserwowanych cech elektrofizjologii serca, kurczliwości i indukowanych lekami zaburzeń funkcjonalnych, lecz nie odtwarza w pełni strukturalnej i fizjologicznej złożoności układu sercowo-naczyniowego człowieka, zwłaszcza serca czterojamowego, krążenia wieńcowego i procesów przewlekłej przebudowy. Uwagi te są szczególnie istotne dla zaburzeń wymagających długoterminowej obserwacji patologii serca u osobników dorosłych lub złożonych ogólnoustrojowych interakcji hemodynamicznych. Wyniki uzyskane na danio najlepiej interpretować jako wysoce informatywne we wczesnej analizie funkcjonalnej i odkrywaniu szlaków oraz jako mocną podstawę dalszych badań, gdy konieczne jest objęcie szerszej złożoności sercowo-naczyniowej.

Genetyczne modele chorób człowieka

Polskie Towarzystwo Zebrafish rekomenduje danio jako genetyczny model chorób człowieka, zwłaszcza zaburzeń monogenowych i stanów wynikających z dysregulacji kluczowych szlaków molekularnych. Modele te dobrze odpowiadają na pytania: czy dany kandydat wariantu chorobotwórczego jest patogenny *in vivo*; jak zaburzenia konserwowanych szlaków wpływają na rozwój i funkcję narządów; które modyfikatory genetyczne lub farmakologiczne mogą ratować fenotyp chorobowy. Około 70% ludzkich genów kodujących białka ma co najmniej jeden ortolog u danio, a wartość ta rośnie powyżej 80% dla genów związanych z chorobami człowieka, przy wysokiej konserwacji rdzeniowych szlaków rozwojowych i sygnałowych. W odróżnieniu od silnie wsobnych szczepów myszy linie danio zwykle zachowują większą zmienność genetyczną, co bliżej odzwierciedla heterogeniczność populacji ludzkich (Howe i wsp., 2013; Kettleborough i wsp., 2013; Navratilova i wsp., 2009). Wysoki stopień homologii genetycznej między danio a człowiekiem sprawia, że celowane mutacje w genach ortologicznych pozwalają odtwarzać fenotypy chorobowe obserwowane u pacjentów (Lieschke i Currie, 2007; MacRae i Peterson, 2015). Wykorzystanie danio adresuje obawy dotyczące zmienności genetycznej jako czynnika zakłócającego translację z badań przedklinicznych do klinicznych — umożliwiając

badania na różnych tłach genetycznych i szybkie generowanie wielu alleli mutantowych, dostarcza platformy do oceny odporności i powtarzalności fenotypów chorobowych i efektów terapeutycznych przed kosztownymi badaniami ssaczymi i klinicznymi (Balik-Meisner i wsp., 2018; Brown i wsp., 2012).

Danio jest wartościowym kręgowcowym modelem do badania chorób rzadkich i nieznanymi wariantów genowych o potencjalnie patologicznych konsekwencjach. Dostępność narzędzi genetycznych, takich jak sekwencjonowanie nowej generacji (NGS), w połączeniu ze stosunkowo łatwym generowaniem mutantów metodą CRISPR-Cas9, umożliwia wysokoprzepustowy skrining funkcjonalny kandydujących genów i wariantów. Danio jest też użytecznym modelem zrozumienia patologii ludzkich wariantów dzięki łatwości identyfikacji obserwowalnych fenotypów wynikających z zaburzenia funkcji genu w trakcie rozwoju. Testy funkcjonalne mogą określać potencjalną patogenność wariantów o niepewnym znaczeniu. Model ten dopuszcza również analizy molekularne i biochemiczne oraz przedkliniczne testowanie leków. Wspiera eksperymentalną walidację genetyki człowieka, umożliwiając identyfikację nowych wariantów związanych z chorobami rzadkimi (Angom i Nakka, 2024; Choi i wsp., 2021; Lin i wsp., 2025; Sarosiak i wsp., 2025; Varshney i wsp., 2016). Jest szczególnie przydatny we wczesnych etapach badań – do szybkiego określania funkcji genów, oceny skutków mutacji oraz skriningu *in vivo* potencjalnych strategii farmakologicznych i genowych (Lieschke i Currie, 2007). W praktyce techniki celowanej mutagenezy, w tym CRISPR/Cas9, są szeroko stosowane do tworzenia linii danio niosących mutacje odpowiadające ludzkim wariantom patogennym (Hwang i wsp., 2013), co pozwala modelować szerokie spektrum chorób genetycznych.

Danio znalazło zastosowanie w modelowaniu chorób mięśniowych i ruchowych: miopatii (m.in. Duchenne'a, obręczowo-kończynowych), sarkopenii (osłabienie mięśniowe związane z wiekiem i zaburzenia indukowane dietą), chorób neuronu ruchowego (np. rdzeniowy zanik mięśni, SMA) oraz zaburzeń ruchowych (Charcot-Marie-Tooth, choroba Parkinsona) (Garg i Geurten, 2024; Plantié i wsp., 2015; Vaz i wsp., 2018; Zhao i wsp., 2024). Model Duchenne'a tworzy się przez celowane mutacje w genie dystrofiny, dając manifestacje fenotypowe charakterystyczne dla dystrofii mięśniowej Duchenne'a: wyraźne osłabienie mięśni, deficyty lokomocyjne i postępującą degenerację włókien mięśni szkieletowych (Bassett i wsp., 2003). Opracowano protokoły testowania zachowania ruchowego, struktury włókien mięśniowych i ich wydolności. Test ucieczki indukowanej dotykiem i testy lokomocyjne służą kwantyfikacji przyspieszenia i aktywności pływania, dostarczając danych o

wydolności i funkcji mięśni we wczesnym rozwoju (Sztal i wsp., 2016). Strukturę włókien analizuje się zwykle wysokorozdzielczą mikroskopią 3D (Van Meer i wsp., 2025). Techniki bazujące na przetwornikach siły, w których larwy są stymulowane elektrycznie, służą pomiarom właściwości kurczliwych i kinetyki mięśni (Shorten i wsp., 2007; Sloboda i wsp., 2013). Dostępne są modele żywych biosensorów ekspresjonujące fluorescencyjne białka reporterowe pod kontrolą promotorów mięśniowo-specyficznych lub elementów odpowiedzi, co pozwala obserwować dynamiczne procesy, takie jak różnicowanie komórek mięśniowych, skurcz i obrót białek motorycznych (Moro i wsp., 2013; Tesoriero i wsp., 2023). Fluorescencyjne reportery mięśniowe nadają się do szybkiego skriningu całożarodkowego i monitorowania globalnej aktywności mięśniowej w czasie. Analizę można prowadzić mikroskopią epifluorescencyjną z time-lapse oraz konfokalnym skanowaniem laserowym dla szczegółowej analizy pojedynczych komórek i włókien oraz rekonstrukcji 3D (Facchinello i wsp., 2016; Moro i wsp., 2013; Tesoriero i wsp., 2023). Mikroskopia konfokalna z dyskiem wirującym pozwala obrazować procesy dynamiczne (wzrost włókien, dynamikę sygnału Ca^{2+}) dzięki

ograniczonej fototoksyczności (Webb i wsp., 2012). Mikroskopia dwufotonowa służy obrazowaniu głębokich struktur (mięśnie wewnętrzne, połączenia nerwowo-mięśniowe) w późniejszych stadiach rozwoju, gdy larwy stają się mniej przezroczyste (Oralová i wsp., 2019). Dostępne są też biosensory molekularne oparte na fluorescencyjnym rezonansie energii (FRET), umożliwiające badanie aktywności białek w żywych zarodkach (Kardash i wsp., 2011). Różnicowanie mięśni i kwantyfikację aktywności szlaków podczas miogenezy można uzyskać dzięki transgenicznym biosensorom – ekspresjonującym białka fluorescencyjne pod kontrolą elementów cis-regulatorowych szlaków sygnałowych (Facchinello i wsp., 2016; Moro i wsp., 2013). Modele te wykorzystano do testowania strategii terapeutycznych, w tym interwencji farmakologicznych i genoterapii, mających przywrócić funkcję białka lub skompensować jego brak.

