

Polskie Towarzystwo „Zebrafish” – rekomendacje wykorzystania modelu danio pręgowany (*Danio rerio*) w badaniach biomedycznych

Wprowadzenie i cel dokumentu

Badania naukowe wiążą się z odpowiedzialnością etyczną za dobrostan zwierząt, dlatego istotne jest dążenie do minimalizacji ich cierpienia i ograniczenia liczby wykorzystywanych kręgowców wyższych. Zastępowanie takich modeli organizmami o niższym stopniu rozwoju układu nerwowego, jak w przypadku danio pręgowanego na wczesnych etapach życia, stanowi ważny krok w kierunku etycznej i zrównoważonej nauki.

Danio pręgowany jest kręgowcem o wysokim stopniu homologii z człowiekiem pod względem genetycznym i anatomicznym – szacuje się, że **ok. 70% ludzkich genów (w tym wiele genów związanych z chorobami) posiada swoje odpowiedniki u danio pręgowanego**. Gatunek ten posiada typowy plan budowy ciała kręgowców (układ nerwowy, sercowo-naczyniowy, pokarmowy itd.) oraz zbliżone funkcje fizjologiczne, co czyni go wiarygodnym modelem wielu procesów chorobowych u ludzi. **Danio pręgowany** oferuje przy tym szereg zalet praktycznych: zapłodnienie i rozwój zarodków odbywa się **poza organizmem matki**, zarodki rozwijają się **bardzo szybko** i są **przezroczyste**, a ryby osiągają dojrzałość w ciągu ~3 miesięcy. Gatunek cechuje się **niewielkimi rozmiarami i łatwością hodowli** w warunkach laboratoryjnych, wysoką **plodnością** (jedna para może dawać setki jaj tygodniowo) oraz **niskimi kosztami utrzymania** całej hodowli w porównaniu do modeli ssaczych. Ponadto dostępne są zaawansowane techniki laboratoryjne opracowane specjalnie dla danio pręgowanego (linie transgeniczne, obrazowanie *in vivo*, edycja genomu, itp.), co ułatwia modelowanie chorób oraz **wysokoprzepustowe eksperymenty przesiewowe *in vivo***.

Rekomenduje się **w pierwszej kolejności wykorzystywanie embrionów oraz larw do 5. dnia po zapłodnieniu (5 dpf, ang. days post fertilization) włącznie**. Jest to zgodne z Unijną Dyrektywą (2010/63/UE) która określa, że stadia rozwojowe ryb do momentu rozpoczęcia samodzielnego żerowania (u danio pręgowanego po 5 dpf) **nie są uznawane za doświadczalne zwierzęta** i nie podlegają regulacjom dotyczącym ochrony zwierząt laboratoryjnych. Oznacza to, że praca z embrionami/larwami danio pręgowanego (<6 dpf) traktowana jest jako **alternatywa** wobec klasycznych testów na zwierzętach doświadczalnych. W konsekwencji **embriony oraz larwy danio pręgowanego mogą służyć jako substytut innych powszechnie wykorzystywanych modeli (np. myszy i szczurów)**, przyczyniając się tym samym do ograniczenia liczby wykorzystywanych zwierząt kręgowych w badaniach. W naukowo uzasadnionych sytuacjach, Polskie Towarzystwo „Zebrafish” traktuje jako uzasadnione wykorzystanie starszych stadiów rozwojowych, o ile nie istnieją alternatywne metody uzyskania wiarygodnych wyników, jednak przypomina że wtedy wymagana jest zgoda Lokalnej Komisji Etycznej Spraw Doświadczeń na Zwierzętach.

Niniejszy dokument przedstawia oficjalne rekomendacje Polskiego Towarzystwa **“Zebrafish”** (PTZ) dotyczące zastosowania modelu ryby **danio pręgowany** (*Danio rerio*) w badaniach biomedycznych nad nowymi terapiami. Rekomendacje te stanowią punkt odniesienia dla instytucji naukowych, firm farmaceutycznych oraz agencji regulacyjnych, podkreślając korzyści płynące z wykorzystania embrionów i larw Danio pręgowanego w różnych dziedzinach badań, między innymi takich jak:

- onkologia,
- toksykologia,
- neurologia/neuropsychiatria,
- choroby metaboliczne,
- immunologia,
- kardiologia,

Onkologia

PTZ zaleca wykorzystanie modelu ksenograftu z wykorzystaniem larw danio pręgowanego jako szybkiej metody przesiewowej w badaniach onkologicznych.

