

## Larwalny model *Danio rerio* w badaniach angiogenezy nowotworowej i terapii antyangiogennej

### *The Danio rerio larval model in studies of tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapies*

Karolina Pawlak<sup>1</sup>, Julia Smurawa<sup>1</sup>, Dobrosława Wiśniewska<sup>1</sup>, Agnieszka Karbownik<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (<https://ror.org/02zbb2597>), Studenckie Towarzystwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Studenckie Koło Naukowe OnkoDanio

<sup>2</sup>Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (<https://ror.org/02zbb2597>), Katedra i Zakład Farmacji Klinicznej i Biofarmacji

#### Streszczenie

Artykuł przedstawia przegląd zastosowania larwalnego modelu *Danio rerio* w badaniach angiogenezy nowotworowej oraz terapii antyangiogennej. Angiogeneza odgrywa kluczową rolę w rozwoju nowotworów, umożliwiając wzrost guza i powstawanie przerzutów, co czyni ją ważnym celem terapeutycznym. W pracy omówiono mechanizmy molekularne regulujące ten proces, ze szczególnym uwzględnieniem VEGF (naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu), a także metody oceny angiogenezy. Zwrócono uwagę na ograniczenia tradycyjnych modeli badawczych oraz rosnącą rolę *Danio rerio* jako organizmu modelowego. W artykule podkreślono znaczenie ksenoprzeszczepów, umożliwiających analizę interakcji między komórkami nowotworowymi, a układem naczyniowym oraz ocenę skuteczności leków. (*Farm Współ* 2026; 19: 134-146) doi: 10.53139/FW.20261918

**Słowa kluczowe:** angiogeneza, *Danio rerio*, model larwalny, ksenoprzeszczep, terapie antyangiogenne

#### Abstract

This article provides an overview of the use of the *Danio rerio* larval model in research on tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapies. Angiogenesis plays a key role in tumor development, enabling tumor growth and metastasis, which makes it an important therapeutic target. The paper discusses the molecular mechanisms regulating this process, with particular emphasis on the VEGF pathway, and methods for assessing angiogenesis. Attention is drawn to the limitations of traditional research models and the growing role of the *Danio rerio* as a model organism. The article highlights the importance of xenografts, which enable the analysis of interactions between tumor cells and the vascular system and the evaluation of drug efficacy. (*Farm Współ* 2026; 19: 134-146) doi: 10.53139/FW.20261918

**Keywords:** angiogenesis, *Danio rerio*, larval model, xenograft, anti-angiogenic therapies

#### Wstęp

Angiogeneza, definiowana jako proces powstawania nowych naczyń krwionośnych z już istniejącej sieci naczyniowej, odgrywa kluczową rolę zarówno w fizjologii organizmu, jak i w patogenezie wielu chorób, w tym nowotworów. W warunkach fizjologicznych jest ona niezbędna dla procesów takich jak gojenie ran czy rozwój embrionalny [1]. Jednak w przebiegu

chorób nowotworowych angiogeneza ulega deregulacji i staje się jednym z fundamentalnych mechanizmów umożliwiających wzrost guza, jego progresję oraz tworzenie przerzutów. Nowotwory, poprzez wydzielanie czynników proangiogennej, takich jak naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF), indukują powstawanie nieprawidłowej, chaotycznej sieci naczyń, która zapewnia dopływ tlenu i składników odżywczych do guza.

czych, a jednocześnie sprzyja rozsiewowi komórek nowotworowych [1,2].

Zrozumienie mechanizmów regulujących angiogenezę nowotworową doprowadziło do rozwoju terapii antyangiogennych, które stanowią istotny element współczesnego leczenia onkologicznego. Leki ukierunkowane na szlaki sygnałowe związane z VEGF i jego receptorami, w tym przeciwciała monoklonalne oraz inhibitory kinaz tyrozynowych, znalazły zastosowanie w terapii wielu typów nowotworów, takich jak nowotwory ginekologiczne, rak jelita grubego, rak nerki czy rak płuca [2]. Pomimo początkowych sukcesów klinicznych, skuteczność tych terapii bywa ograniczona ze względu na rozwój oporności, heterogenność guzów oraz złożoność mikrośrodowiska nowotworowego. W związku z tym istnieje potrzeba poszukiwania nowych modeli badawczych, które umożliwią lepsze zrozumienie procesów angiogenezy oraz efektywniejszą ocenę leków.

Tradycyjnie stosowane modele badawcze, takie jak hodowle komórkowe *in vitro* czy modele zwierzęce oparte na ssakach, posiadają istotne ograniczenia. Modele *in vitro* nie odzwierciedlają w pełni złożonego mikrośrodowiska guza, natomiast modele ssacze, choć bardziej zbliżone do warunków klinicznych, są kosztowne, czasochłonne i trudniejsze do zastosowania w badaniach wysokoprzepustowych. Dlatego coraz większe zainteresowanie jest związane z wykorzystaniem modelu *Danio rerio*, zwłaszcza w stadium larwalnym, jako narzędzia do badań nad angiogenezą nowotworową.

Larwalny model *Danio rerio* charakteryzuje się szeregiem unikalnych cech, które czynią go szczególnie przydatnym w badaniach biomedycznych. Przezroczystość zarodków umożliwia bezpośrednią obserwację procesów biologicznych *in vivo*, w tym dynamiki powstawania naczyń krwionośnych [1-3].

Szczególne znaczenie ma również możliwość tworzenia modeli ksenoprzeszczepów (ksenograftów), w których ludzkie komórki nowotworowe są implantowane do larw *Danio rerio*. Takie podejście pozwala na analizę interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi a układem naczyniowym gospodarza, ocenę potencjału angiogenego guza oraz testowanie skuteczności terapii antyangiogennych w warunkach *in vivo* [4,5].

Celem niniejszej publikacji przeglądowej jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat wykorzystania larwalnego modelu *Danio rerio*

w badaniach angiogenezy nowotworowej oraz ocena jego przydatności w badaniach nad terapiami antyangiogennymi.

## Metodyka

Niniejszą publikację przeglądową opracowano na podstawie analizy literatury dostępnej w bazach danych PubMed, Consensus oraz Google Scholar. Wyszukiwane hasła obejmowały: angiogeneza, *Danio rerio*, danio przegowany, model larwalny, ksenoprzeszczep, ksenograft, terapie antyangiogenne, linie reporterowe. Do przeglądu zakwalifikowano oryginalne artykuły opublikowane w języku angielskim w latach 2006-2024. W pracy uwzględniono zarówno badania *in vitro* jak i *in vivo*, koncentrujące się na zastosowaniu modelu *Danio rerio* w badaniach angiogenezy nowotworowej oraz ocenie skuteczności terapii antyangiogennych.

## Model *Danio rerio* – podstawy biologiczne

*Danio rerio* stał się popularnym organizmem modelowym w badaniach biomedycznych, ponieważ jako kręgowiec ma dużą zgodność genetyczną z człowiekiem (około 70% genów) [6]. Jego główną zaletą jest przezroczystość zarodków i larw, co umożliwia obserwowanie procesów takich jak angiogeneza czy interakcje komórek nowotworowych w czasie rzeczywistym, zwłaszcza przy użyciu technik fluorescencyjnych. Dodatkowo dzięki możliwości stosowania reporterów genowych oraz systemów śledzenia linii komórkowych (ang. *lineage tracing*), możliwa jest analiza pochodzenia i losów poszczególnych populacji komórek [1,4,6,7].