Genetyczne modele danio są również szeroko stosowane w badaniach chorób metabolicznych i rozwojowych, w których mutacje pojedynczego genu zaburzają funkcję narządów takich jak wątroba, trzustka czy nerki. Przezroczystość larw umożliwia bezpośrednią ocenę nieprawidłowości rozwojowych i czynnościowych tych narządów, a wysoka płodność i szybki

rozwój pozwalają analizować duże kohorty w krótkim czasie. Wykorzystanie danio jako genetycznego modelu chorób przyspiesza zatem identyfikację genów chorobotwórczych i wspiera rozwój podejść medycyny precyzyjnej integrujących dane genetyczne z funkcjonalnym fenotypowaniem *in vivo* (Lieschke i Currie, 2007; MacRae i Peterson, 2015).

W badaniach chorób genetycznych kluczową kwestią wymagającą ostrożnej interpretacji nie jest sama użyteczność modelu, lecz stopień, w jakim dany fenotyp u danio odzwierciedla pełną prezentację kliniczną u człowieka. Choć zaburzenie genów ortologicznych często ujawnia konserwowane mechanizmy rozwojowe i molekularne, uzyskany fenotyp może obejmować jedynie wybrane składowe spektrum choroby. Jest to szczególnie istotne w zaburzeniach zależnych od kontekstu tkankowo-specyficznego, fizjologii postnatalnej, tła genetycznego lub długoterminowej progresji. Duplikacje genów u danio i obecność genów paralogicznych mogą utrudniać bezpośrednie porównanie z ludzkimi schorzeniami monogenowymi i należy je uwzględniać w projekcie eksperymentu i interpretacji danych. Z tego powodu wyniki uzyskane w danio są szczególnie informatywne na poziomie funkcji genu, oceny wariantu i wczesnego mechanizmu choroby, natomiast szersze korelacje genotyp-fenotyp mogą wymagać integracji z uzupełniającymi danymi ssaczymi lub klinicznymi. Danio należy uznawać za preferowany pierwszy kręgowcowy model do analiz funkcji genu (utrata i wzmocnienie funkcji) przed zastosowaniem systemów ssaczyc. Strategia ta jest w pełni zgodna z zasadami 3R — wczesna walidacja i skrining w danio mogą istotnie zmniejszyć liczbę wymaganych eksperymentów ssaczyc i doprecyzować hipotezy przed przejściem do bardziej złożonych i etycznie wymagających modeli.

Dyskusja

Skuteczność translacji kandydatów na leki z fazy przedklinicznej do zatwierdzonych terapii pozostaje jednym z najtrwalszych problemów nauk biomedycznych. Wskaźnik niepowodzeń od fazy przedklinicznej do rynku przekracza 92% — wartość niezmienna od trzech dekad. Jakość generowanych danych była przedmiotem kontrowersji, co doprowadziło do rozwoju ulepszonych metodologii i strategii. Badań eksploracyjnych i przedklinicznych nie można prowadzić na ludziach, pozostaje więc kilka opcji eksperymentalnych. Spośród dostępnych podejść systemy *in vitro* mają w tym kontekście najpoważniejsze ograniczenia. Klasyczne hodowle 2D są szeroko stosowane, jednak od lat

uznaje się, że ich wartość informacyjna jest zbyt ograniczona. Pewną poprawą był rozwój hodowli 3D, lecz zależności fizjologiczne i efekty komórka-komórka pozostają w tym układzie niedostępne.

Rozwój NAM (New Alternative Methodologies; używane są też inne rozwinięcia tego akronimu) zapowiada rozwiązanie podstawowych problemów klasycznej pracy *in vitro*. NAM obejmują organoidy, narządy na chipie i podobne systemy. Adresują niektóre kwestie, np. interakcje narząd-narząd, ale nie oddają pełnej fizjologii organizmu — kluczowej w badaniach farmakokinetyki i metabolomiki leków. Jedyną realną alternatywą pozostają zwierzęce modele eksperymentalne. Mają one jednak ograniczenia powiększające trudności eksperymentalne. Najpopularniejszym modelem jest mysz laboratoryjna. Modele mysie dają pozytywne wyniki przedkliniczne w 90–95% badań, ale do zarejestrowanych leków przechodzi mniej niż 8–10% wyników. W onkologii wartość ta spada do 3,5%. W zapaleniach i neurodegeneracji bilans jest jeszcze gorszy. Nie jest to głównie problem nieadekwatności biologii myszy, lecz kwestia projektu badań, błędu publikacyjnego, błędu płci (większość badań wykorzystuje samce), braku zmienności genetycznej i nieodzworowania pełnej złożoności ludzkiej immunologii i metabolizmu. Dodatkowo badania mysie są wolne, kosztowne i obciążone znaczącymi wymogami administracyjnymi. Obecne regulacje prawne i etyczne, wymuszone niskim wskaźnikiem „myszy do kliniki”, sprawiają, że model ten staje się coraz mniej praktyczny w wielu zastosowaniach (Begley i Ellis, 2012; Hutchinson i Kirk, 2011; Kola i Landis, 2004).

Z tego powodu wykorzystanie danio w badaniach przedklinicznych systematycznie rośnie, w kilku obszarach przewyższając stosowanie myszy. Należy podkreślić, że danio do 120 hpf, niepływające i nieodżywiające się samodzielnie, jest uznawane za NAM zgodnie z Dyrektywą UE 2010/63. FDA opracowała ponadto projekt wytycznych dotyczących stosowania NAM w badaniach przedklinicznych, otwierając drogę do wykorzystania danio w tego typu badaniach (<https://www.fda.gov/news-event/s/press-announcements/fda-achieves-year-1-goal-s-reducing-animal-testing-drug-development>). Wyróżniają się dwa kluczowe typy badań przedklinicznych. Pierwszy to wysokoprzepustowy prefiltr bezpieczeństwa i identyfikator hitów fenotypowych — w tej dziedzinie danio okazuje się obecnie modelem o najwyższej wartości predykcyjnej, szczególnie w badaniach kardiotoxyczności leków. Drugim beneficjentem są zastosowania w postaci avatarów rakowych danio — strategię obecnie

niezastąpione przez inne podejścia, stosowane klinicznie z bezpośrednią korzyścią dla pacjentów.

Rekomendujemy zatem stosowanie danio jako najbardziej produktywnej ścieżki przedklinicznej — wczesnoetapowego filtru ograniczającego liczbę związków wchodzących do drogich i nisko-przepustowych badań ssaczych lub tanich, lecz mało informatywnych modeli *in vitro* 2D.

Praktyczne ramy wdrożenia podejść opartych na danio w badaniach biomedycznych

Dla szerszego i bardziej systematycznego wdrażania danio w badaniach biomedycznych implementacja powinna opierać się na ustrukturyzowanych ramach „fit-for-purpose”, a nie na traktowaniu modelu jako uniwersalnego zastąpienia systemów ssaczych. Pierwszym krokiem jest zdefiniowanie głównego celu badania, ponieważ danio pełni różne role: wczesny skrining fenotypowy, ocenę toksyczności, badania mechanistyczne, modelowanie choroby lub wstępną walidację terapii. Jasne określenie celu jest niezbędne dla wyboru projektu eksperymentu i integracji danych z modelu z całym przebiegiem pracy badawczej.

