ARTYKUŁ POGLĄDOWY / REVIEW PAPER
Otrzymano/Submitted: 15.09.2025 • Zaakceptowano/Accepted: 24.10.2025

© Akademia Medycyny

Larwy *Danio rerio* jako model w badaniach przedklinicznych ksenobiotyków – znaczenie dla współczesnej farmakologii i toksykologii

The zebrafish (Danio rerio) larval model in preclinical xenobiotic research – relevance to modern pharmacology and toxicology

Filip Otto
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (https://ror.org/02zbb2597), Katedra i Zakład Farmacji Klinicznej i Biofarmacji

Streszczenie

Larwy *Danio rerio* w ostatnich latach, zyskały status jednego z najważniejszych modeli w badaniach przedklinicznych, zwłaszcza w kontekście oceny bezpieczeństwa i skuteczności ksenobiotyków. Wynika to z szeregu ich wyjątkowych cech biologicznych: transparentnego ciała, szybkiego tempa rozwoju, wysokiej płodności oraz znacznego podobieństwa genetycznego do człowieka. Te właściwości sprawiają, że *D. rerio* jest niezwykle użytecznym narzędziem badawczym w toksykologii, farmakologii, onkologii, a także w neurobiologii. W niniejszej pracy omówione zostały zalety larwalnego modelu *D. rerio* w porównaniu z tradycyjnymi modelami ssaczymi. Szczególny nacisk położono na jego przydatność w analizach toksyczności narządowej obejmujących kardiotoksyczność, hepatotoksyczność, nefrotoksyczność, neurotoksyczność i ototoksyczność oraz w testach genotoksyczności, teratogenności i modelach ksenotransplantacji nowotworów. Warto zwrócić uwagę, że larwy *D. rerio* znalazły szerokie zastosowanie również w neuro- i psychofarmakologii. Model ten umożliwia badanie złożonych zjawisk związanych z padaczką, chorobami neurodegeneracyjnymi, zaburzeniami afektywnymi, schizofrenią czy uzależnieniami. Równocześnie dynamiczny rozwój nowoczesnych metod badawczych np. mikroskopii konfokalnej, technologii CRISPR/Cas9 znacząco poszerza możliwości tego modelu. Istotne podkreślenia jest to, że mimo ogromnego potencjału translacyjnego, model larwalny *D. rerio* nie jest pozbawiony ograniczeń, wynikających głównie z różnic metabolicznych i fizjologicznych w porównaniu do ssaków. Perspektywy dalszego rozwoju obejmują integrację badań z wykorzystaniem *D. rerio* z innymi modelami eksperymentalnymi oraz coraz szersze zastosowanie narzędzi bioinformatycznych i sztucznej inteligencji w analizie wielowymiarowych danych. Takie podejście pozwoli zwiększyć wartość predykcyjną uzyskiwanych wyników i realnie przyczyni się do rozwoju medycyny precyzyjnej. *(Farm Współ 2025; 18: 299-310) doi: 10.53139/FW.20251834*

Słowa kluczowe: Danio rerio, toksykologia, farmakologia, onkofarmakologia, neurofarmakologia, psychofarmakologia, model zwierzęcy, ksenobiotyki

Abstract

In recent years, *Danio rerio* larvae have become one of the cornerstone models in preclinical research, particularly in studies evaluating the safety and efficacy of xenobiotics. This growing scientific interest is driven by several remarkable biological features of these organisms – such as natural transparency, rapid embryonic development, high reproductive capacity, and a substantial degree of genetic homology with humans. Taken together, these characteristics make *D. rerio* a versatile and powerful research model applied across multiple biomedical disciplines, including toxicology, pharmacology, oncology, and neurobiology. The present paper outlines the advantages of the larval *D. rerio* model in comparison with classical mammalian systems. Special attention is given to its usefulness in organ-specific toxicity assessment covering cardio-, hepato-, nephro-, neuro-, and ototoxicity

ORCID: Filip Otto 0000-0002-7418-7555

as well as in genotoxicity, teratogenicity, and tumor xenotransplantation studies. It is worth emphasizing that *D. rerio* larvae have also established a solid position in neuro- and psychopharmacology, providing an efficient platform for investigating complex neurobehavioral phenomena related to epilepsy, neurodegenerative disorders, affective disorders, schizophrenia, and substance use. Meanwhile, the rapid development of advanced research techniques, including confocal and light-sheet microscopy, as well as CRISPR/Cas9-based gene editing, continues to expand the experimental potential of this model far beyond its original applications. Nonetheless, despite its impressive translational promise, the larval *D. rerio* model is not without limitations. Differences in metabolism and physiology between fish and mammals inevitably affect data interpretation, underscoring the importance of multi-model approaches. Looking ahead, future directions are likely to involve a stronger integration of *D. rerio* studies with other experimental systems and the growing implementation of bioinformatic and AI-driven analytical tools. Such multidimensional strategies may significantly improve the predictive value of preclinical findings and contribute to the ongoing evolution of precision medicine. *(Farm Współ 2025; 18: 299-310) doi: 10.53139/FW.20251834*

Keywords: Danio rerio, toxicology, pharmacology, oncopharmacology, neuropharmacology, psychopharmacology, animal model, xenobiotics

Wprowadzenie

Danio pręgowany (*Danio rerio*) w ciągu ostatnich dekad zyskał pozycję jednego z najczęściej wykorzystywanych modeli kręgowców w badaniach biomedycznych. Początkowo gatunek ten służył głównie do badań embriologicznych, jednak z czasem jego eksploatacja znacząco wzrosła. Obecnie *D. rerio* znajduje szerokie zastosowanie w toksykologii, farmakologii, onkologii oraz neurobiologii. Szczególną uwagę badaczy przyciągają larwy tego gatunku, których cechy morfologiczne i fizjologiczne czynią je wyjątkowo przydatnym narzędziem w badaniach przedklinicznych.

Jedną z głównych zalet larwalnego modelu *D. rerio* jest przezroczystość ciała, umożliwiająca bezpośrednie obserwowanie procesów fizjologicznych i patologicznych in vivo. Istotne znaczenie ma również dynamiczny rozwój embrionalny oraz wysoki stopień podobieństwa szlaków sygnalizacyjnych na poziomie komórkowym do tych występujących u człowieka. Szacuje się, że około 70% genów ludzkich posiada homolog w genomie *D. rerio*, co stanowi solidne podstawy dla badań o charakterze translacyjnym [1].

Nie bez znaczenia pozostają także aspekty etyczne i regulacyjne. Zgodnie z dyrektywą UE 2010/63/EU, osobniki do 120 godzin po zapłodnieniu nie są formalnie uznawane za zwierzęta laboratoryjne. W praktyce oznacza to możliwość prowadzenia doświadczeń w zgodzie z zasadą 3R (ang. *Replacement, Reduction, Refinement*), co znacząco ułatwia procedury badawcze [2]. Co więcej, larwy *D. rerio* doskonale sprawdzają się w badaniach wysokoprzepustowych, dzięki czemu znalazły zastosowanie we wczesnych etapach opracowywania nowych leków [1].