Strategia polega na wszczepieniu ludzkich komórek nowotworowych (np. z linii komórkowej lub od pacjenta) do zarodka/larwy danio pręgowanego, który naturalnie w pierwszych dniach życia nie posiada w pełni rozwiniętego układu immunologicznego. Brak nabytej odpowiedzi immunologicznej umożliwia przyjęcie i wzrost przeszczepionych komórek bez konieczności stosowania procedur immunosupresji. Taki **ksenotransplant** rozwija się w przezroczystym organizmie larwy, co umożliwia bezpośrednie śledzenie różnych parametrów takich jak wzrostu guza czy angiogenezy. Dodatkowo, w przeciwieństwie do myszy, ludzkie komórki nowotworowe w tym modelu łatwo migrują i prowadzą do metastazy co pozwala na ocenę wpływu testowanych leków przeciwnowotworowych *in vivo* na ten onkologicznie krytyczny aspekt.

Eksperymenty ksenograftowe można przeprowadzić w czasie krótszym niż tydzień, podczas gdy analogiczne testy na myszach zajmują zwykle wiele tygodni. Nie tylko znacząco obniża to koszty eksperymentu, ale bardzo przyspiesza generowanie klinicznie istotnych wyników. Ponadto, model ten jest już obecnie używany w praktyce klinicznej przy optymalizacji chemioterapii u pacjentów. Dodatkowo, jest możliwe przeszczepienie komórek nowotworowych do kilkudziesięciu/kilkuset larw jednocześnie, co pozwala na **równoległe testowanie wielu kandydatów na leki** w warunkach *in vivo* – w stopniu niedostępnym dla tradycyjnych modeli mysich.

Przykład

Opracowano 10-dniowy test danio pręgowanego (zAvatars) wykorzystujący komórki raka piersi pacjentki, aby przewidzieć, która chemioterapia będzie najlepsza dla poszczególnych

pacjentek. Test wykazał 100% dokładność (18/18 przypadków) w dopasowywaniu odpowiedzi pacjentów na leczenie, oferując obiecujące narzędzie do spersonalizowanego wyboru terapii przeciwnowotworowej (Mendes, R.V., Ribeiro, J.M., Gouveia, H. *et al.* Zebrafish Avatar testing preclinical study predicts chemotherapy response in breast cancer. *npj Precis. Onc.* **9**, 94 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41698-025-00882-0>)

Toksykologia

PTZ zaleca wykorzystanie danio pręgowanego w badaniach toksykologicznych jako modelu ułatwiającego wczesną identyfikację toksyczności oraz spełniającego zasady 3R (Replacement, Reduction, Refinement).

Model ten sprawdza się w toksykologii środowiskowej i farmaceutycznej w badaniach przesiewowych. Co istotne, fizjologia i metabolizm danio pręgowanego jest zbliżony człowiekowi znacząco zwiększając wartość predykcijną uzyskanych wyników. Już od wczesnych etapów opracowywania leku można przeprowadzać **testy toksyczności ostrej, wpływu teratogennego i embriotoksycznego**.

Przykład:

- Test ostrej toksyczności LD₅₀ na gryzoniach można zastąpić **testem FET (OECD 236)** na embrionach danio pręgowanego.
 - Test teratogenności na szczurach można zastąpić **badaniem rozwoju zarodków danio pręgowanego**, gdzie obserwuje się wady morfologiczne i zaburzenia organogenezy.
-

Neurologia/neuropsychiatria

PTZ zaleca wykorzystanie danio pręgowanego w badaniach neurologicznych dotyczących leków przeciwlękowych, przeciwdepresyjnych, uzależniających, nootropowych i przeciwdrgawkowych.