Drugim krokiem jest dopasowanie pytania biologicznego do najważniejszego stadium rozwojowego i formatu testu. Zarodki i larwy są szczególnie korzystne dla zastosowań wysokoprzepustowych, obrazowania *in vivo*, analiz reporterowych oraz wczesnego skriningu bezpieczeństwa i skuteczności. Mały rozmiar, przezroczystość i kompatybilność z platformami wielodołkowymi czynią je użytecznymi w badaniach wymagających szybkiego, skalowalnego fenotypowania. Bardziej złożone punkty końcowe — fizjologiczne, behawioralne lub długoterminowe — mogą wymagać starszych larw lub osobników dorosłych. Wdrożenie powinno zatem zależeć nie tylko od obszaru choroby, lecz także od poziomu złożoności biologicznej potrzebnej do udzielenia odpowiedzi.

Kluczowe jest dobranie solidnych, biologicznie istotnych punktów końcowych. Zależnie od obszaru zastosowania mogą to być: przeżycie, morfologia, toksyczność narządowa, rytm i częstość serca, aktywność lokomocyjna, rekrutacja komórek zapalnych, fluorescencja reportera, zmiany metaboliczne lub fenotypy guza. Punkty końcowe należy wybierać na podstawie ich trafności translacyjnej i powtarzalności, a nie wyłącznie wygody technicznej. Gdy to możliwe, testy powinny mierzyć fenotypy funkcjonalnie powiązane ze znanymi mechanizmami choroby lub celami terapeutycznymi.

Praktyczna implementacja wymaga standaryzacji testów. Każdy protokół powinien definiować: stadium rozwojowe, okno ekspozycji, sposób dostarczenia związku, stężenie ekspozycji, parametry środowiskowe, kryteria wyłączenia i moment odczytu punktu końcowego. Kontrole pozytywne i negatywne należy stosować rutynowo, a wydajność testu weryfikować związkami referencyjnymi lub interwencjami właściwymi dla danego zastosowania. Standaryzacja jest konieczna dla porównywalności międzybadaniowej, powtarzalności i zaufania do interpretacji wyników między laboratoriami i instytucjami.

Równie istotna jest integracja danio w warstwowe ścieżki decyzyjne. W wielu kontekstach model będzie najbardziej wartościowy jako platforma pośrednia między prostymi systemami *in vitro* a zasobochłonnymi badaniami ssaczymi. W tej roli pozwala priorytetyzować związki, wykrywać wczesne sygnały toksyczności, ujawniać biologicznie aktywne fenotypy i doprecyzowywać hipotezy przed walidacją ssaczą. Kryteria progresji powinny być zdefiniowane z góry: praktyczna strategia powinna określać, co stanowi pozytywny wynik, które punkty końcowe uzasadniają dalsze badania i w jakich sytuacjach walidacja ssacza pozostaje konieczna. Jest to

szczególnie istotne tam, gdzie wczesne stadia danio nie odwzorowują adekwatnie farmakokinetyki układowej, odporności nabytej, fizjologii narządowo-specyficznej lub patologii późnych stadiów.

Z perspektywy instytucjonalnej skuteczne wdrożenie wymaga inwestycji w infrastrukturę, szkolenia i standardy raportowania. Laboratoria wprowadzające podejścia oparte na danio powinny ustanowić standaryzowane procedury hodowlane i eksperymentalne, zapewnić szkolenia personelu w biologii i fenotypowaniu danio oraz wdrożyć środki kontroli jakości właściwe dla planowanych testów. Równoległe instytucje finansujące, komisje etyczne i regulatorzy powinni uznać danio za naukowo wartościowy element warstwowych ścieżek przedklinicznych, zwłaszcza tam, gdzie model może ograniczać użycie ssaków przy zachowaniu trafności biologicznej. Wdrożenie nie jest zatem wyłącznie decyzją techniczną — to także element szerszej strategii poprawy efektywności eksperymentów, priorytetyzacji translacyjnej i zgodności z zasadami 3R.

Polskie Towarzystwo Zebrafish może wspierać wdrażanie podejść opartych na danio poprzez doradztwo naukowe w zakresie wyboru modelu, projektu eksperymentu, doboru punktów końcowych i interpretacji danych. Towarzystwo

może też ułatwiać kontakty z doświadczonymi laboratoriami, wspierać standaryzację protokołów, prowadzić szkolenia i warsztaty oraz udostępniać rekomendacje przydatne we wnioskach grantowych, dokumentacji etycznej i instytucjonalnym wdrażaniu hodowli danio. W tej roli Towarzystwo może pełnić funkcję krajowej platformy doradczej łączącej badaczy, instytucje, komisje etyczne i regulatorów zainteresowanych odpowiedzialnym wykorzystaniem danio w badaniach biomedycznych.

Skuteczna integracja danio w badaniach biomedycznych wymaga podejścia ukierunkowanego na pytanie badawcze i zastosowanie. Gdy model zostanie właściwie dopasowany do celu, eksperymentalnie zestandaryzowany i osadzony w warstwowej strategii walidacji, testy oparte na danio mogą stanowić praktyczną i skalowalną platformę wspierającą zarówno odkrycia naukowe, jak i bardziej etyczne badania przedkliniczne. Praktyczny przegląd głównych zastosowań danio, rekomendowanego wykorzystania, kluczowych odczytów, zalet i sytuacji wymagających walidacji ssaczej przedstawiono w Tabeli 1.

TABELA 1

Praktyczna integracja danio w przebieg badań biomedycznych.

Cel badania	Rekomendowane wykorzystanie danio	Kluczowe odczyty	Główne zalety	Kiedy potrzebna walidacja ssacza
Wczesny skryning leków	Pierwotny skryning <i>in vivo</i>	Przeżycie, morfologia, zachowanie, aktywność reportera	Wysoka przepustowość, kontekst całoorganizmowy, niewielkie zapotrzebowanie na związek	PK/PD, zaangażowanie celu, translacja dawki
Toksyczność ogólna	Wczesna ocena bezpieczeństwa	Śmiertelność, malformacje, obrzęki, toksyczność narządowa	Szybkie wykrywanie toksyczności na poziomie kręgowca	Toksykologia przewlekła, reprodukcyjna, regulacyjna
Kardiotoksyczność	Funkcjonalny skryning bezpieczeństwa	Częstość i rytm serca, blok AV, defekty krążenia, obrzęki	Dostępność optyczna, szybkie fenotypowanie serca	Szczegółowa elektrofizjologia, ostateczne potwierdzenie translacyjne
Badania neurobehavioralne	Wczesny skryning i priorytetyzacja	Lokomocja, aktywność napadopodobna, zachowania lękowe, fenotypy snu	Skalowalne fenotypowanie behavioralne	Złożone funkcje poznawcze, odpowiedzi OUN specyficzne dla ssaków
Zapalenie	Platforma mechanistyczna i skryningowa	Rekrutacja komórek odpornościowych, reportery zapalne, odpowiedzi na uszkodzenie	Obrazowanie w żywym organizmie, fluorescencyjne linie reporterowe	Odporność nabyta (chyba że dorosły danio), przewlekła patologia immunologiczna
Choroby zakaźne	Badania gospodarz-patogen i przeciwwzakaźne	Obciążenie patogenem, przeżycie, odpowiedzi odpornościowe, aktywność reportera	Obrazowanie <i>in vivo</i> w czasie rzeczywistym, skalowalność	Pełna patologia ssacza, specyficzność gospodarza, odporność nabyta (chyba że dorosły danio)
Choroby metaboliczne	Badania mechanistyczne i wczesne interwencje	Akumulacja lipidów, stłuszczenie, fenotypy glukozowe, stres oksydacyjny	Szybkie fenotypowanie obrazowe	Długoterminowa regulacja metaboliczna, wyższa złożoność fizjologiczna
Onkologia/kse nografty	Wczesna biologia guza i odpowiedź na leki	Proliferacja, migracja, inwazja, angiogeneza	Szybkie testy guza <i>in vivo</i> , mały wkład materiału	Długoterminowa progresja guza, złożone mikrośrodowisko
Walidacja celu	Funkcjonalne testowanie <i>in vivo</i>	Fenotypy genetyczne lub reporterowe	Podatność genetyczna, efektywne testowanie hipotez	Biologia celu specyficzna dla gatunku, potwierdzenie tkankowe
Integracja w ścieżkę przedkliniczną	Platforma decyzyjna pośrednia	Punkty końcowe „fit-for-purpose”	Lepsza priorytetyzacja, ograniczenie użycia ssaków, zgodność z 3R	Walidacja regulacyjna i późnoetapowa translacyjna

Tabela podsumowuje główne zastosowania danio w badaniach biomedycznych, najbardziej istotne odczyty, główne praktyczne zalety modelu oraz sytuacje, w których walidacja ssacza pozostaje konieczna (Howe i wsp., 2013).