Rozwój podstawowych struktur narządowych, w tym układu krążenia u *Danio rerio* przebiega bardzo szybko (24-48 godzin po zapłodnieniu). Szlaki sygnałowe regulujące wczesny rozwój układu naczyniowego są analogiczne do tych obserwowanych u ssaków, w tym VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*), Notch czy FGF (ang. *Fibroblast Growth Factors*) [2]. Dodatkowo larwy *Danio rerio* są powszechnie wykorzystywane w tworzeniu modeli ksenoprzeszczepów. Wynika to z faktu, że we wczesnych stadiach rozwoju larwalnego ich układ odporności adaptacyjnej (swoistej) nie jest jeszcze funkcjonalny. Dojrzałe, funkcjonalne limfocyty T pojawiają się w grasicy larw dopiero między 9. a 11. dniem po zapłodnieniu (dpf, ang. *days post-fertilization*), natomiast pełną dojrzałość limfocytów B oraz zdolność do syntezy immunoglobulin (głównie IgM i IgZ) model ten osiąga znacznie później – dopiero między 4. a 6. tygo-

dniem życia. W efekcie, w ciągu pierwszych kilkunastu dni rozwoju, larwy polegają wyłącznie na odporności wrodzonej (nieswoistej), co zapobiega immunologicznemu odrzuceniu obcych komórek i umożliwia udaną implantację ksenoprzeszczepu bez konieczności stosowania chemicznej immunosupresji [8,9].

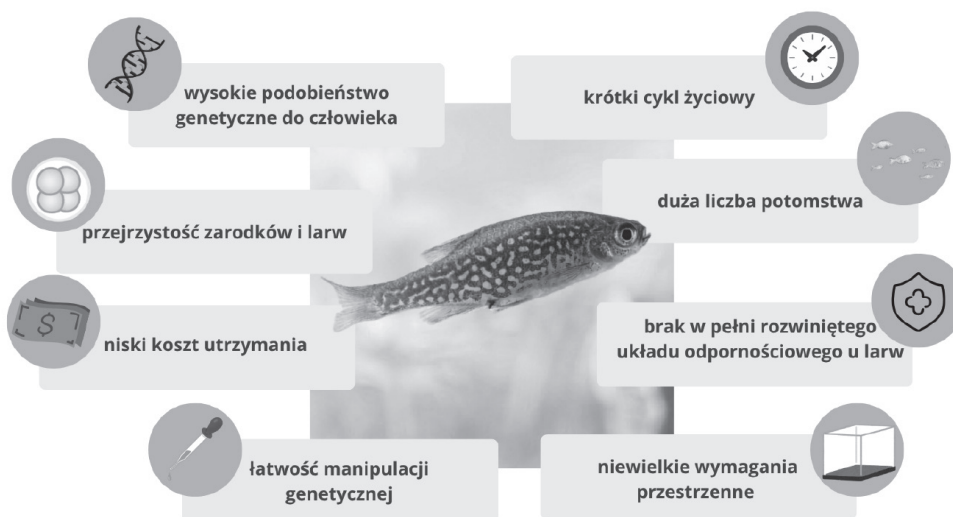
Ograniczenia modelu *Danio rerio* obejmują istotne różnice fizjologiczne względem ssaków, w tym odmienności w metabolizmie ksenobiotyków oraz makroskopowej i mikroskopowej strukturze niektórych narządów. W zakresie metabolizmu leków, choć genom *Danio rerio* koduje liczne cytochromy P450, ich specyficzność substratowa często odbiega od ludzkiej. Przykładem są enzymy z rodziny CYP3 (odpowiedniki ludzkiej rodziny CYP3A, odpowiedzialnej za metabolizm większości leków). Profil metaboliczny ryb wykazuje istotne odmienności ilościowe i jakościowe. Przykładowo, testosteron – standardowy substrat dla ludzkiego CYP3A4 – jest metabolizowany odmiennie przez enzymy *Danio rerio*, nie tworząc charakterystycznego dla ssaków profilu pochodnych 6 $\beta$ -hydroksyt testosteronu [10].

Ponadto, uproszczona anatomia niektórych układów ogranicza translacyjność wyników. Układ krążenia *Danio rerio* opiera się na sercu dwujamowym (jeden przedsionek i jedna komora), a wymiana gazowa zachodzi bez udziału płuc [11]. Z kolei w układzie

pokarmowym tych ryb występuje anatomiczny brak wydzielającego kwas żołądka oraz brak gruczołów żołądkowych (funkcję tę pełni tzw. opuszka jelitowa, ang. *intestinal bulb*). Przekłada się to na stałe, zasadowe pH środowiska trawienego (pH  $\geq 7,5$ ), co istotnie modyfikuje profil wchłaniania, stabilność chemiczną i biodostępność cząsteczek podawanych drogą doustną w porównaniu do środowiska żołądka ssaków [11,12]. Ponadto brak w pełni rozwiniętego układu odpornościowego w stadium larwalnym ogranicza możliwość badania pełnych, długoterminowych interakcji immunologicznych w mikrosrodoisku guza [5,8].

### Modele angiogenezy nowotworowej u *Danio rerio*

Model larwalny *Danio rerio* stanowi obecnie jedno z najbardziej obiecujących narzędzi do badania angiogenezy nowotworowej w warunkach *in vivo*. Dzięki połączeniu przezroczystości zarodków, dostępności linii transgenicznnych oraz możliwości przeszczepiania komórek nowotworowych, umożliwia on bezpośrednią obserwację interakcji pomiędzy guzem a układem naczyniowym gospodarza. W zależności od celu badania stosuje się różne strategie modelowania angiogenezy nowotworowej, z których najważniejsze obejmują modele ksenoprzeszczepów oraz analizy funkcjonalne układu naczyniowego.



Rycina przygotowana przez autorkę (Pawlak K.) w programie Canva.

Rycina I. Charakterystyczne cechy modelu *Danio rerio*  
Figure I. Characteristic features of the *Danio rerio* model

## Modele ksenoprzeszczepów (ksenograf)

Najczęściej stosowaną metodą badania angiogenezy nowotworowej u *Danio rerio* jest implantacja komórek nowotworowych do organizmu larwy. W modelach tych wykorzystuje się zarówno linie komórkowe (ang. *cell line-derived xenografts*, CDX), jak i komórki pochodzące bezpośrednio od pacjentów (ang. *patient-derived xenografts*, PDX). Komórki nowotworowe są uprzednio znakowane fluorescencyjnie, co umożliwia ich śledzenie po implantacji.

Do najczęściej wykorzystywanych miejsc iniekcji należą:

- przestrzeń okołowitelinowa (ang. *perivitelline space*),
- woreczek żółtkowy (ang. *yolk sac*),
- krążenie (np. zatoka Cuviera) w badaniach przezrutowania [6].