W kontekście farmakologicznym larwy *D. rerio* stanowią cenne narzędzie do oceny toksyczności narządowej zarówno kardiotoksyczności [3], hepatotoksyczności [4], nefrotoksyczności [5], jak i neurotoksyczności [6]. Wykorzystuje się je również do badania molekularnych mechanizmów działania leków [7], a w badaniach onkologicznych jako model ksenotransplantacji ludzkich komórek nowotworowych [8,9]. Warto podkreślić, że szybki rozwój metod obrazowania oraz technik inżynierii genetycznej, w tym technologii CRISPR/Cas9, wciąż poszerza możliwości wykorzystania tego modelu i czyni go jednym z najbardziej dynamicznie rozwijających się narzędzi współczesnej biologii eksperymentalnej.

Charakterystyka larw *Danio rerio*

Etapy rozwoju i ich znaczenie dla badań farmakologicznych

Rozwój *Danio rerio* przebiega wyjątkowo dynamicznie, co stanowi jedną z kluczowych zalet tego modelu. Już w ciągu pierwszych 24 godzin po zapłodnieniu formują się podstawowe struktury zarodkowe, a w ciągu kolejnych dwóch dób wykształca się funkcjonalny układ krążenia, mózg oraz pierwotne narządy zmysłów [9]. Około 120 godzin po zapłodnieniu (ang. *hours post fertilization*, hpf) larwy osiągają etap, w którym potrafią aktywnie żerować i wykazują wyraźne zachowania lokomotoryczne [9].

W tym okresie ich ciało pozostaje w dużej mierze przezroczyste, co umożliwia bezpośrednią obserwację procesów biologicznych *in vivo* , takich

jak angiogeneza, rozwój układu nerwowego czy morfogeneza narządów. W praktyce badawczej ma to ogromne znaczenie: poszczególne etapy rozwoju larw *D. rerio* pozwalają na precyzyjną ocenę efektów działania substancji czynnych w bardzo krótkim czasie od ekspozycji.

Dzięki temu model ten znajduje szerokie zastosowanie w farmakologii eksperymentalnej, zarówno w badaniach efektów farmakodynamicznych, jak i toksycznych czy behawioralnych. Możliwość obserwowania tych zjawisk w sposób ciągły i nieinwazyjny sprawia, że larwy *D. rerio* stanowią niezwykle wartościowe narzędzie w badaniach nad mechanizmami działania ksenobiotyków oraz w ocenie bezpieczeństwa nowych, zaprojektowanych substancji leczniczych.

Zalety w stosunku do modeli gryzoni

Larwy *Danio rerio* oferują szereg przewag nad klasycznymi modelami ssaczymi. Do najistotniejszych zalicza się wysoką liczbę potomstwa i krótki cykl rozwojowy, co umożliwia prowadzenie badań w dużej skali i uzyskiwanie statystycznie istotnych wyników w relatywnie krótkim czasie [9,10]. Model ten jest również ekonomiczny, niskie koszty utrzymania i hodowli czynią go dostępnym dla szerokiego spektrum laboratoriów, w tym jednostek akademickich, których zasoby bywają nierzadko ograniczone [9].

Kolejnym atutem jest łatwość ekspozycji larw na badane substancje. W większości przypadków związki chemiczne można podawać bezpośrednio do wody hodowlanej wzbogaconej w elektrolity (E3), co umożliwia jednoczesne testowanie wielu osobników. Należy jednak zaznaczyć, że ta metoda nie zawsze jest możliwa do zastosowania. Niektóre związki, szczególnie o niskiej rozpuszczalności lub niestabilne w środowisku wodnym, mogą się wytrącić, jeżeli rozpuszczone zostały w rozpuszczalniku organicznym (np. w DMSO), a następnie są rozcieńczane w E3, co stanowi docelową formę ekspozycji larw na ksenobiotyk poddawany analizie. W takich sytuacjach konieczne staje się zastosowanie alternatywnych rozwiązań, na przykład użycie surfaktantów, takich jak PEG, które poprawiają rozpuszczalność i są dobrze tolerowane przez larwy w określonym zakresie.

Jeśli jednak rozpuszczanie w środowisku wodnym jest problematyczne, stosuje się bardziej precyzyjne metody podania, np. mikroiniekcję bezpośrednio do żółtka. Ten sposób jest szczególnie przydatny nie tylko w przypadku peptydów i przeciwciał monoklonalnych (których przechodzenie przez powłoki ciała jest ograniczone), ale również innych substancji o ograniczonej dyfuzji przez błony biologiczne [9-11]. Zależnie od właściwości związku, ekspozycja może być więc przeprowadzona zarówno poprzez immersję, jak i mikroiniekcje, co zwiększa elastyczność modelu i pozwala dostosować warunki doświadczenia do charakterystyki farmakologicznej testowanej substancji.

Nie bez znaczenia pozostaje także transparentność larw, która umożliwia bezpośrednie obrazowanie procesów biologicznych *in vivo* przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej [9]. Dodatkowym atutem jest wysoki poziom homologii genetycznej z człowiekiem szacowany na około 70% obejmujący liczne konserwatywne szlaki molekularne kluczowe dla regulacji procesów fizjologicznych [9].

Wszystkie te cechy sprawiają, że larwy *D. rerio* stanowią model o wysokiej wartości translacyjnej, umożliwiający szybkie i ekonomiczne testowanie bezpieczeństwa oraz skuteczności nowych substancji czynnych przed przejściem do badań z udziałem wyższych kręgowców, w tym ssaków.

Ograniczenia i wyzwania metodologiczne

Pomimo licznych zalet, model larwalny *Danio rerio* nie jest wolny od ograniczeń, które należy brać pod uwagę przy projektowaniu i interpretacji badań. Jednym z najczęściej podkreślanych problemów są różnice metaboliczne. Choć u ryb zidentyfikowano wiele homologów ludzkich enzymów z rodziny cytochromu P450 oraz transporterów błonowych, poziom ich ekspresji i aktywność enzymatyczna często odbiegają od obserwowanych u człowieka. W konsekwencji może to wpływać na przebieg procesów biotransformacji leków, a tym samym na interpretację danych farmakokinetycznych [12].

Kolejnym wyzwaniem są odmienności fizjologiczne, wynikające z faktu, że układ oddechowy ryb opiera się na skrzelach, a nie na płucach. Różnice te, widoczne również na poziomie histologicznym, ograniczają możliwość modelowania chorób i terapii układu oddechowego, zwłaszcza w kontekście leków znajdujących punkt uchwytu w obrębie pneumocytów, takich jak substancje stosowane w terapii mukowiscydozy [13].

Nie bez znaczenia pozostaje także brak pełnej dojrzałości poszczególnych układów w pierwszych dniach życia larw. Układ odpornościowy, nerwowy czy wydalniczy uzyskuje dojrzałość na późniejszych

etapach rozwoju *D. rerio*, to natomiast może utrudniać interpretację efektów długoterminowych lub reakcji zależnych od wieku organizmu [14]. W praktyce wymaga to dużej ostrożności przy ekstrapolowaniu wyników na organizmy dorosłe bądź inne gatunki.

Dodatkową trudność stanowi kwestia translacji dawek. Różnice w powierzchni ciała, tempie metabolizmu i dynamice rozwoju między larwami *D. rerio* a ssakami sprawiają, że bezpośrednie przeliczenie dawki bywa problematyczne, a zastosowanie klasycznych przeliczników (np. opartych na masie ciała) nie zawsze daje wiarygodne rezultaty [15].

Wszystkie te ograniczenia wskazują na potrzebę ostrożnej interpretacji uzyskanych danych oraz konieczność łączenia badań z wykorzystaniem *D. rerio* z innymi modelami eksperymentalnymi, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, w celu uzyskania bardziej kompleksowego obrazu działania badanych substancji. Takie podejście pozwala nie tylko zwiększyć wiarygodność wyników, ale także pełniej wykorzystać potencjał translacyjny tego modelu.