Podsumowanie

Danio pręgowane ugruntowało swoją pozycję jako jedno z najważniejszych alternatywnych narzędzi badań biomedycznych, będąc obecnie drugim najczęściej wykorzystywanym modelem zwierzęcym w Unii Europejskiej po myszy. Stosowanie zarodków i larw do 5 dpf, zgodnie z obowiązującymi regulacjami i zasadami 3R, umożliwia realne zastąpienie wybranych badań wcześniej prowadzonych w modelach ssaczy, prowadząc do istotnego ograniczenia liczby wyższych kręgowców wykorzystywanych w badaniach.

Jednocześnie model istotnie przyspiesza rozwój nowych terapii, umożliwiając szybki, relatywnie tani skrining *in vivo* dużej liczby kandydatów na leki na wczesnych etapach badań przedklinicznych. Polskie Towarzystwo Zebrafish rekomenduje zatem, aby instytucje badawcze, firmy farmaceutyczne i agencje regulacyjne systematycznie włączały opisane tu podejścia oparte na danio do swoich standardów badawczych.

W praktyce oznacza to włączanie testów na zarodkach i larwach danio do oceny skuteczności i bezpieczeństwa nowo opracowywanych substancji biologicznie aktywnych oraz promowanie modelu w projektach badawczych i wnioskach grantowych. Podejście to dostarcza wartościowych danych translacyjnych dzięki wysokiemu podobieństwu genetycznemu i fizjologicznemu między danio a człowiekiem. Jest też zgodne ze światowymi trendami ku etycznemu, odpowiedzialnemu i zrównoważonemu badaniom biomedycznym. Integracja niniejszych rekomendacji służy zatem bardziej humanitarnym, efektywnym i innowacyjnym badaniom naukowym, z korzyścią dla postępu medycznego i zdrowia publicznego.

Wkład autorów

PP nadzorował manuskrypt. AS przygotowała i opracowała rycinę. Wszyscy autorzy mieli wkład w artykuł i zaakceptowali wersję złożoną do druku.

Finansowanie

Autorzy oświadczyli, że niniejsza praca i/lub jej publikacja zostały częściowo sfinansowane ze środków Ministra Nauki w ramach programu „Regionalna Inicjatywa Doskonałości”.

Konflikt interesów

Autorzy oświadczyli, że praca powstała przy braku jakichkolwiek powiązań handlowych lub finansowych, które mogłyby zostać uznane za potencjalny konflikt interesów.

Oświadczenie dotyczące generatywnej AI

Autorzy oświadczyli, że generatywna AI nie została wykorzystana w tworzeniu tego manuskryptu.

Wszelki tekst alternatywny (alt text) dołączony do rycin w niniejszym artykule został wygenerowany przez Frontiers przy wsparciu sztucznej inteligencji; podjęto rozsądne starania w celu zapewnienia jego poprawności, w tym przegląd przez autorów wszędzie tam, gdzie to było możliwe. W razie zauważenia nieprawidłowości prosimy o kontakt.

Piśmiennictwo

- Airhart, M. J., Lee, D. H., Wilson, T. D., Miller, B. E., Miller, M. N., and Skalko, R. G. (2007). Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC). *Neurotoxicology Teratol.* 29 (6), 652–664. doi:10.1016/j.ntt.2007.07.005
- Alsop, D., and Vijayan, M. (2009). The zebrafish stress axis: molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event. *General Comp. Endocrinol.* 161 (1), 62–66. doi:10.1016/j.ygcen.2008.09.011
- Angom, R. S., and Nakka, N. M. R. (2024). Zebrafish as a model for cardiovascular and metabolic disease: the future of precision medicine. *Biomedicines* 12 (3), 693. doi:10.3390/biomedicines12030693
- Balik-Meisner, M., Truong, L., Scholl, E. H., Tanguay, R. L., and Reif, D. M. (2018). Population genetic diversity in zebrafish lines. *Mamm. Genome* 29 (1–2), 90–100. doi:10.1007/s00335-018-9735-x
- Ball, J. S., Tochwin, A., Winter, M. J., Trznadel, M., Currie, R., Wolton, K., et al. (2025). Determination of the zebrafish embryo developmental toxicity assessment (ZEDTA) as an alternative non-mammalian approach for the safety assessment of agrochemicals. *Reprod. Toxicol.* 132, 108837. doi:10.1016/j.reprotox.2025.108837
- Baraban, S. C., Dinday, M. T., Castro, P. A., Chege, S., Guyenet, S., and Taylor, M. R. (2007). A large-scale mutagenesis screen to identify seizure-resistant zebrafish. *Epilepsia* 48 (6), 1151–1157. doi:10.1111/j.1528-1167.2007.01075.x
- Baraban, S. C., Dinday, M. T., and Hortopan, G. A. (2013). Drug screening in *Scn1a* zebrafish mutant identifies clemizole as a potential Dravet syndrome treatment. *Nat. Commun.* 4 (1), 2410. doi:10.1038/ncomms3410
- Baranasic, D., Hörtenhuber, M., Balwierz, P. J., Zehnder, T., Mukarram, A. K., Nepal, C., et al. (2022). Multiomic atlas with functional stratification and developmental dynamics of zebrafish cis-regulatory elements. *Nat. Genet.* 54 (7), 1037–1050. doi:10.1038/s41588-022-01089-w
- Bassett, D. I., Bryson-Richardson, R. J., Daggett, D. F., Gautier, P., Keenan, D. G., and Currie, P. D. (2003). Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. *Development* 130 (23), 5851–5860. doi:10.1242/dev.00799
- Bassi, I., Jabali, A., Levin, L., Lambiase, G., Moshe, N., Farag, N., et al. (2025). A high-throughput zebrafish screen identifies novel candidate treatments for kaposiform lymphangiomatosis (KLA). *J. Exp. Med.* 222 (11), e20240513. doi:10.1084/jem.20240513
- Batir-Marin, D., Boev, M., Cioanca, O., Lungu, I.-I., Marin, G.-A., Burlac, A. F., et al. (2025). Exploring oxidative stress mechanisms of nanoparticles using zebrafish (*Danio rerio*): toxicological and pharmaceutical insights. *Antioxidants* 14 (4), 489. doi:10.3390/antiox14040489
- Bauer, B., Mally, A., and Liedtke, D. (2021). Zebrafish embryos and larvae as alternative animal models for toxicity testing. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (24), 13417. doi:10.3390/ijms222413417