Wydajność implantacji, przeżywalność oraz dynamika proliferacji i migracji komórek guza nie są jednak cechami uniwersalnymi dla wszystkich linii komórkowych. Właściwości te są ściśle uwarunkowane czynnikami metodologicznymi, takimi jak stadium rozwojowe gospodarza, wybrane miejsce iniekcji oraz temperatura inkubacji (zazwyczaj obniżona do 31-34°C). W literaturze wykazano, że linie komórkowe wykazują skrajnie różną efektywność w tym modelu. Przykładowo, podczas gdy linie raka piersi o agresywnym fenotypie, takie jak MDA-MB-231, wykazują wysoką przeżywalność i silną indukcję angiogenezy, inne linie – np. MCF-7 (zależna od estrogenów) – w modelu larwalnym charakteryzują się znacznie niższą wydajnością wszczepiania, a po iniekcji wykazują drastycznie ograniczoną zdolność do podziałów komórkowych *in vivo* bez dodatkowej suplementacji hormonalnej [13]. Co więcej, obniżona temperatura inkubacji (poniżej 34°C) sprawia, że część ludzkich linii komórkowych (co wykazano m.in. dla niektórych linii raka jelita grubego, takich jak HCT116 lub HT29) wchodzi w stan zahamowania cyklu komórkowego, co skutkuje brakiem realnej proliferacji, a nawet masową apoptozą komórek guza w ciele ryby [13,14].

W optymalnych warunkach eksperymentalnych wprowadzone komórki nowotworowe wykazują jednak zdolność do oddziaływania z mikrośrodowiskiem gospodarza. Kluczowym aspektem tych modeli jest zdolność komórek guza do indukowania angiogenezy poprzez wydzielanie czynników proangiogennych, co prowadzi do wzrostu i przebudowy lokalnej sieci naczyniowej [2,5,6].

## Interakcja guz-układ naczyniowy

Jedną z największych zalet modelu *Danio rerio* jest możliwość bezpośredniej wizualizacji procesów angiogenezy indukowanej przez nowotwór. Komórki nowotworowe, po implantacji, wydzielają czynniki takie jak VEGF, które stymulują proliferację i migrację komórek śródbłonna. W efekcie dochodzi do:

- tworzenia nowych naczyń skierowanych w stronę guza,
- zwiększenia liczby rozgałęzień naczyniowych,
- zmiany morfologii istniejących naczyń,
- wzrostu przepuszczalności śródbłonna [3,4].

W odróżnieniu od modeli *in vitro*, procesy te zachodzą w kontekście całego organizmu, co pozwala uwzględnić wpływ czynników mechanicznych, metabolicznych oraz interakcji komórkowych. Dodatkowo model ten umożliwia jednoczesną analizę angiogenezy i procesów przerzutowania, ponieważ nowo powstałe naczynia mogą stanowić drogę rozsiewu komórek nowotworowych.

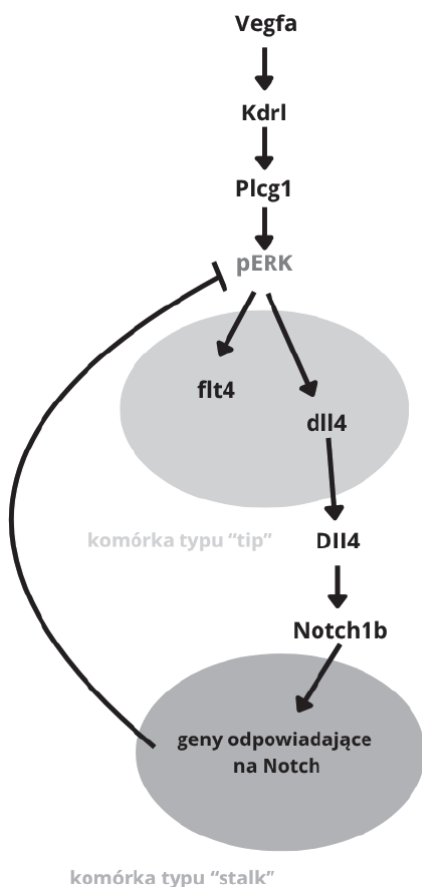
## Mechanizmy angiogenezy zależnej od VEGF

*Danio rerio* jest cennym narzędziem do oceny wpływu sygnalizacji VEGF na angiogenezę, ze względu na to, że posiada prostą i dobrze scharakteryzowaną sieć naczyniową pnia. Składa się ona z pojedynczej tylnej żyły głównej oraz aorty grzbietowej z której w procesie angiogenezy formują się naczynia międzysegmentowe (ang. *Intersegmental Vessels*, ISV) [15,16].

Kluczową rolę w regulacji angiogenezy odgrywa czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego A (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor A*, Vegfa). Vegfa wiąże się z receptorem Vegfr2 (Kdrl), w wyniku czego, dochodzi do aktywacji szeregu wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, takich jak MAPK/ERK (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase / Extracellular Signal-Regulated Kinase*), PI3K/AKT (ang. *Phosphoinositide 3-Kinase / Protein Kinase B*) oraz PLCγ (ang. *Phospholipase C gamma*), które odpowiadają za regulację proliferacji, przeżycia i migracji komórek [16,17]. U zarodków *Danio rerio* z mutacjami w genach *kdrl* i *plcg1* obserwuje się uszkodzenia w naczyniach pnia, zaburzenie różnicowania tętnic, opóźniony rozwój ISV i przetokę tętniczo-żylną [16].

Niektóre badania sugerują, że elementy sygnalizacji Vegf mogą być modulowane także przy pomocy podjednostek białka G, jednak do potwierdzenia tych mechanizmów regulacji szlaku potrzebne są dalsze

badania [18]. Równocześnie z szlakiem Vegf w angiogenezie udział bierze szlak Notch, który zmniejsza aktywację ERK (ang. *Extracellular Signal-Regulated Kinase*) i hamuje kiełkowanie. Prowadzi on z jednej strony do ograniczenia liczby komórek “tip”, charakteryzujących się wysoką aktywnością sygnalizacji VEGF i zwiększoną ekspresją receptora Flt4 (Vegfr3), a z drugiej strony promuje różnicowanie się sąsiednich komórek typu “stalk” odpowiedzialnych za wydłużanie i stabilizację naczyń [15,16,19,20].



Rycina przygotowana przez autorkę (Pawlak K.) w programie Canva.

Dll4 – białko Dll4 (ang. *Ligand Delta-like 4*); ERK – kinaza regulowana sygnałami zewnątrzkomórkowymi (ang. *Extracellular Signal-Regulated Kinase*); Flt4 – kinaza tyrozynowa 4 typu Fms (ang. *Fms-related tyrosine kinase 4*); Notch – szlak sygnałowy Notch (ang. *Notch signaling pathway*); Plcg1 – fosfolipaza C gamma 1 (ang. *Phospholipase C gamma 1*); Vegfa – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu A (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor A*)

Rycina II. Rola Vegfa w angiogenezie  
Figure II. The role of Vegfa in angiogenesis

W komórkach typu “tip”, Vegfa aktywuje ERK poprzez Plcg1, co prowadzi do zwiększonej ekspresji genów *flt4* i *dll4* i w konsekwencji promowania angiogenezy, z kolei aktywacja szlaku Notch za pośrednictwem Dll4 w komórkach “stalk” prowadzi do zmniejszenia aktywacji ERK i zahamowania kiełkowania.