Zakres badań możliwych do wykonania z udziałem larw *Danio rerio*

Toksykologia i bezpieczeństwo ksenobiotyków

Larwy *Danio rerio* stanowią niezwykle wartościowy model w badaniach toksykologicznych – zarówno przy ocenie bezpieczeństwa nowych substancji czynnych, jak i w analizie ryzyka związanego z ekspozycją na ksenobiotyki środowiskowe. Ich zastosowanie umożliwia łączenie obserwacji fenotypowych z analizą molekularną, co znacząco zwiększa wartość translacyjną uzyskiwanych danych [16-18].

Testy ostrej i przewlekłej toksyczności

Ocena toksyczności ostrej u larw *D. rerio* pozwala na szybkie określenie stężenia letalnego (ang. *lethal concentration 50%*, LC_{50}) oraz identyfikację wczesnych objawów toksycznych, takich jak zahamowanie rozwoju, występowanie malformacji, zaburzeń lokomocji czy zwiększona śmiertelność w określonym czasie ekspozycji. Dzięki transparentności larw możliwe jest również prowadzenie równoległych obserwacji mikroskopowych, co pozwala na wczesne wykrycie zmian morfologicznych w narządach docelowych.

Badania długoterminowe umożliwiają z kolei ocenę efektów przewlekłej ekspozycji na subletalne stężenia substancji, co ma szczególne znaczenie w ekotoksykologii oraz przy ocenie bezpieczeństwa leków stosowanych przewlekle [18]. Jednak z uwagi na fakt postępującego rozwoju larwy, a tym samym przechodzenia na odżywianie pokarmem egzogennym, badania o takim charakterze wymagają zgody Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach. W praktyce oznacza to konieczność zachowania zgodności z zasadami dobrostanu zwierząt oraz dokładnego planowania momentu granicznego, w którym osobniki przestają być traktowane jako organizmy nieobjęte przepisami o ochronie zwierząt doświadczalnych.

Ocena narządowo-specyficznej toksyczności

Kardiotoksyczność

Larwy *D. rerio* są powszechnie wykorzystywane do oceny kardiotoksyczności, ponieważ ich przezroczyste ciało pozwala na bezpośrednie obserwowanie akcji serca i przepływu krwi. Możliwy jest pomiar częstości skurczów, analiza rytmu zatokowego, identyfikacja arytmii oraz ocena wad rozwojowych serca. Model ten znalazł zastosowanie m.in. w badaniach nad działaniem antracyklin oraz inhibitorów kinaz tyrozynowych, które są znane z potencjału kardiotoksycznego [19,21].

Hepatotoksyczność

Dzięki wykorzystaniu technik barwienia oraz transgenicznych linii *D. rerio* ze specyficzną ekspresją białek fluorescencyjnych (np. Tg(*fabp10a:EGFP-rpl10a*)) w obrębie hepatocytów, możliwa jest nieinwazyjna ocena morfologii i funkcji wątroby. Pozwala to na analizę zmian takich jak stłuszczenie, martwica czy zaburzenia metabolizmu lipidów i białek, a także na śledzenie procesów regeneracyjnych w czasie rzeczywistym [20].

Neurotoksyczność

Zachowania lokomotoryczne i odruchowe larw stanowią czuły i stosunkowo łatwy do ilościowej analizy wskaźnik neurotoksyczności. Umożliwiają one ocenę zaburzeń motoryki, reakcji na bodźce świetlne czy dotykowe, a także efektów działania substancji psychoaktywnych [21].

Nefrotoksyczność

Układ wydalniczy larw, tworzący funkcjonalne przednercze (*pronephros*), rozwija się w ciągu kilku dni po zapłodnieniu. Umożliwia to badania filtracji

kłębuszkowej, funkcji kanalików oraz toksycznych uszkodzeń nerek. Modele nefrotoksyczności *D. rerio* wykorzystywane są m.in. w ocenie działania niesteroidowych leków przeciwzapalnych, aminoglikozydów oraz leków przeciwnowotworowych, które mogą powodować uszkodzenia struktur nefronów [22].

Ototoksyczność

Struktury ucha wewnętrznego larw pozwalają na szczegółowe badanie wpływu substancji toksycznych na komórki rzęsate. Model ten wykorzystywany jest w badaniach ototoksyczności aminoglikozydów i pochodnych platyny o działaniu przeciwnowotworowym, a także w testowaniu potencjalnych związków o działaniu otoprotekcyjnym. Co istotne, larwy *D. rerio* stanowią także model do opracowywania innowacyjnych strategii terapeutycznych, które mają na celu regenerację komórek rzęsatych i przywracanie funkcji słuchu [23].

Badania genotoksyczności i teratogenności

Larwy *Danio rerio* stanowią użyteczny model do oceny potencjału genotoksycznego i teratogennego nowych substancji chemicznych. Dzięki wyjątkowo szybkiemu rozwojowi możliwe jest obserwowanie zmian morfologicznych w krótkich odstępach czasu, co znacząco ułatwia analizę dynamiki powstawania malformacji. Wśród najczęściej obserwowanych nieprawidłowości wymienia się deformacje szkieletu, obrzęk worka osierdziowego czy opóźnienia w wykształcaniu somitów [24].

Onkofarmakologia

Model larw *Danio rerio* znajduje coraz szersze zastosowanie w badaniach z zakresu onkologii eksperymentalnej, szczególnie w ocenie skuteczności i bezpieczeństwa leków przeciwnowotworowych. Ze względu na możliwość ksenotransplantacji komórek nowotworowych pochodzenia obcogatunkowego, larwy stanowią atrakcyjną alternatywę dla klasycznych modeli ssaczych. Możliwe jest wówczas nie tylko badanie wzrostu guza, lecz także jego odpowiedzi na zastosowane substancje chemiczne czy interakcje z mikrośrodowiskiem guza.

Badania angiogenezy i metastazy

Larwy *D. rerio* odgrywają szczególnie istotną rolę w badaniach nad angiogenezą nowotworową. Linie transgeniczne, w których naczynia krwionośne są znakowane białkami fluorescencyjnymi – takie jak Tg(*Fli1a:EGFP*), w której EGFP ulega ekspresji jest w komórkach śródbłonka, czy Tg(*kdrl:mCherry*), z fluorescencją związaną z ekspresją białka mCherry – umożliwiają precyzyjne śledzenie procesu tworzenia nowych naczyń [27]. Pozwala to nie tylko na obserwację morfogenezy układu naczyniowego, ale również na ocenę działania leków o właściwościach hamujących rozwój naczyń krwionośnych, w tym inhibitorów VEGF.

Co więcej, larwalny model *D. rerio* daje możliwość badania zjawisk metastazy. Możliwe jest śledzenie migracji komórek nowotworowych z miejsca implantacji do odległych tkanek w krótkim czasie, co jest niezwykle trudne do osiągnięcia w klasycznych modelach ssaczych, nawet w przypadku nowotworów cechujących się intensywną ekspansją. Umożliwia to analizę mechanizmów przerzutowania oraz ocenę skuteczności związków hamujących inwazję komórek nowotworowych.