- Bedell, V. M., Dubey, P., Lee, H. B., Bailey, D. S., Anderson, J. L., Jamieson-Lucy, A., et al. (2025). Zebrafishology, study design guidelines for rigorous and reproducible data using zebrafish. *Commun. Biol.* 8 (1), 739. doi:10.1038/s42003-025-07496-z
- Begley, C. G., and Ellis, L. M. (2012). Raise standards for preclinical cancer research. *Nature* 483 (7391), 531–533. doi:10.1038/483531a
- Benchoula, K., Khatib, A., Jaffar, A., Ahmed, Q. U., Sulaiman, W. M. A. W., Wahab, R. A., et al. (2019). The promise of zebrafish as a model of metabolic syndrome. *Exp. Anim.* 68 (4), 407–416. doi:10.1538/expanim.18-0168
- Blaser, R., and Gerlai, R. (2006). Behavioral phenotyping in zebrafish: comparison of three behavioral quantification methods. *Behav. Res. Methods* 38 (3), 456–469. doi:10.3758/BF03192800
- Boustany, R.-M. N. (2013). Lysosomal storage diseases — The horizon expands. *Nat. Rev. Neurol.* 9 (10), 583–598. doi:10.1038/nrneurol.2013.163
- Brown, K. H., Dobrinski, K. P., Lee, A. S., Gokcumen, O., Mills, R. E., Shi, X., et al. (2012). Extensive genetic diversity and substructuring among zebrafish strains revealed through copy number variant analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (2), 529–534. doi:10.1073/pnas.1112163109
- Cao, Y., Chen, Q., Liu, Y., Jin, L., and Peng, R. (2023). Research progress on the construction and application of a diabetic zebrafish model. *Int. J. Mol. Sci.* 24 (6), 5195. doi:10.3390/ijms24065195
- Cassar, S. (2022). „Zebrafish in drug discovery: safety assessment”, w: *Drug discovery and evaluation: safety and pharmacokinetic assays*. Red. F. J. Hock, M. R. Gralinski i M. K. Pugsley (Springer International Publishing), 1–21. doi:10.1007/978-3-030-73317-9_85-1
- Choi, T.-Y., Choi, T.-I., Lee, Y.-R., Choe, S.-K., and Kim, C.-H. (2021). Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Exp. and Mol. Med.* 53 (3), 310–317. doi:10.1038/s12276-021-00571-5
- Costa, B., Estrada, M. F., Mendes, R. V., and Fior, R. (2020). Zebrafish avatars towards personalized medicine — A comparative review between avatars models. *Cells* 9 (2), 293. doi:10.3390/cells9020293
- Costalonga Rodrigues, L., Cristine Bueno Faria Dos Santos, N., Locilento Denkena, I., Flávia Dias Castro, T., Geraldo De Campos, E., Maurer-Morelli, C. V., et al. (2025). A dive into the new psychoactive substances: a review of the use of zebrafish (*Danio rerio*) as an in vivo model. *Drug Chem. Toxicol.* 48 (6), 1471–1499. doi:10.1080/01480545.2025.2548873
- Cronan, M. R., Beerman, R. W., Rosenberg, A. F., Saelens, J. W., Johnson, M. G., Oehlers, S. H., et al. (2016). Macrophage epithelial reprogramming underlies mycobacterial granuloma formation and promotes infection. *Immunity* 45 (4), 861–876. doi:10.1016/j.immuni.2016.09.014
- Curado, S., Anderson, R. M., Jungblut, B., Mumm, J., Schroeter, E., and Stainier, D. Y. R. (2007). Conditional targeted cell ablation in zebrafish: a new tool for regeneration studies. *Dev. Dyn.* 236 (4), 1025–1035. doi:10.1002/dvdy.21100
- Dawid, I. B. (2004). Developmental biology of zebrafish. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1038 (1), 88–93. doi:10.1196/annals.1315.015
- Dinday, M. T., and Baraban, S. C. (2015). Large-scale phenotype-based antiepileptic drug screening in a zebrafish model of Dravet syndrome. *eNeuro* 2 (4). doi:10.1523/ENEURO.0068-15.2015
- Dreosti, E., Lopes, G., Kampff, A. R., and Wilson, S. W. (2015). Development of social behavior in young zebrafish. *Front. Neural Circuits* 9, 39. doi:10.3389/fncir.2015.00039
- Dubińska-Magiera, M., Daczewska, M., Lewicka, A., Migocka-Patrzałek, M., Niedbalska-Tarnowska, J., and Jagla, K. (2016). Zebrafish: a model for the study of toxicants affecting muscle development and function. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (11), 1941. doi:10.3390/ijms17111941
- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavella, P. R., Elegante, M. F., et al. (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 205 (1), 38–44. doi:10.1016/j.bbr.2009.06.022
- Ellett, F., Pase, L., Hayman, J. W., Andrianopoulos, A., and Lieschke, G. J. (2011). Mpeg1 promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. *Blood* 117 (4), e49–e56. doi:10.1182/blood-2010-10-314120
- Elo, B., Villano, C. M., Govorko, D., and White, L. A. (2007). Larval zebrafish as a model for glucose metabolism: expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase as a marker for exposure to anti-diabetic compounds. *J. Mol. Endocrinol.* 38 (4), 433–440. doi:10.1677/JME-06-0037
- Elsaid, H. O. A., Rivedal, M., Skandalou, E., Svarstad, E., Tøndel, C., Birkeland, E., et al. (2023). Proteomic analysis unveils Gb3-independent alterations and mitochondrial dysfunction in a gla^{-/-} zebrafish model of Fabry disease. *J. Transl. Med.* 21 (1), 591. doi:10.1186/s12967-023-04475-y
- European Medicines Agency (2018). *Assessment report. Procedure under article 5(3) of regulation (EC) no 726/2004*. European Medicines Agency. Dostępne pod adresem: www.ema.europa.eu/en/documents/opinion-any-scientific-matter/assessment-report-article-53-procedure-n-orethisterone-ethinylestradiol_en.pdf (dostęp: 19 maja 2026 r.).
- Facchinello, N., Schiavone, M., Vettori, A., Argenton, F., and Tiso, N. (2016). „Monitoring wnt signaling in zebrafish using fluorescent biosensors”, w: *Wnt signaling*. Red. Q. Barrett i L. Lum (New York: Springer), 1481, 81–94. doi:10.1007/978-1-4939-6393-5_9
- Fang, L., Liu, C., and Miller, Y. I. (2014). Zebrafish models of dyslipidemia: relevance to atherosclerosis and angiogenesis. *Transl. Res.* 163 (2), 99–108. doi:10.1016/j.trsl.2013.09.004
- Fior, R., Póvoa, V., Mendes, R. V., Carvalho, T., Gomes, A., Figueiredo, N., et al. (2017). Single-cell functional and chemosensitive profiling of combinatorial colorectal therapy in zebrafish xenografts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114 (39), E8234–E8243. doi:10.1073/pnas.1618389114
- Garg, V., and Geurten, B. R. H. (2024). Diving deep: zebrafish models in motor neuron degeneration research. *Front. Neurosci.* 18, 1424025. doi:10.3389/fnins.2024.1424025
- Geng, Y., Yates, C., and Peterson, R. T. (2023). Social behavioral profiling by unsupervised deep learning reveals a stimulative effect of dopamine D3 agonists on zebrafish sociality. *Cell Rep. Methods* 3 (1), 100381. doi:10.1016/j.crmeth.2022.100381
- Gierten, J., Pylatiuk, C., Hammouda, O. T., Schock, C., Stegmaier, J., Wittbrodt, J., et al. (2020). Automated high-throughput heartbeat quantification in medaka and zebrafish embryos under physiological conditions. *Sci. Rep.* 10 (1), 2046. doi:10.1038/s41598-020-58563-w
- Griffin, A., Anvar, M., Hamling, K., and Baraban, S. C. (2020). Phenotype-based screening of synthetic cannabinoids in a Dravet syndrome zebrafish model. *Front. Pharmacol.* 11, 464. doi:10.3389/fphar.2020.00464
- Hamm, J. T., Hsieh, J.-H., Roberts, G. K., Collins, B., Gorospe, J., Sparrow, B., et al. (2024). Interlaboratory study on zebrafish in toxicology: systematic evaluation of the application of zebrafish in toxicology's (SEAZIT's) evaluation of developmental toxicity. *Toxics* 12 (1), 93. doi:10.3390/toxics12010093
- Harrell, A. W., Reid, K., Vahle, J., Brouta, F., Beilmann, M., Young, G., et al. (2024). Endeavours made by trade associations, pharmaceutical companies and regulators in the replacement, reduction and refinement of animal experimentation in safety testing of pharmaceuticals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 152, 105683. doi:10.1016/j.yrtph.2024.105683
- He, C., Bartholomew, C. R., Zhou, W., and Klionsky, D. J. (2009). Assaying autophagic activity in transgenic GFP-Lc3 and GFP-gabarap zebrafish embryos. *Autophagy* 5 (4), 520–526. doi:10.4161/autophagy.5.4.7768