## Metody oceny angiogenezy

Analiza angiogenezy w modelu *Danio rerio* opiera się głównie na technikach obrazowania fluorescencyjnego. Najczęściej wykorzystuje się linie transgeniczne z ekspresją białek fluorescencyjnych w komórkach śródbłonna, co umożliwia szczegółową ocenę architektury naczyń.

Do podstawowych parametrów ilościowych należą:

- długość naczyń krwionośnych,
- liczba i gęstość rozgałęzień,
- powierzchnia unaczynienia w obrębie guza,
- liczba nowo powstałych naczyń (ang. *angiogenic sprouting*),
- perfuzja naczyń oraz ich drożność [3].

Dodatkowo możliwe jest zastosowanie markerów proliferacji i apoptozy komórek śródbłonna, co pozwala na ocenę dynamiki procesów angiogenicznych.

W badaniach wymagających wysokiej rozdzielczości czasowo-przestrzennej wykorzystuje się mikroskopię arkusza światła (LSFM, ang. *Light-Sheet Fluorescence Microscopy*), która wykazuje istotną przewagę technologiczną nad standardową mikroskopią szerokiego pola czy konfokalną (CLSM). W przeciwieństwie do tradycyjnego obrazowania konfokalnego, gdzie zbieżna wiązka lasera intensywnie naświetla całą objętość tkanki prowadząc do szybkiego wygaszania fluorescencji (*fotobleachingu*) i fototoksyczności, w technologii LSFM płaszczyzna oświetlenia jest prostopadła do osi detekcji. Pobudzeniu ulega wyłącznie cienki, wyselekcjonowany optycznie arkusz próbki (o grubości rzędu mikrometrów). Pozwala to na redukcję obciążenia fototoksycznego o kilkadziesiąt razy i umożliwia prowadzenie ciągłego, wielogodzinnego obrazowania *in vivo* wrażliwych struktur naczyniowych bez zakłócania rozwoju larwy [21].

Ponadto, zastosowanie szybkich detektorów matrycowych w LSFM zamiast skanowania punktowego za pomocą fotopowielaczy (charakterystycznego dla CLSM) skraca czas akwizycji pojedynczych przekrojów do milisekund. Eliminuje to problem rozmycia ruchu i umożliwia precyzyjną, trójwymiarową

rekonstrukcję (3D + czas) dynamicznych procesów hemodynamicznych oraz pączkowania naczyń w czasie rzeczywistym [21, 22].

## Modele funkcjonalne i manipulacje genetyczne

Model *Danio rerio* pozwala nie tylko na obserwację angiogenezy, ale także na jej modyfikację poprzez ingerencję w ekspresję genów. W tym celu stosuje się: morpholino (knockdown genów), CRISPR/Cas9 (mutacje genowe), linie transgeniczne z nadekspresją określonych genów. Manipulacje te umożliwiają badanie roli konkretnych szlaków sygnałowych w regulacji angiogenezy, w tym VEGF, Notch czy HIF. Dzięki temu możliwe jest modelowanie zarówno nadmiernej angiogenezy (jak w nowotworach), jak i jej zahamowania [2,5,6].

## Linie reporterowe naczyń krwionośnych

W celu wizualizacji rozwoju i funkcjonowania układu naczyń krwionośnych stworzono transgeniczne linie *Danio rerio*, w których specyficzne promotory genów śródbłonna odpowiadają za ekspresję fluorescencyjnych białek np. GFP, EGFP, mCherry. Porównanie najczęściej wykorzystywanych linii reporterowych zestawiono w poniższej tabeli [23-27].

Zastosowanie fluorescencyjnych reporterów umożliwia śledzenie rozwoju dynamiki komórek podczas pączkowania naczyń, analizę proliferacji i migracji komórek śródbłonna oraz ocenę tworzenia

i stabilizacji sieci naczyniowej. Pomimo licznych zalet, linie reporterowe mają także ograniczenia. Ekspresja białka reporterowego u *Danio rerio* nie zawsze jest taka sama jak ekspresja białka ortologicznego, czego przyczyną są różnice w elementach promotorowych między gatunkami. Jednak nowoczesne technologie rozwoju genomu, takie jak CRISPR/Cas9, pozwalają na tworzenie linii typu knock-in, które bardziej naśladują endogenną ekspresję genów [23,24].

## Mechanizmy działania leków antyangiogennych

Terapie antyangiogenne są ukierunkowane głównie na zahamowanie szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za proliferację, migrację i przeżycie komórek śródbłonna. Kluczową rolę odgrywa tutaj oś VEGF-VEGFR, której aktywacja prowadzi do powstawania nowych naczyń krwionośnych. Leki stosowane w terapii antyangiogennej można podzielić na kilka głównych grup:

- przeciwciała monoklonalne (np. bewacyzumab), które neutralizują VEGF,
- nieselektywne inhibitory kinaz tyrozynowych (TKI) (np. sunitynib, sorafenib, pazopanib), blokujące receptory VEGFR oraz inne kinazy,
- selektywne inhibitory kinaz tyrozynowych, np. aksytynib i inne substancje działające antyangiogenne

Model *Danio rerio* umożliwia analizę działania tych leków na poziomie całego organizmu, co pozwala

Tabela I. Główne linie reporterowe *Danio rerio*

Table I. Major *Danio rerio* reporter lines

| Cecha             | fli1a                                                             | kdrl (flk1)                                                      | tie2                                        |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Ekspresja         | pan-endotelialna                                                  | specyficzna ekspresja w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych | ekspresja w komórkach dojrzałego śródbłonna |
| Szlak molekularny | ETS (czynn timeranskrypcyjny)                                     | VEGFR2                                                           | angiopoetyna/Tie2                           |
| Komórki docelowe  | komórki śródbłonna, progenitory, niektóre komórki hematopoetyczne | komórki śródbłonna                                               | dojrzałe komórki śródbłonna                 |
| Zastosowanie      | wizualizacja naczyń, migracji i proliferacji                      | analiza angiogenezy, odpowiedź na VEGF                           | stabilizacja naczyń, remodeling             |
| Zalety            | wczesna ekspresja, wysoka intensywność sygnału                    | większa swoistość dla naczyń                                     | specyficzność dla dojrzałych naczyń         |
| Wady              | ekspresja także poza śródbłonkiem                                 | może nie obejmować wszystkich progenitorów                       | mniej przydatne we wczesnej angiogenezie    |
| Typowe linie      | Tg(fli1a:EGFP), Tg(fli1a:LifeAct-GFP)                             | Tg(kdrl:EGFP), Tg(kdrl:mCherry)                                  | Tg(tie2:GFP)                                |

na ocenę ich efektów nie tylko na śródbłonek, ale także na inne elementy mikrośrodowiska nowotworowego.

### **Przeciwciała monoklonalne neutralizujące VEGF**

Bewacyzumab to humanizowane przeciwciało monoklonalne, którego mechanizm działania polega na blokowaniu trzech ludzkich izoform VEGF-A. W formie związanej nie jest możliwa interakcja VEGF-A z jego receptorami, co powoduje upośledzenie sygnalizacji oraz angiogenezy. Komórki nowotworowe mogą również eksportować receptory, które reagują na ten szlak, dzięki czemu kontrolują proliferację, przeżycie i migrację komórek nowotworowych. VEGF-A, poprzez działanie na różnych etapach kaskady inwazji i przerzutów może paradoksalnie zmniejszać lub też wywoływać przerzuty.