Ocena skuteczności substancji ukierunkowanych molekularnie

Ze względu na wysokie podobieństwo wielu szlaków sygnalizacyjnych pomiędzy *Danio rerio* a człowiekiem, larwy tego gatunku stanowią cenne narzędzie w badaniach nad terapiami celowanymi. W szczególności sprawdzają się w ocenie działania inhibitorów kinaz tyrozynowych (ang. *Tyrosine kinase inhibitors*, TKI) oraz inhibitorów kinaz serynowo-treoninowych (ang. *Serine/threonine-specific protein kinase inhibitors*, STKI).

Model larwalny umożliwia analizę interakcji lekowych, zarówno tych o charakterze farmakodynamicznym, jak i farmakokinetycznym [28] a także ocenę toksyczności narządowej wynikającej z ekspozycji na tego typu związki [29]. Dzięki temu stanowi on cenne uzupełnienie klasycznych badań *in vitro* prowadzonych na liniach komórkowych. Co więcej, obserwacje prowadzone *in vivo* na larwach *D. rerio* pozwalają uchwycić złożone zależności między działaniem leku, jego dystrybucją w organizmie a odpowiedzią tkanek, co jest trudne do odwzorowania w warunkach hodowli komórkowej.

Chemioterapeutyki i badania toksyczności

Larwy *D. rerio* znajdują również zastosowanie w ocenie toksyczności klasycznych leków cytostatycz-

nych, takich jak antymetabolity, antracykliny, środki alkilujące czy taksany. Model ten pozwala na szczegółową analizę kardiotoksyczności, nefrotoksyczności i ototoksyczności wywoływanej przez chemioterapię, stanowiąc tym samym użyteczne narzędzie do identyfikacji związków o potencjale toksycznym [29].

Co istotne, wykorzystanie larw umożliwia także badanie substancji o działaniu ochronnym, tzw. protektantów, które mogą ograniczać działania niepożądane terapii przeciwnowotworowej [23]. Takie podejście otwiera drogę do opracowywania nowych strategii terapeutycznych, w których skuteczność leczenia nowotworów idzie w parze z minimalizacją toksyczności dla zdrowych tkanek.

Modele ksenotransplantacji

Przez wiele lat złotym standardem w badaniach *in vivo* nad biologią nowotworów oraz oceną skuteczności nowych terapii pozostawały modele mysie, oparte na gatunku *Mus musculus*. W szczególności stosowano ksenografty heterotopowe i ortotopowe w myszach immunoniekompetentnych, takich jak linie *nude* czy *SCID*. Modele te umożliwiały długotrwałą obserwację wzrostu guza, jego mikrośrodowiska oraz odpowiedzi na leczenie w organizmie ssaczym, którego fizjologia w dużym stopniu odzwierciedla warunki ludzkie.

Modele mysie mają jednak istotne ograniczenia. Wymagają stosowania zwierząt dorosłych, co wiąże się z wysokimi kosztami utrzymania i długim czasem trwania doświadczenia. Dodatkowo obarczone są ograniczeniami natury etycznej, a ich wykorzystanie w badaniach przesiewowych jest w praktyce utrudnione ze względu na skalę i logistykę takich doświadczeń.

W ostatnich latach coraz większe znaczenie zyskały alternatywne modele ksenotransplantacji oparte na larwach *Danio rerio*. Ich kluczową zaletą jest wspomniana już immunologiczna niedojrzałość we wczesnych dniach życia, która umożliwia przyjęcie komórek nowotworowych pochodzenia ludzkiego bez konieczności stosowania środków immunosupresyjnych. Dzięki temu możliwe jest tworzenie modeli nowotworowych *in vivo* w krótkim czasie, z zachowaniem wysokiej przeżywalności organizmów i powtarzalności wyników.

Techniki mikroiniekcji stosowane u larw pozwalają na precyzyjne umieszczanie komórek w różnych lokalizacjach m.in. w żółtku czy przez bezpośrednie wprowadzenie do układu krążenia. Umożliwia to badanie zjawisk takich jak proliferacja, migracja, inwazyjność czy angiogeneza, a także ocenę skuteczności leków cytotoksycznych i terapii ukierunkowanych molekularnie w warunkach *in vivo* [9,28].

Neurofarmakologia

Larwy *Danio rerio* znajdują coraz szersze zastosowanie w badaniach neurofarmakologicznych, zwłaszcza w kontekście modelowania chorób neurologicznych oraz oceny potencjału terapeutycznego nowych substancji czynnych. Szybki rozwój układu nerwowego, w połączeniu z dostępnością licznych linii transgenicznych, sprawia, że model ten pozwala na prowadzenie złożonych badań *in vivo*, łączących analizę aktywności neuronalnej z obserwacją efektów behawioralnych i morfologicznych.

Modele padaczki i drgawek

Jednym z najlepiej ugruntowanych obszarów zastosowania larw *D. rerio* jest ocena skuteczności leków przeciwpadaczkowych. Napady drgawkowe można wywoływać farmakologicznie, na przykład poprzez zastosowanie pentylenetetrazolu (PTZ) [11,30], lub mogą być pochodną modyfikacji genetycznych obejmujących geny kodujące kanały jonowe bramkowane napięciem – odpowiedzialne za transport kationów Na^+, Ca^{2+} i K^+ przez błonę neuronów (kluczowych dla ustalania potencjału spoczynkowego) [30,31]. Istnieją również modele oparte na zaburzeniach ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w obrót neuroprzekaźników, takich jak kwas γ-aminomasłowy (GABA) czy glutaminian, których wzajemna równowaga jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego.

Zastosowanie tych modeli umożliwia nie tylko ocenę skuteczności i toksyczności potencjalnych substancji przeciwdrgawkowych, lecz także analizę efektów synergistycznych pomiędzy znanymi lekami. W badaniach wykorzystuje się zarówno obserwację zachowań larw takich jak zwiększona aktywność ruchowa czy występowanie drgawek klonicznych jak i rejestrację aktywności neuronalnej w czasie rzeczywistym.

Do analizy behawioralnej stosuje się obecnie zautomatyzowane systemy pomiarowe, takie jak ViewPoint ZebraLab, Noldus DanioVision czy EthoVision XT. Urządzenia te umożliwiają precyzyjny pomiar aktywności lokomotorycznej oraz reakcji na bodźce świetlne,

dźwiękowe lub chemiczne, a jednocześnie pozwalają na jednoczesny screening dużej liczby osobników. Takie podejście znacząco zwiększa wiarygodność statystyczną i powtarzalność uzyskiwanych wyników.

Równolegle prowadzi się badania z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej, szczególnie z wykorzystaniem linii transgenicznych wykazujących neuronowo specyficzną ekspresję białek fluorescencyjnych. Umożliwia to wizualizację pobudliwości neuronów i dynamiki sieci neuronalnych. W bardziej zaawansowanych eksperymentach stosuje się mikroelektrody rejestrujące potencjały czynnościowe oraz systemy mikroobrazowania o wysokiej rozdzielczości czasowej, co pozwala integrować dane behawioralne, molekularne i elektrofizjologiczne w jednym eksperymencie.

Takie kompleksowe podejście czyni z larw *D. rerio* niezwykle użyteczny model w badaniach nad padaczką. Pozwala ono zarówno na poszukiwanie nowych związków o potencjale przeciwdrgawkowym, jak i na analizę mechanizmów działania leków już stosowanych klinicznie. W kontekście złożoności terapii epilepsji, która wciąż w dużym stopniu opiera się na metodzie prób i błędów, model *D. rerio* stanowi realne wsparcie w przyspieszeniu procesu odkrywania skuteczniejszych i bezpieczniejszych strategii terapeutycznych.