- Hillman, C., Kearn, J., Trznadel, M., Winter, M. J., and Parker, M. O. (2026). Larval zebrafish as a translational model for neurotoxicity screening of emerging psychoactive substances. *NeuroToxicology* 113, 103386. doi:10.1016/j.neuro.2026.103386
- Hoffman, E. J., Turner, K. J., Fernandez, J. M., Cifuentes, D., Ghosh, M., Ijaz, S., et al. (2016). Estrogens suppress a behavioral phenotype in zebrafish mutants of the autism risk gene, CNTNAP2. *Neuron* 89 (4), 725–733. doi:10.1016/j.neuron.2015.12.039
- Hou, Y., Liu, X., Qin, Y., Hou, Y., Hou, J., Wu, Q., et al. (2023). Zebrafish as model organisms for toxicological evaluations in the field of food science. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 22 (5), 3481–3505. doi:10.1111/1541-4337.13213
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., et al. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496 (7446), 498–503. doi:10.1038/nature12111
- Hutchinson, L., and Kirk, R. (2011). High drug attrition rates – Where are we going wrong? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8 (4), 189–190. doi:10.1038/nrclinonc.2011.34
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., et al. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31 (3), 227–229. doi:10.1038/nbt.2501
- Jiang, J., Wu, S., Liu, X., Wang, Y., An, X., Cai, L., et al. (2015). Effect of acetochlor on transcription of genes associated with oxidative stress, apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption in the early life stage of zebrafish. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40 (2), 516–523. doi:10.1016/j.etap.2015.08.005
- Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Martí, M., Raya, A., and Belmonte, J. C. I. (2010). Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* 464 (7288), 606–609. doi:10.1038/nature08899
- Kalueff, A. V., Echevarria, D. J., Homechaudhuri, S., Stewart, A. M., Collier, A. D., Kaluyeva, A. A., et al. (2016). Zebrafish neurobehavioral phenomics for aquatic neuropharmacology and toxicology research. *Aquat. Toxicol.* 170, 297–309. doi:10.1016/j.aquatox.2015.08.007
- Kardash, E., Bandemer, J., and Raz, E. (2011). Imaging protein activity in live embryos using fluorescence resonance energy transfer biosensors. *Nat. Protoc.* 6 (12), 1835–1846. doi:10.1038/nprot.2011.395
- Karimzadeh, K., Uju, C., Zahmatkesh, A., and Unniappan, S. (2025). Regulation of feeding and metabolism by fat mass and obesity-associated protein in zebrafish. *Sci. Rep.* 15 (1), 40979. doi:10.1038/s41598-025-24733-x
- Kemmler, C. L., Riemsdagh, F. W., Moran, H. R., and Mosimann, C. (2021). From stripes to a beating heart: early cardiac development in zebrafish. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 8 (2), 17. doi:10.3390/jcdd8020017
- Kettleborough, R. N. W., Busch-Nentwich, E. M., Harvey, S. A., Dooley, C. M., De Bruijn, E., Van Eeden, F., et al. (2013). A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. *Nature* 496 (7446), 494–497. doi:10.1038/nature11992
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., and Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203 (3), 253–310. doi:10.1002/aja.1002030302
- Kola, I., and Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (8), 711–716. doi:10.1038/nrd1470
- Lam, S. H., Chua, H. L., Gong, Z., Lam, T. J., and Sin, Y. M. (2004). Development and maturation of the immune system in zebrafish, danio rerio: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev. and Comp. Immunol.* 28 (1), 9–28. doi:10.1016/S0145-305X(03)00103-4
- Langheinrich, U., Vacun, G., and Wagner, T. (2003). Zebrafish embryos express an orthologue of HERG and are sensitive toward a range of QT-prolonging drugs inducing severe arrhythmia. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 193 (3), 370–382. doi:10.1016/j.taap.2003.07.012
- Lauwereyns, J., Bajramovic, J., Bert, B., Camenzind, S., De Kock, J., Elezović, A., et al. (2024). Toward a common interpretation of the 3Rs principles in animal research. *Lab. Anim.* 53 (12), 347–350. doi:10.1038/s41684-024-01476-2
- Lazcano, I., Pech-Pool, S. M., Olvera, A., García-Martínez, I., Palacios-Pérez, S., and Orozco, A. (2023). The importance of thyroid hormone signaling during early development: lessons from the zebrafish model. *General Comp. Endocrinol.* 334, 114225. doi:10.1016/j.ygcen.2023.114225
- Letamendia, A., Quevedo, C., Ibarbia, I., Virto, J. M., Holgado, O., Diez, M., et al. (2012). Development and validation of an automated high-throughput system for zebrafish in vivo screenings. *PLoS ONE* 7 (5), e36690. doi:10.1371/journal.pone.0036690
- Lieschke, G. J., and Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* 8 (5), 353–367. doi:10.1038/nrg2091
- Lin, G., Wang, Y., Pham, T. G., and Wen, Z. (2025). Dendritic cells in developing and adult zebrafish arise from different origins and display distinct flt3 dependencies. *Development* 152 (4), DEV204410. doi:10.1242/dev.204410
- Liu, Y., Asnani, A., Zou, L., Bentley, V. L., Yu, M., Wang, Y., et al. (2014). Visnagin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy through modulation of mitochondrial malate dehydrogenase. *Sci. Transl. Med.* 6 (266), 266ra170. doi:10.1126/scitranslmed.3010189
- Lubin, A., Otterstrom, J., Hoade, Y., Bjedov, I., Stead, E., Whelan, M., et al. (2021). A versatile, automated and high-throughput drug screening platform for zebrafish embryos. *Biol. Open* 10 (9), bio058513. doi:10.1242/bio.058513
- Lunina, N. A., Safina, D. R., and Kostrov, S. V. (2024). Zebrafish xenographs in oncology and personalized medicine. *Mol. Biol.* 58 (3), 381–401. doi:10.1134/S0026893324700031
- MacArthur Clark, J. (2018). The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. *Br. J. Nutr.* 120 (s1), S1–S7. doi:10.1017/S0007114517002227
- Maciag, M., Wnorowski, A., Mierzejewska, M., and Plazinska, A. (2022). Pharmacological assessment of zebrafish-based cardiotoxicity models. *Biomed. and Pharmacother.* 148, 112695. doi:10.1016/j.biopha.2022.112695
- MacRae, C. A., and Peterson, R. T. (2015). Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (10), 721–731. doi:10.1038/nrd4627
- Marchione, A. D., Thompson, Z., and Kathrein, K. L. (2021). DNA methylation and histone modifications are essential for regulation of stem cell formation and differentiation in zebrafish development. *Briefings Funct. Genomics* 20 (6), elab022. doi:10.1093/bfgp/elab022
- Masud, S., Prajsnar, T. K., Torraca, V., Lamers, G. E. M., Benning, M., Van Der Vaart, M., et al. (2019). Macrophages target *Salmonella* by Lc3-associated phagocytosis in a systemic infection model. *Autophagy* 15 (5), 796–812. doi:10.1080/15548627.2019.1569297
- Maximino, C., De Brito, T. M., Da Silva Batista, A. W., Herculano, A. M., Morato, S., and Gouveia, A. (2010). Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. *Behav. Brain Res.* 214 (2), 157–171. doi:10.1016/j.bbr.2010.05.031
- Md Razip, N. N., Mohd Noor, S., Norazit, A., Nordin, N., Sakeh, N. M., and Khaza'ai, H. (2022). An association between insulin resistance and neurodegeneration in zebrafish larval model (*Danio rerio*). *Int. J. Mol. Sci.* 23 (15), 8290. doi:10.3390/ijms23158290
- Meijer, A. H., and Spaink, H. P. (2011). Host-pathogen interactions made transparent with the zebrafish model. *Curr. Drug Targets* 12 (7), 1000–1017. doi:10.2174/138945011795677809
- Mendes, R. V., Ribeiro, J. M., Gouveia, H., Rebelo De Almeida, C., Castillo-Martin, M., Brito, M. J., et al. (2025). Zebrafish