Aktualnie jest stosowany w monoterapii lub w skojarzeniu z lekami przeciwnowotworowymi. Podawany jest głównie na przerzutowego raka jelita grubego (CRC), przerzutowego raka piersi, niedrobnokomórkowego raka płuc, raka jajnika, przerzutowe raki nerek i glejaki. Lek osiąga wysoką skuteczność jedynie w określonych typach nowotworów, a jego stosowanie wiąże się z możliwością wystąpienia ciężkich działań niepożądanych: sercowo-naczyniowych, krwawień i toksyczności nerkowej [4].

### **Nieselektywne inhibitory kinaz tyrozynowych (TKI)**

Sunitynib jest wielokierunkowym inhibitorem kinazy tyrozynowej (TKI). Ma niską masę cząsteczkową, a jego działanie polega na hamowaniu receptorów płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF-R) oraz receptorów czynnika wzrostu śródbłonka (VEGFR). Dodatkowo działa hamująco na receptory c-KIT, kinazę tyrozynową 3 związaną z fms (FLT3) i RET. Jednoczesne działanie na te szlaki powoduje zmniejszenie unaczynienia guza i obkurczanie się guza w wyniku indukcji apoptozy. Na poziomie molekularnym udowodniono także oddziaływanie na cytozolowe szlaki MEK/ERK i SAPK/JNK w komórkach RET/PTC1. Wynikiem tego jest hamowanie proliferacji komórek i stymulacja ekspresji genu symportera sodowo-jodkowego (NIS) w tych komórkach.

Został zarejestrowany do leczenia nowotworów podścieliska przewodu pokarmowego (GIST), raka nerki i guzów neuroendokrynnych trzustki [28,29].

Sorafenib jest inhibitorem wielokinazowym o właściwościach antyangiogennych [30,31]. Główne

działanie tego leku polega na zahamowaniu kinazy tyrozynowej (TKI) i działaniu przeciwko czynnikom angiogennym VEGFR i PDGFR [20,22]. Lek został zarejestrowany do leczenia przerzutowego raka nerki [31].

Pazopanib jest nieselektywnym inhibitorem kinazy tyrozynowej (TKI) o molekularnie wielokierunkowym działaniu przeciwnowotworowym. Przede wszystkim hamuje receptory czynnika wzrostu śródbłonka 1, 2 i 3, receptory czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego alfa i beta i receptor czynnika wzrostu komórek macierzystych c-KIT. Lek ten, poza typowymi dla wszystkich inhibitorów kinazy tyrozynowej działaniami niepożądanymi, wpływa na zaburzenia pracy tarczycy. Został zarejestrowany do leczenia mięsaka tkanek miękkich i raka nerkowokomórkowego (RCC) [32,33].

### **Selektywne inhibitory kinaz tyrozynowych**

Czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) jest głównym czynnikiem stymulującym angiogenezę. Poziomy, wielokrotnie przewyższające wartości referencyjne, obserwujemy w mikrośrodowisku guzów, co przyczynia się do powstawania nieprawidłowych naczyń krwionośnych guza. Leki antyangiogenne, które blokują szlak VEGF/VEGFR 2 mogą być potencjalnie użyte do leczenia raka [5].

Ich działanie polega na zmniejszeniu ilości i rozgałęzień naczyń krwionośnych i doprowadza do silnego ich ukrwienia, co wskazuje na normalizację i dojrzewanie naczyń. Takie działanie powoduje skuteczniejsze dostarczanie substancji chemicznych do guzów co może wzmacniać efekty radioterapii i immunoterapii [5].

PF-502 jest inhibitorem PI3K/AKT/mTOR o działaniu zbliżonym do VEGFR. Wykazano również skuteczność w indukowaniu rozszczepiania S3 Notch1, uwalnianiu domeny wewnątrzkomórkowej Notch (NICD) i aktywowaniu genów docelowych w komórkach śródbłonka (Hes1, Hey1). Badania wykazały skuteczność tego związku w jednoczesnym indukowaniu trwałej poprawy funkcji krwi oraz znacząco zmniejszając gęstość nowych naczyń krwionośnych. Doprowadza do zatrzymania cyklu komórkowego komórek nowotworowych na różnych etapach rozwoju. Już po 24 godzinach od podania leku wykazano istotny spadek wskaźnika proliferacji [5].

Tabela II. Wybrane leki antyangiogenne oceniane w modelu *Danio rerio*  
 Table II. Selected anti-angiogenic drugs evaluated in the *Danio rerio* model

| Lek                                            | Cel molekularny                             | Efekt w modelu <i>Danio rerio</i>                                                                                                                   | Parametry oceny angiogenezy                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Wskazania kliniczne                                                            | Model / Linia transgeniczna                                                         |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Bewacyzumab – przeciwciało monoklonalne        | VEGF-A                                      | ↓ Gęstość naczyń guza<br>↓ Naciekanie naczyń do guza<br>↓ Liczba punktów rozgałęzień<br>→ Bez istotnej zmiany śr. długości naczyń                   | Gęstość naczyń (% powierzchni fluorescencji, mikroskopia konfokalna)<br><br>Naciekanie naczyń do guza (ang. <i>vessel infiltration</i> )<br><br>Liczba punktów rozgałęzień (ang. <i>branching points</i> , analiza filamentów 3D Imaris/ImageJ)<br><br>Średnia długość naczyń (ang. <i>average vessel length</i> )             | Rak jelita grubego, niedrobnokomórkowy rak płuca, rak piersi                   | Ksenograft/z-Avatar, iniekcja do PVS (2 dpf), ocena 4 dpi                           |
| Sunitynib – inhibitor kinaz tyrozynowych (TKI) | VEGFR-1/2/3, PDGFR-α/β, c-KIT, FLT3, RET    | ↓ Angiogeneza (ISV)<br>↓ Liczba i długość naczyń siatkówki<br>↓ Masa guza<br>↑ Apoptoza komórek nowotworowych<br>↓ Morfogeneza pęcherzyków tarczycy | Liczba w pełni uformowanych ISV (ang. <i>intersegmental vessels</i> )<br><br>Liczba odgałęzień naczyńiowych (ang. <i>branching points</i> ) w siatkówce<br><br>Liczba paków naczyńiowych, Odległości między naczyńiami włosowatymi (ang. <i>intercapillary distance</i> )<br><br>Całkowita powierzchnia unaczynienia siatkówki | GIST, rak nerki, guzy neuroendokryne trzustki, rak tarczycy                    | Ocena morfogenezy tarczycy, linia Tg(fli1:EGFP) w modelu retinopatii niedokrwiennej |
| Sorafenib – inhibitor kinaz tyrozynowych (TKI) | VEGFR-2/3, PDGFR-β, RAF kinazy, c-KIT, FLT3 | ↓ Angiogeneza (ISV)<br>↓ Wielkość guza<br>↓ Morfogeneza pęcherzyków tarczycy                                                                        | Liczba i długość ISV (ang. <i>intersegmental vessels</i> , linia Tg(fli1:EGFP))<br><br>Intensywność fluorescencji GFP naczyń (półilościowo)<br><br>Ocena pęcherzyków tarczycy metodą WISH i histopatologią                                                                                                                     | przerzutowy rak wątrobowokomórkowy, nerkowokomórkowy, różnicowany rak tarczycy | Tg(tg:GFP)                                                                          |
| Pazopanib – inhibitor kinaz tyrozynowych (TKI) | VEGFR-1/2/3, PDGFR-α/β, c-KIT               | ↓ Angiogeneza (ISV)<br>↓ Morfogeneza pęcherzyków tarczycy<br>↓ Zaburzenia osi HPT                                                                   | Liczba w pełni uformowanych ISV<br><br>Morfologia pęcherzyków tarczycy (WISH, linia Tg(tg:EGFP))<br><br>Ocena histopatologiczna larw po ekspozycji na stężenia 10-100 nM                                                                                                                                                       | mięsak tkanek miękkich, rak nerkowokomórkowy                                   | Tg(tg:EGFP)                                                                         |