Badania chorób neurodegeneracyjnych

Larwy *Danio rerio* znalazły szerokie zastosowanie w badaniach nad chorobami neurodegeneracyjnymi, w tym chorobą Parkinsona [32,35], chorobą Alzheimera [33,36] oraz stwardnieniem zanikowym bocznym (łac. *sclerosis lateralis amyotrophica*, SLA) [35]. Modele te opierają się zarówno na manipulacjach genetycznych, jak i na indukcji farmakologicznej procesów neurodegeneracyjnych.

W podejściu genetycznym wykorzystuje się transgeniczne linie *D. rerio* z mutacjami w genach kodujących białka istotne dla patogenezy tych chorób, takie jak α-synukleina [35], tau [36] czy SOD1 [37]. Z kolei modele farmakologiczne, oparte na działaniu neurotoksyn, np. MPTP w chorobie Parkinsona, pozwalają na odtwarzanie mechanizmów prowadzących do obumierania neuronów zaangażowanych w przekaźnictwo dopaminergiczne w obrębie istoty czarnej (łac. *substantia nigra*).

Neurotoksyczność i bezpieczeństwo leków

Larwy *D. rerio* są również wyjątkowo czułym modelem w badaniach neurotoksyczności ksenobiotyków. Ekspozycja na substancje o potencjale neurotoksycznym pozwala na ocenę zaburzeń w rozwoju układu nerwowego, funkcjonowaniu układów neuroprzekaźnikowych oraz w aktywności neuronalnej.

Parametry lokomotoryczne takie jak prędkość ruchu, liczba zwrotów czy reakcje na bodźce świetlne i akustyczne stanowią obiektywne wskaźniki neurotoksyczności i są często wykorzystywane w badaniach przesiewowych. Model *D. rerio* jest szczególnie przydatny w ocenie bezpieczeństwa nowych leków działających na ośrodkowy układ nerwowy [21].

Nowoczesne narzędzia w badaniach neurofarmakologicznych

Dynamiczny rozwój metod obrazowania otworzył zupełnie nowe możliwości w badaniach neurofarmakologicznych z wykorzystaniem *D. rerio*. W ostatnich latach coraz częściej stosuje się techniki optogenetyczne [38], które pozwalają na precyzyjną kontrolę aktywności neuronalnej z użyciem światła, oraz zaawansowane metody elektrofizjologiczne [30], umożliwiające rejestrację potencjałów czynnościowych w czasie rzeczywistym.

Zastosowanie tych narzędzi pozwala nie tylko na badanie mechanizmów działania leków, ale również na głębsze zrozumienie patofizjologii chorób neurodegeneracyjnych. Integracja danych z poziomu molekularnego, elektrofizjologicznego i behawioralnego sprawia, że larwy *D. rerio* stają się jednym z najbardziej kompleksowych modeli w nowoczesnej neurobiologii eksperymentalnej.

Psychofarmakologia

Larwy *Danio rerio* coraz częściej wykorzystywane są jako model eksperymentalny w badaniach psychofarmakologicznych. Ich zachowania ulegają wyraźnym modyfikacjom po ekspozycji na substancje psychoaktywne, co czyni je użytecznym narzędziem do badania mechanizmów leżących u podstaw chorób afektywnych, schizofrenii czy zaburzeń związanych z przyjmowaniem substancji uzależniających. W porównaniu z tradycyjnymi modelami ssaczymi, larwy *D. rerio* pozwalają na prowadzenie obserwacji w sposób szybki, powtarzalny i przy zachowaniu wysokiej wartości translacyjnej.

Modele chorób afektywnych

Zaburzenia afektywne można u larw *D. rerio* modelować na kilka sposobów poprzez ekspozycję na stres środowiskowy, farmakologiczną modulację neuroprzekaźnictwa lub manipulacje genetyczne. Klasyczne testy behawioralne, takie jak *novel tank diving test* czy *light-dark test*, pozwalają na ocenę zachowań analogicznych do lęku czy obniżonego nastroju. Co ciekawe, u larw obserwuje się reakcje na leki przeciwdepresyjne zbliżone do tych opisywanych u ssaków [39].

W badaniach modelujących chorobę afektywną dwubiegunową stosuje się między innymi ekspozycję na ketaminę lub amfetaminę w celu indukcji zachowań maniakalnych. Efekty terapeutyczne stabilizatorów nastroju takich jak lit, kwas walproinowy czy lamotrygina można następnie oceniać na podstawie zmian w aktywności lokomotorycznej, wzorcach pływania oraz reakcji na stresory [40]. Modele te pozwalają nie tylko badać mechanizmy działania leków, ale również odkrywać nowe związki o potencjale normotymicznym.

Modele schizofrenii

W badaniach nad schizofrenią wykorzystuje się najczęściej farmakologiczne modele oparte na działaniu antagonistów receptora NMDA, takich jak MK-801 czy ketamina. Indukują one zaburzenia w aktywności ruchowej oraz w reakcjach na bodźce środowiskowe, które wykazują dużą wrażliwość na leczenie lekami przeciwpsychotycznymi [41].

Co istotne, larwy *D. rerio* reagują na działanie zarówno klasycznych neuroleptyków (np. chloropromazyny, haloperidolu), jak i leków atypowych (olanzapiny, rysperydonu), co potwierdza funkcjonalne podobieństwa w obrębie układów dopaminergicznego i glutaminergicznego. Dostępność linii transgenicznych pozwala dodatkowo badać zmiany w ekspresji receptorów tych układów, umożliwiając pogłębioną analizę mechanizmów działania leków przeciwpsychotycznych oraz ich wpływu na sieci neuronalne.

Modele uzależnień i badań nad substancjami psychoaktywnymi

Larwy *D. rerio* stanowią również cenny model w badaniach nad uzależnieniami np. alkoholu [42] czy nikotyny [43], jak i od opioidów [26], psychostymulantów (pochodne amfetamin i katynonów [44]) oraz kannabinoidów [45].

Ekspozycja na te substancje prowadzi do zmian w aktywności lokomotorycznej, preferencjach środowiskowych i reakcji na stres, które w dużej mierze odzwierciedlają mechanizmy obserwowane u ssaków. Modele te umożliwiają analizę neuroadaptacji towarzyszących przewlekłej ekspozycji na substancje psychoaktywne, a także ocenę skuteczności potencjalnych leków wspomagających leczenie uzależnień, zarówno w fazie detoksykacji, jak i prewencji nawrotów.

Larwy *D. rerio* są szczególnie użyteczne w przesiewowym poszukiwaniu związków modulujących układ dopaminergiczny i endogenny system nagrody. Takie podejście nie tylko przyspiesza proces odkrywania nowych substancji terapeutycznych, ale również pozwala na lepsze zrozumienie neurobiologicznych podstaw uzależnień.

Wykorzystywane metody i narzędzia

Dynamiczny rozwój metodologii badawczej w ostatnich latach sprawił, że larwy *Danio rerio* stały się jednym z najbardziej wszechstronnych modeli w farmakologii i toksykologii. Coraz szersze możliwości oferują nowoczesne techniki obrazowania, narzędzia inżynierii genetycznej, zaawansowane metody analityczne oraz rozwiązania bioinformatyczne wspierające analizę danych.