Testy behawioralne prowadzone na larwach danio pręgowanego (<6 dpf) są zaakceptowaną etyczną alternatywą dla badań na dorosłych osobnikach i gryzoniach. Testy te dają możliwość prowadzenia badań w płytkach wielodotkowych - co umożliwia wysokoprzepustową analizę reakcji na leki.

Przykłady testów z użyciem danio pręgowanego:

Lęk - test tigmotaksji (otwarte pole), test preferencji jasne/ciemne (Light–Dark Test), test reakcji na zmianę oświetlenia (Light–Dark Challenge Assay)- 5dpf.

Padaczka - model napadów wywoływanych pentylenotetrazolem (PTZ seizure model)- 5dpf.

Interakcje społeczne - test ławicowy (shoaling), test preferencji socjalnej (Social Preference Test) - >15dpf.

Choroby metaboliczne

PTZ zaleca stosowanie danio pręgowanego w badaniach metabolicznych takich jak otyłość, dyslipidemia, cukrzyca i podobne.

Danio pręgowane jest cenionym modelem badań nad otyłością, cukrzycą, stłuszczeniem wątroby i zaburzeniami lipidowymi. Kluczowe zalety to plastyczność genetyczna, przezroczystość optyczna i konserwatywne szlaki metaboliczne. Zostały one z powodzeniem wykorzystane do odkrycia mechanizmów metabolicznych, identyfikacji szlaków chorobowych i badań przesiewowych związków terapeutycznych.

Przykład :

Model cukrzycy typu II, np. insulinooporność indukowana ekspozycją larw na glukozę, deksametazon, lub ludzką insulinę egzogenną w połączeniu z manipulacjami genetycznymi, pozwala na badanie skuteczności leków przeciwcukrzycowych w warunkach zbliżonych do przewlekłych chorób metabolicznych u ludzi.

Immunologia

PTZ rekomenduje wykorzystanie danio pręgowanego w badaniach nad odpowiedzią immunologiczną, w tym zakażeń bakteryjnych jak i wirusowych.

Larwy danio pręgowanego w pierwszym tygodniu życia posiadają wyłącznie odporność wrodzoną, co pozwala selektywnie badać tę gałąź układu immunologicznego bez wpływu odporności nabytej. Dzięki temu model ten jest przydatny w:

- badaniach zapaleń,
- ocenie działania leków immunomodulujących,
- analizie migracji leukocytów *in vivo*,
- badaniach odpowiedzi na infekcje bakteryjne i wirusowe.

Przykład:

Model infekcji bakteryjnej z wykorzystaniem *Mycobacterium marinum* – badania nad gruźlicą i odpowiedzią immunologiczną, także wykorzystując platformy do wysokoprzepustowych badań przesiewowych (HTS) w celu poszukiwania nowych leków.

Kardiologia

PTZ rekomenduje wykorzystanie danio pręgowanego w badaniach układu sercowo-naczyniowego, zarówno podstawowych, jak i w ocenie kardiotoksyczności leków.

Serce danio pręgowanego, mimo prostszej budowy, ma zbliżoną fizjologię do ludzkiego, a obecność homologa kanału hERG pozwala na wiarygodną ocenę wpływu substancji na rytm serca.

Przykład:

Badania wydłużenia odstępu QT u królików można wstępnie zastąpić **pomiarem pracy serca u larw danio pręgowanego** z użyciem szybkiego obrazowania. Wykazano zgodność wyników w detekcji arytmii między tym modelem a ssakami.

Podsumowanie

Danio pręgowany stanowi jedno z najważniejszych narzędzi alternatywnych w badaniach biomedycznych. Obecnie jest drugim najczęściej wykorzystywanym modelem zwierzęcym w badaniach naukowych w Unii Europejskiej, zaraz po myszach. Wykorzystanie zarodków i larw ≤ 5 dpf pozwala:

- Zastąpić część badań na ssakach.
- Zredukować liczbę zwierząt wykorzystywanych w badaniach.
- Przyspieszyć rozwój nowych terapii.

PTZ rekomenduje, aby instytucje badawcze, firmy farmaceutyczne i agencje regulacyjne wdrażały opisane tu procedury w swoich standardach badań.