- avatar testing preclinical study predicts chemotherapy response in breast cancer. *Npj Precis. Oncol.* 9 (1), 94. doi:10.1038/s41698-025-00882-0
- Meyers, J. R. (2018). Zebrafish: development of a vertebrate model organism. *Curr. Protoc. Essent. Lab. Tech.* 16 (1), e19. doi:10.1002/cpet.19
- Miao, Z., Yang, J., Cai, L., Huang, Z., Yan, E., Peng, J., et al. (2025). Zebrafish embryos as a teratogenicity screening tool to reduce potential birth defects. *Reprod. Toxicol.* 134, 108895. doi:10.1016/j.reprotox.2025.108895
- Michno, B. J., Pooranachandran, N., Smith, T. C., Faught, E., Lipowska, S., Fenton, A. K., et al. (2025). Pneumolysin-dependent and independent non-canonical autophagy processes mediate host defense against pneumococcal infection. *Autophagy* 21 (12), 3077-3096. doi:10.1080/15548627.2025.2559728
- Migocka-Patrzałek, M., Lewicka, A., Elias, M., and Daczewska, M. (2020). The effect of muscle glycogen phosphorylase (Pygm) knockdown on zebrafish morphology. *Int. J. Biochem. and Cell Biol.* 118, 105658. doi:10.1016/j.biocel.2019.105658
- Milan, D. J., Peterson, T. A., Ruskin, J. N., Peterson, R. T., and MacRae, C. A. (2003). Drugs that induce repolarization abnormalities cause bradycardia in zebrafish. *Circulation* 107 (10), 1355-1358. doi:10.1161/01.CIR.0000061912.88753.87
- Milan, D. J., Kim, A. M., Winterfield, J. R., Jones, I. L., Pfeufer, A., Sanna, S., et al. (2009). Drug-sensitized zebrafish screen identifies multiple genes, including GINS3, as regulators of myocardial repolarization. *Circulation* 120 (7), 553-559. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.821082
- Moro, E., Vettori, A., Porazzi, P., Schiavone, M., Rampazzo, E., Casari, A., et al. (2013). Generation and application of signaling pathway reporter lines in zebrafish. *Mol. Genet. Genomics* 288 (5-6), 231-242. doi:10.1007/s00438-013-0750-z
- Mullapudi, S. T., Helker, C. S., Boezio, G. L., Maischein, H.-M., Sokol, A. M., Guenther, S., et al. (2018). Screening for insulin-independent pathways that modulate glucose homeostasis identifies androgen receptor antagonists. *eLife* 7, e42209. doi:10.7554/eLife.42209
- Nam, Y. H., Rodriguez, I., Shin, S. W., Shim, J. H., Kim, N. W., Kim, M. C., et al. (2021). Characteristics of the new insulin-resistant zebrafish model. *Pharmaceuticals* 14 (7), 642. doi:10.3390/ph14070642
- Navratilova, P., Fredman, D., Hawkins, T. A., Turner, K., Lenhard, B., and Becker, T. S. (2009). Systematic human/zebrafish comparative identification of cis-regulatory activity around vertebrate developmental transcription factor genes. *Dev. Biol.* 327 (2), 526-540. doi:10.1016/j.ydbio.2008.10.044
- OECD (2025). *Test no. 236: fish embryo acute toxicity (FET) test*. OECD Publishing. doi:10.1787/9789264203709-en
- Oralová, V., Rosa, J. T., Soenens, M., Bek, J. W., Willaert, A., Witten, P. E., et al. (2019). Beyond the whole-mount phenotype: high-resolution imaging in fluorescence-based applications on zebrafish. *Biol. Open* 8 (5), bio042374. doi:10.1242/bio.042374
- Panula, P., Sallinen, V., Sundvik, M., Kolehmainen, J., Torkko, V., Tiittula, A., et al. (2006). Modulatory neurotransmitter systems and behavior: towards zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Zebrafish* 3 (2), 235-247. doi:10.1089/zeb.2006.3.235
- Parenti, G., Medina, D. L., and Ballabio, A. (2021). The rapidly evolving view of lysosomal storage diseases. *EMBO Mol. Med.* 13 (2), e12836. doi:10.15252/emmm.202012836
- Pisharath, H., Rhee, J. M., Swanson, M. A., Leach, S. D., and Parsons, M. J. (2007). Targeted ablation of beta cells in the embryonic zebrafish pancreas using E. coli nitroreductase. *Mech. Dev.* 124 (3), 218-229. doi:10.1016/j.mod.2006.11.005
- Plantié, E., Migocka-Patrzałek, M., Daczewska, M., and Jagla, K. (2015). Model organisms in the fight against muscular dystrophy: lessons from drosophila and zebrafish. *Molecules* 20 (4), 6237-6253. doi:10.3390/molecules20046237
- Prajsnar, T. K., Serba, J. J., Dekker, B. M., Gibson, J. F., Masud, S., Fleming, A., et al. (2021). The autophagic response to *Staphylococcus aureus* provides an intracellular niche in neutrophils. *Autophagy* 17 (4), 888-902. doi:10.1080/15548627.2020.1739443
- Pruvot, B., Jacquet, A., Droin, N., Auberger, P., Bouscary, D., Tamburini, J., et al. (2011). Leukemic cell xenograft in zebrafish embryo for investigating drug efficacy. *Haematologica* 96 (4), 612-616. doi:10.3324/haematol.2010.031401
- Ramakrishnan, L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* 12 (5), 352-366. doi:10.1038/nri3211
- Renshaw, S. A., Loynes, C. A., Trushell, D. M. I., Elworthy, S., Ingham, P. W., and Whyte, M. K. B. (2006). A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood* 108 (13), 3976-3978. doi:10.1182/blood-2006-05-024075
- Salehpour, A., Rezaei, M., Khoradmehr, A., Tahamtani, Y., and Tamadon, A. (2021). Which hyperglycemic model of zebrafish (*Danio rerio*) suites my type 2 diabetes mellitus research? A scoring system for available methods. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 652061. doi:10.3389/fcell.2021.652061
- Sanni, O., Fasemore, T., and Nkomozepe, P. (2023). Non-genetic-induced zebrafish model for type 2 diabetes with emphasis on tools in model validation. *Int. J. Mol. Sci.* 25 (1), 240. doi:10.3390/ijms25010240
- Sarosiak, A., Jędrychowska, J., Oziębło, D., Gan, N. S., Bałdyga, N., Leja, M. L., et al. (2025). Zebrafish in-vivo study reveals deleterious activity of human TBC1D24 genetic variants linked with autosomal dominant hearing loss. *Biochimica Biophysica Acta (BBA) - Mol. Basis Dis.* 1871 (2), 167598. doi:10.1016/j.bbadis.2024.167598
- Shen, C., and Zuo, Z. (2020). Zebrafish (*Danio rerio*) as an excellent vertebrate model for the development, reproductive, cardiovascular, and neural and ocular development toxicity study of hazardous chemicals. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27 (35), 43599-43614. doi:10.1007/s11356-020-10800-5
- Shorten, P. R., O'Callaghan, P., Davidson, J. B., and Soboleva, T. K. (2007). A mathematical model of fatigue in skeletal muscle force contraction. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 28 (6), 293-313. doi:10.1007/s10974-007-9125-6
- Sloboda, D. D., Claflin, D. R., Dowling, J. J., and Brooks, S. V. (2013). Force measurement during contraction to assess muscle function in zebrafish larvae. *J. Vis. Exp.* 77, 50539. doi:10.3791/50539
- Sourbron, J., Schneider, H., Kecskés, A., Liu, Y., Buening, E. M., Lagae, L., et al. (2016). Serotonergic modulation as effective treatment for Dravet syndrome in a zebrafish mutant model. *ACS Chem. Neurosci.* 7 (5), 588-598. doi:10.1021/acscchemneuro.5b00342
- Stainier, D. Y. R. (2001). Zebrafish genetics and vertebrate heart formation. *Nat. Rev. Genet.* 2 (1), 39-48. doi:10.1038/35047564
- Stefanik, E., Dubińska-Magiera, M., Lewandowski, D., Daczewska, M., and Migocka-Patrzałek, M. (2024). Metabolic aspects of glycogenolysis with special attention to McArdle disease. *Mol. Genet. Metabolism* 142 (4), 108532. doi:10.1016/j.ymgme.2024.108532
- Stewart, A., Gaikwad, S., Kyzar, E., Green, J., Roth, A., and Kalueff, A. V. (2012). Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. *Neuropharmacology* 62 (1), 135-143. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.07.037
- Stoletov, K., Fang, L., Choi, S.-H., Hartvigsen, K., Hansen, L. F., Hall, C., et al. (2009). Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish. *Circulation Res.* 104 (8), 952-960. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.189803
- Sur, A., Wang, Y., Capar, P., Margolin, G., Prochaska, M. K., and Farrell, J. A. (2023). Single-cell analysis of shared signatures and transcriptional diversity during zebrafish development. *Dev. Cell* 58 (24), 3028-3047.e12. doi:10.1016/j.devcel.2023.11.001
- Sztal, T. E., Ruparella, A. A., Williams, C., and Bryson-Richardson, R. J. (2016). Using touch-evoked response and locomotion assays to assess muscle