Mikroskopia konfokalna

Mikroskopia konfokalna stanowi jedno z podstawowych narzędzi obrazowania wykorzystywanych w badaniach na *D. rerio*. Umożliwia uzyskanie trójwymiarowych obrazów o wysokiej rozdzielczości, pozwalając na dokładne odwzorowanie struktur tkankowych. Dzięki naturalnej przezroczystości larw możliwe jest przyżyciowe prowadzenie obserwacji *in vivo*, co eliminuje potrzebę inwazyjnych procedur histologicznych. Technika ta jest powszechnie stosowana m.in. w analizie angiogenezy, neurogenezy, procesów zapalnych czy progresji nowotworów [8,28]. W połączeniu z reporterami fluorescencyjnymi umożliwia śledzenie dynamiki procesów biologicznych z dokładnością do pojedynczej komórki.

Mikroskopia dwufotonowa

Mikroskopia dwufotonowa pozwala na obrazowanie głębiej położonych struktur biologicznych przy ograniczeniu efektów fototoksycznych i fotobielenia. W badaniach z wykorzystaniem *D. rerio* wykorzystuje się ją m.in. do obserwacji komunikacji międzykomórkowej, migracji komórek nowotworowych czy plastycz-

ności synaptycznej [46]. Jej przewagą nad klasyczną mikroskopią konfokalną jest możliwość rejestracji sygnałów z tkanek o dużej grubości, co pozwala na analizę procesów zachodzących w całym organizmie, a nie tylko na jego powierzchni.

Mikroskopia świetlna z odwróconą optyką (ang. *light-sheet microscopy*, LSFM)

Technologia LSFM to jedno z najbardziej zaawansowanych narzędzi do obrazowania całych organizmów. Umożliwia błyskawiczne uzyskanie serii obrazów w wysokiej rozdzielczości przy minimalnej fototoksyczności. W modelu larw *D. rerio* LSFM pozwala na śledzenie rozwoju embrionalnego, reakcji zapalnych oraz migracji komórek nowotworowych w organizmie w czasie rzeczywistym [47]. Dzięki połączeniu z analizą ilościową i algorytmami rekonstrukcji 3D można uzyskać przestrzenne mapy zmian morfologicznych i funkcjonalnych, co daje ogromne możliwości w toksykologii i farmakologii rozwojowej.

Technologia CRISPR/Cas9

Wprowadzenie technologii CRISPR/Cas9 zrewolucjonizowało badania prowadzone na *D. rerio*, umożliwiając precyzyjną edycję genów z niespotykaną dotąd łatwością. Metoda ta pozwala na wprowadzanie mutacji punktowych, delecji czy insercji, a także na tworzenie stabilnych linii transgenicznych odwzorowujących ludzkie choroby genetyczne [48]. W badaniach farmakologicznych umożliwia modelowanie zaburzeń metabolicznych, neurodegeneracyjnych czy nowotworowych, co otwiera drogę do testowania leków w warunkach bardziej zbliżonych do ludzkich. Co ważne, technika ta znacząco skraca czas uzyskania funkcjonalnych modeli i zwiększa powtarzalność eksperymentów.

Transgeneza i linie reporterowe

Transgeneza stanowi jedno z kluczowych narzędzi wykorzystywanych w badaniach z udziałem *D. rerio*. Wprowadzenie reporterów fluorescencyjnych, takich jak GFP, RFP czy mCherry, pozwala na wizualizację aktywności genów i szlaków sygnalizacyjnych w czasie rzeczywistym [28]. Linie reporterowe umożliwiają badanie procesów takich jak proliferacja, apoptoza, stres oksydacyjny czy odpowiedź zapalna. Co więcej, dzięki możliwości prowadzenia obserwacji *in vivo*, można analizować efekty działania substancji farmakologicznych z niezwykłą precyzją i rozdzielczością czasową. Transgeneza staje się zatem nie tylko narzędziem diagnostycznym, ale i predykcyjnym pozwala ocenić, jak leki wpływają na funkcję konkretnych tkanek.

Knockdown genów

Technika knockdown z wykorzystaniem oligonukleotydów morfolinowych (MO) umożliwia przejściowe wyciszenie ekspresji wybranych genów. Pomimo rosnącej popularności systemu CRISPR, metoda ta wciąż znajduje zastosowanie, szczególnie w badaniach wczesnych etapów rozwoju zarodkowego i toksykologii rozwojowej. Jej zaletą jest szybkość uzyskania efektu oraz możliwość celowania w geny, których trwała mutacja mogłaby być okazać się letalna. W praktyce związki morfoliny pozwalają na funkcjonalną weryfikację roli określonych genów w odpowiedzi na leki lub toksyny, zanim zdecyduje się na stworzenie stałej linii osobników znokautowanych.

Proteomika i metabolomika

Techniki „omiczne", takie jak proteomika i metabolomika, w ostatnich latach znacząco rozszerzyły możliwości badań z wykorzystaniem *D. rerio*. Zastosowanie wysokorozdzielczych metod analitycznych, m.in. LC-MS/MS, pozwala na identyfikację tysięcy białek i metabolitów, których profil zmienia się pod wpływem ekspozycji na ksenobiotyki [50]. Integracja danych molekularnych z wynikami fenotypowymi umożliwia odkrywanie nowych biomarkerów toksyczności i skuteczności terapeutycznej. Co ważne, połączenie tych analiz z narzędziami bioinformatycznymi pozwala budować modele predykcyjne, które mogą wspierać rozwój medycyny precyzyjnej i projektowanie bardziej bezpiecznych terapii.

Perspektywy

Larwy *Danio rerio* odgrywają dziś coraz istotniejszą rolę w badaniach przedklinicznych i nic nie wskazuje, by ten trend miał się zatrzymać. Wręcz przeciwnie, wraz z postępem technologicznym ich znaczenie będzie systematycznie rosnąć. Coraz częściej staje się pełnoprawnym narzędziem umożliwiającym badanie złożonych mechanizmów działania leków i toksyczności ksenobiotyków na poziomie całego organizmu.

W nadchodzących latach można oczekiwać intensyfikacji wykorzystania tego modelu w obszarach onkologii, neurobiologii i metabolizmu. Dynamiczny

rozwój linii transgenicznych, w połączeniu z precyzją, jaką daje technologia CRISPR/Cas9, otwiera drogę do tworzenia modeli odwzorowujących ssacze jednostki chorobowe. Takie podejście pozwoli jeszcze lepiej oceniać zarówno skuteczność, jak i bezpieczeństwo nowych terapii, zwiększając wiarygodność uzyskiwanych wyników.

W perspektywie długoterminowej *Danio rerio* ma realną szansę stać się jednym z filarów badań przedklinicznych nie jako substytut modeli ssaczych, lecz jako ich mądre, komplementarne uzupełnienie. W sytuacjach, w których kluczowe są szybkość, skalowalność oraz możliwość obserwacji procesów biologicznych *in vivo* w czasie rzeczywistym, trudno o model bardziej efektywny. Właśnie w tej synergii prostoty biologicznej i zaawansowania technologicznego – kryje się przyszłość badań z wykorzystaniem *D. rerio*.

Podsumowanie

Larwy *Danio rerio* stanowią dziś jeden z najbardziej wszechstronnych modeli badawczych wykorzystywanych w toksykologii, farmakologii i onkologii eksperymentalnej. Ich niewielkie rozmiary, niskie koszty utrzymania oraz szybki rozwój czynią je idealnym narzędziem do badań przesiewowych i analiz wymagających dużych prób. Co więcej, połączenie przezroczystości ciała z możliwością modyfikacji genetycznych otwiera wyjątkową perspektywę prowadzenia obserwacji procesów biologicznych *in vivo* w czasie rzeczywistym i z rozdzielczością nieosiągalną dla większości modeli ssaczych.