|                                                                  |                                              |                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                          |                                                 |                   |
|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------|
| PF-502 – inhibitor PI3K/mTOR, aktywator szlaku Notch             | PI3K/AKT/mTOR sygnalizacja Notch             | ↓ Gęstość nowo-naczyń guza<br>↓ Unaczynienie guza<br>→ Stabilizacja światła naczyń<br>↑ Perfuzja krwi w naczyniach guza<br>↓ Zatrzymanie cyklu komórkowego EC | Gęstość neo-naczyń (ang. <i>neovessel density</i> , obrazowanie konfokalne <i>in vivo</i> )<br><br>Obecność i drożność światła naczyń<br><br>Perfuzja krwi w naczyniach guza<br><br>Morfologia naczyń                    | guzy lite (badania przedkliniczne)              | zFXVP             |
| Aktywność – inhibitor kinaz tyrozynowych (TKI), selektywny VEGFR | VEGFR-1/2/3                                  | ↓ Angiogeneza (ISV)<br>↓ Morfogeneza pęcherzyków tarczycy<br>↓ Zaburzenia osi HPT                                                                             | Liczba w pełni uformowanych ISV<br><br>Morfologia pęcherzyków tarczycy (WISH, linia Tg(tg:EGFP))<br><br>Ocena histopatologiczna larw po ekspozycji na stężenia 10-100 nM                                                 | rak trzustki, przerzutowy rak nerki-wokomórkowy | Tg(tg:EGFP)       |
| miR-492 – mikroRNA o działaniu antyangiogennym                   | 3'UTR genów proangiogennych szlak VEGF/VEGFR | ↓ Tworzenie neo-naczyń przy guzie<br>↓ Odsetek embriionów z naczyń infiltrującymi ksenograf                                                                   | Odsetek embriionów z naczyń GFP+ infiltrującymi ksenograf (% <i>positive embryos</i> , ocena 72 hpf)<br><br>Obecność nowo-naczyń w pobliżu SIV<br><br>Jakościowa ocena wzorca naczyniowego (mikroskopia fluorescencyjna) | rak prostaty                                    | Tg(kdrl:eGFP)s843 |

Objaśnienia skrótów linii transgenicznych i terminologii:

Tg(fli1:eGFP) – linia transgeniczna z ekspresją EGFP pod kontrolą promotora flil (ang. *friend leukemia integration 1*), znakuje komórki śródbłonnka i erytrocyty, szeroko stosowana do wizualizacji unaczynienia *in vivo*.

Tg(tg:GFP) / Tg(tg:EGFP) – linia z ekspresją GFP pod kontrolą promotora tg (ang. *thyroglobulin*), używana do oceny morfogenezy i funkcji tarczycy

ISV (ang. *intersegmental vessels*) – naczynia międzysegmentarne, standardowy parametr angiogenezy rozwojowej u larw *Danio rerio*.

PVS (ang. *periviteline space*) – przestrzeń perivitelinalna, alternatywne miejsce iniekcji komórek nowotworowych.

dpf / hpf days/hours post-fertilization – dni/godziny po zapłodnieniu.

HPT (ang. *hypothalamo-pituitary-thyroid axis*) – oś podwzgórze-przysadka-tarczyca.

GIST (ang. *gastrointestinal stromal tumor*) – nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego.

Tg(kdrl:eGFP)<sup>s843</sup> – linia z ekspresją EGFP pod kontrolą promotora kdrl (ang. *kinase insert domain receptor-like*, odpowiednik VEGFR2), specyficzny marker naczyń krwionośnych.

zFXVP (ang. *Zebrafish Functional Xenograft Vasculature Platform*) – podwójna linia Tg(kdrl:eGFP / gata1:dsRed) umożliwiająca jednoczesne wizualizowanie śródbłonnka naczyń i erytrocytów.

SIV (ang. *subintestinal vessels*) – naczynia podjelitowe, miejsce standardowej iniekcji ksenografów przy ocenie angiogenezy nowotworowej.

dpi days post-injection – dni po iniekcji komórek nowotworowych.

WISH (ang. *whole-mount in situ hybridization*) – hybrydyzacja *in situ* na całym zarodku, metoda oceny ekspresji genów.

EC (ang. *endothelial cell*) – komórka śródbłonnka naczyniowego.

↓ / ↑ / → – zmniejszenie / zwiększenie / brak istotnej zmiany parametru w stosunku do kontroli.

Aksytynib jest inhibitorem kinazy tyrozynowej (TKI) o molekularnie wielokierunkowym działaniu przeciwnowotworowym. [32] Jest silnym i selektywnym inhibitorem VEGF RTK 1, 2 i 3. Lek ten, poza typowymi dla wszystkich inhibitorów kinazy tyrozynowej działaniami niepożądanymi, wykazuje działanie toksyczności rozwojowej na zarodki *Danio rerio* wraz ze zwiększającą się dawką leku. Dodatkowo dochodzi do zaburzenia pracy tarczycy i jej morfologii.

Obecnie dane pochodzące z wyników badań II fazy dają szansę na leczenie czerniaka złośliwego, raka nerki, raka trzustki, raka tarczycy, raka piersi, raka płuc i raka jelita grubego. Trwają badania III fazy nad skutecznością leczenia w raku trzustki i przerzutowym raku nerkowokomórkowego (RCC) [34].

miRNA czyli niekodujące fragmenty RNA znalazły swoje zastosowanie w leczeniu nowotworów. Poprzez dołączanie się do regionów 3'UTR genów docelowych wykazały działanie antyangiogenne. Obecnie są one stosowane w leczeniu raka prostaty [2].