- performance and function in zebrafish. *J. Vis. Exp.* 116, 54431. doi:10.3791/54431
- Tesoriero, C., Greco, F., Cannone, E., Ghirrotto, F., Facchinello, N., Schiavone, M., et al. (2023). Modeling human muscular dystrophies in zebrafish: mutant lines, transgenic fluorescent biosensors, and phenotyping assays. *Int. J. Mol. Sci.* 24 (9), 8314. doi:10.3390/ijms24098314
- Titilii-Torres, K. F., and Morris, A. C. (2022). Embryonic hyperglycemia perturbs the development of specific retinal cell types, including photoreceptors. *J. Cell Sci.* 135 (1), jcs259187. doi:10.1242/jcs.259187
- Tobin, D. M., and Ramakrishnan, L. (2008). Comparative pathogenesis of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell. Microbiol.* 10 (5), 1027–1039. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01133.x
- Toyoshima, Y., Monson, C., Duan, C., Wu, Y., Gao, C., Yakar, S., et al. (2008). The role of insulin receptor signaling in zebrafish embryogenesis. *Endocrinology* 149 (12), 5996–6005. doi:10.1210/en.2008-0329
- Vacaru, A. M., Unlu, G., Spitzner, M., Mione, M., Knapik, E. W., and Sadler, K. C. (2014). In vivo cell biology in zebrafish – Providing insights into vertebrate development and disease. *J. Cell Sci.* 127 (3), 485–495. doi:10.1242/jcs.140194
- Van De Venter, M., Didloff, J., Reddy, S., Swanepoel, B., Govender, S., Dambuza, N. S., et al. (2020). Wild-type zebrafish (*Danio rerio*) larvae as a vertebrate model for diabetes and comorbidities: a review. *Animals* 11 (1), 54. doi:10.3390/ani11010054
- Van Meer, N. M. M. E., Van Leeuwen, J. L., Schipper, H., and Lankheet, M. J. (2025). Axial muscle-fibre orientations in larval zebrafish. *J. Anat.* 246 (4), 517–533. doi:10.1111/joa.14161
- Varshney, G. K., Carrington, B., Pei, W., Bishop, K., Chen, Z., Fan, C., et al. (2016). A high-throughput functional genomics workflow based on CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in zebrafish. *Nat. Protoc.* 11 (12), 2357–2375. doi:10.1038/nprot.2016.141
- Vaz, R. L., Outeiro, T. F., and Ferreira, J. J. (2018). Zebrafish as an animal model for drug discovery in parkinson's disease and other movement disorders: a systematic review. *Front. Neurology* 9, 347. doi:10.3389/fneur.2018.00347
- Vivekaa, A., Nellore, J., and Sunkar, S. (2025). Zebrafish metabolomics: a comprehensive approach to understanding health and disease. *Funct. and Integr. Genomics* 25 (1), 110. doi:10.1007/s10142-025-01621-1
- Webb, S. E., Cheung, C. C., Chan, C. M., Love, D. R., and Miller, A. L. (2012). Application of complementary luminescent and fluorescent imaging techniques to visualize nuclear and cytoplasmic Ca²⁺ signalling during the in vivo differentiation of slow muscle cells in zebrafish embryos under normal and dystrophic conditions. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiology* 39 (1), 78–86. doi:10.1111/j.1440-1681.2011.05582.x
- Wong, R. Y., Oxendine, S. E., and Godwin, J. (2013). Behavioral and neurogenomic transcriptome changes in wild-derived zebrafish with fluoxetine treatment. *BMC Genomics* 14 (1), 348. doi:10.1186/1471-2164-14-348
- Yabu, T., Tomimoto, H., Taguchi, Y., Yamaoka, S., Igarashi, Y., and Okazaki, T. (2005). Thalidomide-induced antiangiogenic action is mediated by ceramide through depletion of VEGF receptors, and is antagonized by sphingosine-1-phosphate. *Blood* 106 (1), 125–134. doi:10.1182/blood-2004-09-3679
- Yang, F., Zhang, Y., Ju, P., Li, L., Gong, Y., Zhang, Q., et al. (2025). The mechanism of maternal inheritance of glycolipid metabolism disorder in a zebrafish model of type 2 diabetes. *Sci. Rep.* 15 (1), 15198. doi:10.1038/s41598-025-99473-z
- Zang, L., Shimada, Y., and Nishimura, N. (2017). Development of a novel zebrafish model for type 2 diabetes mellitus. *Sci. Rep.* 7 (1), 1461. doi:10.1038/s41598-017-01432-w
- Zang, L., Maddison, L. A., and Chen, W. (2018). Zebrafish as a model for obesity and diabetes. *Front. Cell Dev. Biol.* 6, 91. doi:10.3389/fcell.2018.00091
- Zhang, T., and Peterson, R. T. (2020). Modeling lysosomal storage diseases in the zebrafish. *Front. Mol. Biosci.* 7, 82. doi:10.3389/fmolb.2020.00082
- Zhang, Y., Qin, C., Yang, L., Lu, R., Zhao, X., and Nie, G. (2018). A comparative genomics study of carbohydrate/glucose metabolic genes: from fish to mammals. *BMC Genomics* 19 (1), 246. doi:10.1186/s12864-018-4647-4
- Zhang, R., Varela, M., Vallentgoed, W., Forn-Cuni, G., Van Der Vaart, M., and Meijer, A. H. (2019). The selective autophagy receptors optineurin and p62 are both required for zebrafish host resistance to mycobacterial infection. *PLOS Pathog.* 15 (2), e1007329. doi:10.1371/journal.ppat.1007329
- Zhao, W., Chen, Y., Hu, N., Long, D., and Cao, Y. (2024). The uses of zebrafish (*Danio rerio*) as an in vivo model for toxicological studies: a review based on bibliometrics. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 272, 116023. doi:10.1016/j.ecoenv.2024.116023
- Zhou, W., Wang, J., Zhang, J., Peng, C., Li, G., and Li, D. (2020). Environmentally relevant concentrations of geosmin affect the development, oxidative stress, apoptosis and endocrine disruption of embryo-larval zebrafish. *Sci. Total Environ.* 735, 139373. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139373