Model larwalny *D. rerio* umożliwia dziś nie tylko ocenę toksyczności narządowej, ale również badanie farmakodynamiki i mechanizmów molekularnych działania leków. Zastosowanie nowoczesnych technologii, takich jak edycja genów czy mikroskopia wysokiej rozdzielczości, znacząco poszerzyło jego możliwości badawcze. Te cechy sprawiają, że *Danio rerio* stał się kluczowym ogniwem pomiędzy prostymi modelami *in vitro* a bardziej złożonymi modelami ssaczymi, przyczyniając się do lepszego zrozumienia zjawisk biologicznych i toksykologicznych w ujęciu systemowym.

Nie można jednak pomijać jego ograniczeń. Różnice fizjologiczne, metaboliczne i anatomiczne między rybami a ssakami sprawiają, że wyniki uzyskane w tym modelu wymagają ostrożnej interpretacji. *D. rerio* nie zastępuje modeli ssaczych stanowi ich rozsądne uzupełnienie. Włączenie go do strategii badań wielomodelowych pozwala jednak znacząco zwiększyć wiarygodność i translacyjność uzyskiwanych danych, przy jednoczesnym ograniczeniu kosztów i liczby zwierząt doświadczalnych.

W ostatecznym rozrachunku larwy *Danio rerio* nie są wyłącznie „tańszym modelem" są pełnoprawnym narzędziem naukowym, które łączy biologię rozwojową, toksykologię i farmakologię w spójną, dynamicznie rozwijającą się dziedzinę. Ich rola w medycynie precyzyjnej i badaniach translacyjnych będzie bez wątpienia rosła w najbliższych latach, stanowiąc pomost między światem eksperymentalnym a kliniczną rzeczywistością.

Finansowanie
Niniejsza praca została sfinansowana w ramach projektu badawczego pt. „*Wpływ budezonidu jako adjuwanta o właściwościach hepatoprotekcyjnych na aktywność przeciwnowotworową regorafenibu w modelach in vitro i in vivo raka wątrobowokomórkowego*" (nr NMN0000165), realizowanego w programie Młodzi Naukowcy – Minigranty – edycja 2025, finansowanym z budżetu Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Konflikt interesów / Conflict of interest
Brak/None

Adres do korespondencji / Correspondence address
Filip Otto
Katedra i Zakład Farmacji Klinicznej i Biofarmacji Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
ul. Rokietnicka 3, 60-806 Poznań
(+48 61) 641 83 50
f.otto@ump.edu.pl

Piśmiennictwo/References

1. Yang H, Luan Y, Liu T, et al. A map of cis-regulatory elements and 3D genome structures in zebrafish. Nature. 2020;588(7837):337-43. doi:10.1038/s41586-020-2962-9.
2. Ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych.
3. Moossavi M, Lu X, Herrmann J, Xu X. Molecular mechanisms of anthracycline induced cardiotoxicity: zebrafish come into play. Front Cardiovasc Med. 2023;10:1080299. doi:10.3389/fcvm.2023.1080299.
4. Wan M, Xiao J, Liu J, et al. Cyclosporine A induces hepatotoxicity in zebrafish larvae via upregulating oxidative stress. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2023;266:109560. doi:10.1016/j.cbpc.2023.109560.
5. Bauer B, Liedtke D, Jarzina S, et al. Exploration of zebrafish larvae as an alternative whole-animal model for nephrotoxicity testing. Toxicol Lett. 2021;344:69-81. doi:10.1016/j.toxlet.2021.03.005.
6. Wang B, Chen J, Sheng Z, et al. Embryonic exposure to fentanyl induces behavioral changes and neurotoxicity in zebrafish larvae. PeerJ. 2022;10:e14524. doi:10.7717/peerj.14524.
7. Baraban SC. A zebrafish-centric approach to antiepileptic drug development. Dis Model Mech. 2021;14(7):dmm049080. doi:10.1242/dmm.049080.
8. Costa B, Estrada MF, Barroso MT, et al. Zebrafish patient-derived avatars from digestive cancers for anti-cancer therapy screening. Curr Protoc. 2022;2(4):e415. doi:10.1002/cpz1.415.
9. Fontana CM, Van Doan H. Zebrafish xenograft as a tool for the study of colorectal cancer: a review. Cell Death Dis. 2024;15(1):23. doi:10.1038/s41419-023-06291-0.
10. Su Z, Qin F, Zhang H, et al. Evaluation of developmental toxicity of safinamide in zebrafish larvae (Danio rerio). Ecotoxicol Environ Saf. 2023;262:115284. doi:10.1016/j.ecoenv.2023.115284.
11. Bartoszek A, Fornal E. Evaluation of caffeine modulation of topiramate effect on locomotor activity of zebrafish larvae in pentylenetetrazol-induced seizure model. PLoS One. 2025;20(3):e0317241. doi:10.1371/journal.pone.0317241.
12. Oziolor EM, Carey AN, Matson CW. A non-destructive BFCOD assay for in vivo measurement of cytochrome P450 3A enzyme activity in fish embryos and larvae. Ecotoxicology. 2017;26(6):809-19. doi:10.1007/s10646-017-1812-5.
13. Wang X, Copmans D, de Witte PAM. Using zebrafish as a disease model to study fibrotic disease. Int J Mol Sci. 2021;22(12):6404. doi:10.3390/ijms22126404.
14. Liu Y, Liao YL, Wang JX, et al. The effect and mechanisms of nano cerium dioxide on cardiovascular development in zebrafish. Environ Pollut. 2025;374:126268. doi:10.1016/j.envpol.2025.126268.
15. Xue H, Zhang Y, Chen N, et al. Monte Carlo determination of dose coefficients at different developmental stages of zebrafish in experimental condition. J Environ Radioact. 2021;237:106667. doi:10.1016/j.jenvrad.2021.106667.
16. de Oliveira JPJ, Estrela FN, Rodrigues ASL, et al. Behavioral and biochemical consequences of Danio rerio larvae exposure to polylactic acid bioplastic. J Hazard Mater. 2021;404:124152. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124152.
17. Kataba A, Botha TL, Nakayama SMM, et al. Environmentally relevant lead water concentration induce toxicity in zebrafish larvae. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2022;252:109215. doi:10.1016/j.cbpc.2021.109215.
18. Penha LCC, Rola RC, Martinez CBDR, et al. Effects of anti-inflammatory diclofenac assessed by toxicity tests and biomarkers in adults and larvae of Danio rerio. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2021;242:108955. doi:10.1016/j.cbpc.2020.108955.
19. Yu R, Ai N, Huang C, et al. Aspirin reduces ponatinib-induced cardiovascular toxic phenotypes and death in zebrafish. Biomed Pharmacother. 2024;180:117503. doi:10.1016/j.biopha.2024.117503.
20. Zhang Y, Cai Y, Zhang SR, et al. Mechanism of hepatotoxicity of first-line tyrosine kinase inhibitors: gefitinib and afatinib. Toxicol Lett. 2021;343:1-10. doi:10.1016/j.toxlet.2021.02.003.
21. English CD, Kazi KJ, Konig I, et al. Exposure to the antineoplastic ifosfamide alters molecular pathways related to cardiovascular function, increases heart rate, and induces hyperactivity in zebrafish. Environ Toxicol Pharmacol. 2024;107:104427. doi:10.1016/j.etap.2024.104427.
22. Bolten JS, Tanner C, Rodgers G, Schulz G, et al. Zebrafish larvae as a predictive model to study gentamicin-induced structural alterations of the kidney. PLoS One. 2023;18(4):e0284562. doi:10.1371/journal.pone.0284562.
23. Nilles EM, Bustad E, Qin M, et al. PEPITA: parallelized high-throughput quantification of ototoxicity and otoprotection in zebrafish larvae. Bio Protoc. 2024;14(21):e5105. doi:10.21769/BioProtoc.5105.
24. Caioni G, Merola C, Perugini M, et al. Sodium valproate effects on the morphological and neurobehavioral phenotype of zebrafish. Environ Toxicol Pharmacol. 2024;110:104500. doi:10.1016/j.etap.2024.104500.
25. Nowakowska K, Giebułtowicz J, Kamaszewski M, et al. Acute exposure of zebrafish larvae to environmental concentrations of selected antidepressants: bioaccumulation, physiological and histological changes. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2020;229:108670. doi:10.1016/j.cbpc.2019.108670.
26. Murari M, Pesavento S, Greco F, et al. Study of metabolism and potential toxicity of nine synthetic opioid analogs using the zebrafish larvae model. Drug Test Anal. 2024;16(6):629-37. doi:10.1002/dta.3590.
27. Verbueken E, Bars C, Ball JS, et al. From mRNA expression of drug disposition genes to in vivo assessment of CYP-mediated biotransformation during zebrafish embryonic and larval development. Int J Mol Sci. 2018;19(12):3976. doi:10.3390/ijms19123976.