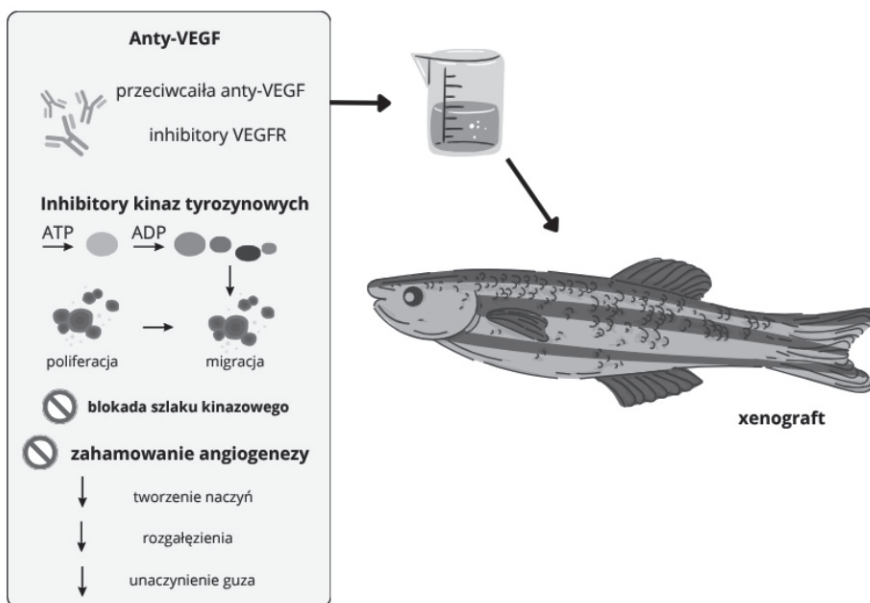
### Podawanie leków w modelu *Danio rerio*

Jedną z istotnych zalet larwalnego modelu *Danio rerio* jest stosunkowo szeroka dostępność metod

podawania badanych związków. Najczęściej stosowaną techniką jest ekspozycja w „kąpeli wodnej”, polegająca na rozpuszczeniu związku w określonym stężeniu w medium hodowlanym (E3). Ze względu na niewielkie rozmiary larw oraz częściową przepuszczalność ich powłok ciała i nabłonka skrzelowego, bierna absorpcja wielu drobnocząsteczkowych związków jest bardzo wysoka [35,36].

Alternatywne metody podawania obejmują mikroiniekcję do układu krążenia lub w pobliżu masy guza, a także bezpośrednie nasycenie komórek ksenograftowych badanym związkiem przed ich implantacją. Co zwiększa precyzję dostarczania substancji i są szczególnie przydatne w przypadku związków o słabej rozpuszczalności w wodzie lub ograniczonej penetracji przez skórę [37].

Niemniej, „kąpiel wodna” wiąże się z szeregiem istotnych ograniczeń praktycznych, które mogą znacząco wpływać na odtwarzalność i interpretowalność wyników eksperymentalnych. Po pierwsze, rzeczywista biodostępność danego związku jest uwarunkowana jego właściwościami fizykochemicznymi, w szczególności lipofilnością (logP) oraz masą cząsteczkową. Analiza 700 związków aktywnych w modelach *Danio*



Rycina przygotowana przez autorkę (Pawlak K.) w programie Canva.

ADP – difosforan adenozyiny (ang. *adenosine diphosphate*); ATP – trifosforan adenozyiny (ang. *adenosine triphosphate*)

Rycina III. Leki antyangiogenne w modelu *Danio rerio*

Figure III. Anti-angiogenic drugs in the *Danio rerio* model

rerio wykazała, że skutecznie wchłaniane substancje mieszczą się zazwyczaj w przedziale masy cząsteczkowej 200-500 Da i wykazują wartość  $\log P \leq 5,3$  [38].

Ponadto, chorion obecny we wczesnych stadiach rozwojowych stanowi dodatkową barierę dyfuzyjną o niejednorodnej przepuszczalności. Wykazano, że jego obecność może istotnie obniżyć czułość wykrywania działania teratogennego w porównaniu z zarodkami pozbawionymi chorionu, co świadczy o jego roli jako bariery dla określonych związków [39,40].

Kolejno, larwalne enzymy metabolizmu ksenobiotyków, w tym izoformy cytochromu P450, takie jak CYP1A, CYP2B6 i CYP3A65, wykazują aktywność już od wczesnych stadiów rozwojowych (od około 24 hpf), co może prowadzić do biotransformacji badanego związku i utrudniać bezpośrednie ekstrapolowanie wyników farmakokinetycznych na układy ssące [41-43]. Wybór właściwej metody podawania powinien być zatem podyktowany nie tylko właściwościami fizykochemicznymi związku i celem eksperymentu, lecz także systematyczną oceną wymienionych barier biologicznych, tak aby obserwowane efekty *in vivo* odzwierciedlały zamierzone działanie farmakologiczne [4,6].

## Podsumowanie

Model larwalny *Danio rerio* stanowi coraz szerzej stosowane narzędzie w przedklinicznych badaniach nad lekami antyangiogennymi, umożliwiając ocenę ich skuteczności, mechanizmu działania oraz profilu bezpieczeństwa w warunkach *in vivo*. W odróżnieniu od klasycznych układów *in vitro*, model *Danio rerio* pozwala na analizę aktywności biologicznej związku w kontekście całego żywego organizmu, z uwzględ-

nieniem interakcji międzykomórkowych, dystrybucji tkankowej i systemowego wpływu na rozwijający się układ naczyniowy [6,7]. Istotna jest również krytyczna ocena zarówno modeli transgenicznych, jak i ksenoprzeszczepowych, która wymaga uwzględnienia szeregu istotnych ograniczeń metodycznych i biologicznych, co wymaga każdorazowej walidacji warunków eksperymentalnych [44]. Dodatkowo, „kąpiel wodna” uniemożliwia dokładne określenie dawki analizowanych leków lub związków [45].

Zarówno modele transgeniczne, jak i ksenografty charakteryzują się ograniczoną możliwością odwzorowania pełnej heterogenności mikrośrodowiska guza [46]. Wreszcie, brak ujednoliconych protokołów eksperymentalnych, obejmujących temperaturę inkubacji, metodę znakowania komórek nowotworowych, czas trwania ekspozycji na lek oraz stosowane parametry ilościowe angiogenezy, utrudnia porównywalność wyników między laboratoriami i ich metaanalizę [47].

Konflikt interesów / Conflict of interest

Brak/None

Adres do korespondencji / Correspondence address

✉ Karolina Pawlak

Studenckie Koło Naukowe Farmacji Klinicznej  
Katedra i Zakład Farmacji Klinicznej i Biofarmacji  
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu

ul. Rokietnicka 3, 60-806 Poznań

☎ (+48 61) 641 83 54

💻 10pawlakkarolina@gmail.com

## Piśmiennictwo/References

1. Nicoli S, Presta M. The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. *Nat Protoc.* 2007;2(11): 2918-23.
2. Chiavacci E, Rizzo M, Pitto L, et al. The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay as a tool for screening anti-angiogenic miRNAs. *Cytotechnology.* 2015;67(6):969-75.
3. Zhao C, Wang X, Zhao Y, et al. A novel xenograft model in zebrafish for high-resolution investigating dynamics of neovascularization in tumors. *PLoS One.* 2011;6(7):e21768.
4. Rebelo de Almeida C, Mendes RV, Pezzarossa A, et al. Zebrafish xenografts as a fast screening platform for bevacizumab cancer therapy. *Commun Biol.* 2020;3(1):299.
5. Zhong J, Xiao C, Chen Q, et al. Zebrafish functional xenograft vasculature platform identifies PF-502 as a durable vasculature normalization drug. *iScience.* 2023;26(9):107734.
6. Gamble JT, Elson DJ, Greenwood JA, et al. The Zebrafish Xenograft Models for Investigating Cancer and Cancer Therapeutics. *Biology (Basel).* 2021;10(4):252.
7. 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.