28. Costa B, Estrada MF, Gomes A, et al. Zebrafish avatar-test forecasts clinical response to chemotherapy in patients with colorectal cancer. Nat Commun. 2024;15(1):4771. doi:10.1038/s41467-024-49051-0.
29. Hua X, Wu X, Xu K, et al. Zebrafish patient-derived xenografts accurately and quickly reproduce treatment outcomes in non-small cell lung cancer patients. Exp Biol Med (Maywood). 2023;248(4):361-9. doi:10.1177/15353702221142612.
30. Wei G, Zhang CX, Jing Y, et al. The influence of sunitinib and sorafenib on development and thyroid system in zebrafish larvae. Chemosphere. 2022;308:136354. doi:10.1016/j.chemosphere.2022.136354.
31. Gawel K, Langlois M, Martins T, et al. Seizing the moment: zebrafish epilepsy models. Neurosci Biobehav Rev. 2020;116:1-20. doi:10.1016/j.neubiorev.2020.06.010.
32. Tiraboschi E, Martina S, van der Ent W, et al. New insights into the early mechanisms of epileptogenesis in a zebrafish model of Dravet syndrome. Epilepsia. 2020;61(3):549-60. doi:10.1111/epi.16456.
33. Briñez-Gallego P, da Costa Silva DG, Cordeiro MF, et al. Experimental models of chemically induced Parkinson's disease in zebrafish: a systematic review. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2023;26(4):201-37. doi:10.1080/10937404.2023.2182390.
34. Shenoy A, Banerjee M, Upadhya A, et al. The brilliance of the zebrafish model: perception on behavior and Alzheimer's disease. Front Behav Neurosci. 2022;16:861155. doi:10.3389/fnbeh.2022.861155.
35. Raas Q, Haouy G, de Calbiac H, et al. TBK1 is involved in programmed cell death and ALS-related pathways in novel zebrafish models. Cell Death Discov. 2025;11(1):98. doi:10.1038/s41420-025-02374-3.
36. Zini S, Muscò A, Longhena F, et al. A novel stable transgenic zebrafish line expressing mCherry-tagged human alpha-synuclein in the nervous system and exhibiting features of Lewy body disorders at larval stage. Neurobiol Dis. 2025;213:107018. doi:10.1016/j.nbd.2025.107018.
37. Barbereau C, Yehya A, Silhol M, et al. Neuroprotective brain-derived neurotrophic factor signaling in the TAU-P301L tauopathy zebrafish model. Pharmacol Res. 2020;158:104865. doi:10.1016/j.phrs.2020.104865.
38. Ding P, Xiang C, Li X, et al. Photoaged microplastics induce neurotoxicity via oxidative stress and abnormal neurotransmission in zebrafish larvae. Sci Total Environ. 2023;881:163480. doi:10.1016/j.scitotenv.2023.163480.
39. Mehrabi H, Bansal P, Jutoy J, et al. Optogenetic activation of hypothalamic AgRP neurons in transgenic zebrafish larvae increases food intake. Sci Rep. 2025;15(1):17976. doi:10.1038/s41598-025-03040-5.
40. Correia D, Bellot M, Prats E, et al. Impact of environmentally relevant concentrations of fluoxetine on zebrafish larvae: from gene to behavior. Chemosphere. 2023;345:140468. doi:10.1016/j.chemosphere.2023.140468.
41. Nery LR, Eltz NS, Martins L, et al. Sustained behavioral effects of lithium exposure during early development in zebrafish: involvement of the Wnt-β-catenin signaling pathway. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2014;55:101-8. doi:10.1016/j.pnpbp.2014.04.011.
42. Thiagarajan SK, Mok SY, Ogawa S, et al. Integrative roles of dopamine pathway and calcium channels reveal a link between schizophrenia and opioid use disorder. Int J Mol Sci. 2023;24(4):4088. doi:10.3390/ijms24044088.
43. Abozaid A, Hung J, Tsang B, et al. Behavioral effects of acute ethanol in larval zebrafish depend on genotype and volume of experimental well. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2022;112:110411. doi:10.1016/j.pnpbp.2021.110411.
44. Wronikowska O, Michalak A, Skalicka-Woźniak K, et al. Fishing for a deeper understanding of nicotine effects using zebrafish behavioural models. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2020;98:109826. doi:10.1016/j.pnpbp.2019.109826.
45. Daziani G, Lo Faro AF, Montana V, et al. Synthetic cathinones and neurotoxicity risks: a systematic review. Int J Mol Sci. 2023;24(7):6230. doi:10.3390/ijms24076230.
46. Kullebi B, Alat Ö, Aksakal Ö, et al. Embryotoxicity evaluation of novel synthetic cannabinoid 4F-MDMB-BUTICA using zebrafish embryos. J Appl Toxicol. 2025;45(7):1314-30. doi:10.1002/jat.4778.
47. Janiak FK, Bartel P, Bale MR, et al. Non-telecentric two-photon microscopy for 3D random access mesoscale imaging. Nat Commun. 2022;13(1):544. doi:10.1038/s41467-022-28192-0.
48. Schlaeppi A, Graves A, Weber M, et al. Light sheet microscopy of fast cardiac dynamics in zebrafish embryos. J Vis Exp. 2021;(174):62741. doi:10.3791/62741.
49. Uribe-Salazar JM, Kaya G, Sekar A, et al. Evaluation of CRISPR gene-editing tools in zebrafish. BMC Genomics. 2022;23(1):12. doi:10.1186/s12864-021-08238-1.
50. Zakaria ZZ, Eisa-Beygi S, Benslimane FM, et al. Design and microinjection of morpholino antisense oligonucleotides and mRNA into zebrafish embryos to elucidate specific gene function in heart development. J Vis Exp. 2022;(186):63324. doi:10.3791/63324.