8. Lam SH, Chua HL, Gong Z, et al. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, histological and histochemical study. *Dev Comp Immunol*. 2004;28(1):9-28.
9. Trede NS, Langenau DM, Traver D, et al. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity*. 2004;20(4):367-79.
10. Loerracher AK, Braunbeck T. Cytochrome P450-dependent biotransformation capacities in embryonic, juvenile and adult stages of zebrafish (*Danio rerio*)—a state-of-the-art review. *Arch Toxicol*. 2021;95(7):2299-334.
11. Cassar S, Adatto I, Freeman JL, et al. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chem Res Toxicol*. 2020;33(1):95-118.
12. Flores EM, Nguyen TT, Odem MA, et al. The zebrafish as a model for gastrointestinal tract–microbe interactions. *Cell Microbiol*. 2020;22(3):e13152.
13. d'Amora M, Giordani S. Chapter 8 – The use of zebrafish in nanotoxicology. W: de la Fuente JM, Grazú V, redaktorzy. *Nanobiotechnology*. Elsevier; 2021. s. 165-184.
14. Teng Y, Xie X, Walker S, et al. Evaluating human cancer cell metastasis in zebrafish. *BMC Cancer*. 2013;13:453.
15. Koenig AL, Baltrunaite K, Bower NI, et al. Vegf signaling promotes zebrafish intestinal vasculature development through endothelial cell migration from the posterior cardinal vein. *Dev Biol*. 2016;411(1):115-27.
16. Shin M, Beane TJ, Quillien A, et al. Vegf signals through ERK to promote angiogenesis, but not artery differentiation. *Development*. 2016;143(20):3796-805.
17. Bower NI, Vogrin AJ, Le Guen L, et al. Vegfd modulates both angiogenesis and lymphangiogenesis during zebrafish embryonic development. *Development*. 2017;144(3):507-18.
18. Leung T, Chen H, Stauffer AM, et al. Zebrafish G protein gamma2 is required for VEGF signaling during angiogenesis. *Blood*. 2006;108(1):160-6.
19. Suchting S, Freitas C, le Noble F, et al. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(9):3225-30.
20. Hubert M, Herzog W. Analysis of Vascular Morphogenesis in Zebrafish. *Methods Mol Biol*. 2023;2608:425-50.
21. Keller PJ, Schmidt AD, Wittbrodt J, Stelzer EH. Reconstruction of zebrafish embryonic development by scanned light-sheet microscopy. *Science*. 2008;322(5904):1065-9.
22. Power RM, Huysken J. A guide to light-sheet fluorescence microscopy for cellular and developmental biology. *Nat Methods*. 2017;14(4):360-73.
23. Chávez MN, Aedo G, Fierro FA, et al. Zebrafish as an Emerging Model Organism to Study Angiogenesis in Development and Regeneration. *Front Physiol*. 2016;7:56.
24. Jung HM, Isogai S, Kamei M, et al. Imaging blood vessels and lymphatic vessels in the zebrafish. *Methods Cell Biol*. 2016;133:69-103.
25. Ando K, Ishii T, Fukuhara S. Zebrafish Vascular Mural Cell Biology: Recent Advances, Development, and Functions. *Life (Basel)*. 2021;11(10):1041.
26. Ben-David Y, Gajendran B, Sample KM, et al. Current insights into the role of Fli-1 in hematopoiesis and malignant transformation. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79(3):163.
27. Phng LK, Hogan BM. Endothelial cell transitions in zebrafish vascular development. *Dev Growth Differ*. 2024;66(6):357-68.
28. Ferrari SM, Centanni M, Virili C, et al. Sunitinib in the Treatment of Thyroid Cancer. *Curr Med Chem*. 2019;26(6):963-72.
29. Wei G, Zhang CX, Jing Y, Chen X, Song HD, Yang L. The influence of sunitinib and sorafenib, two tyrosine kinase inhibitors, on development and thyroid system in zebrafish larvae. *Chemosphere*. 2022 Dec;308(Pt 2):136354.
30. Wrighton PJ, Oderberg IM, Goessling W. There Is Something Fishy About Liver Cancer: Zebrafish Models of Hepatocellular Carcinoma. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2019;8(3):347-63.
31. Hahn O, Stadler W. Sorafenib. *Curr Opin Oncol*. 2006 Nov;18(6):615-21.
32. Yang L, Tu PH, Zhang CX, Xie RR, Dong M, Jing Y, Chen X, Wei G, Song HD. Influence of two anti-tumor drugs, pazopanib, and axitinib, on the development and thyroid-axis of zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1204678.
33. Miyamoto S, Kakutani S, Sato Y et al. Drug review: Pazopanib. *Jpn J Clin Oncol*. 2018;48(6):503-13.
34. Kelly RJ, Rixe O. Axitinib (AG-013736). *Recent Results Cancer Res*. 2010;184:33-44.
35. Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(1):35-44.
36. Barros TP, Alderton WK, Reynolds HM, Roach AG, Berghmans S. Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. *Br J Pharmacol*. 2008;154(7):1400-13.
37. Hason M, Bartůněk P. Zebrafish Models of Cancer—New Insights on Modeling Human Cancer in a Non-Mammalian Vertebrate. *Genes*. 2019;10(11):935.
38. Long K, Kostman SJ, Fernandez C, Burnett JC, Hury DM. Do Zebrafish Obey Lipinski Rules? *ACS Med Chem Lett*. 2019;10(6):1002-6.
39. Panzica-Kelly JM, Zhang CX, Augustine-Rauch KA. Optimization and performance assessment of the chorion-off [dechorionated] zebrafish developmental toxicity assay system. *Toxicol Sci*. 2015;146(1):136-48.
40. Kim KT, Tanguay RL. The role of chorion on toxicity of silver nanoparticles in the embryonic zebrafish assay. *Mol Cell Toxicol*. 2014;10(4):397-404.
41. Goldstone JV, McArthur AG, Kubota A, Zanette J, Parente T, Jonsson ME, Nelson DR, Stegeman JJ. Identification and classification of cytochrome P450 genes in the zebrafish, *Danio rerio*. *BMC Genomics*. 2010;11:254.

42. Chng HT, Ho HK, Yerushalmi N, et al. In vitro CYP-mediated drug metabolism in the zebrafish (embryo) using human reference compounds. *Toxicol In Vitro*. 2017;42:311-22.
43. Ko K, Isoda M, Yamazaki J, Yoshinari K. Cytochrome P450 Expression and Chemical Metabolic Activity before Full Liver Development in Zebrafish. *Pharmaceuticals*. 2020;13(12):456.
44. Fior R, Pezzolo A, Pitisci A, et al. Transgenic and Xenograft Zebrafish Models in Cancer Research and Drug Discovery. *J Pers Med*. 2025;15(7):304.
45. Yin J, Zhao G, Kalirai H, et al. Zebrafish Patient-Derived Xenograft Model as a Preclinical Platform for Uveal Melanoma Drug Discovery. *Pharmaceuticals*. 2023;16(4):598.
46. Fazio S, Vignati R, Cappuccini F, et al. Advancements in Zebrafish Models for Breast Cancer Research: Unveiling Biomarkers, Targeted Therapies, and Personalized Medicine. *Int J Mol Sci*. 2022;23(24):16157.
47. Cornet C, Di Donato V, et al. ZeOncoTest: Refining and Automating the Zebrafish Xenograft Model for Drug Discovery in Cancer. *Pharmaceuticals*. 2020;13(1):1.