

Zalety modelu danio pręgowanego (*Danio rerio*) w rozwiązywaniu współczesnych problemów neurotoksyczności, teratoksyczności i genotoksyczności ksenobiotyków

Magdalena Czuma¹, Agnieszka Koziół¹, Maciej Tadeusz Gawlik²

¹Student; Katedra i Zakład Toksykologii, Oddział Analityki Medycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie, Polska

²Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie, Polska

Farmacja Polska, ISSN 0014-8261 (print); ISSN 2544-8552 (on-line)

Adres do korespondencji

Maciej Tadeusz Gawlik,
Katedra i Zakład Toksykologii,
Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum w Krakowie, ul. Medyczna 9,
30-688 Kraków, Polska;
e-mail: maciej.gawlik@uj.edu.pl

Źródła finansowania

Nie wskazano źródeł finansowania.

Konflikt interesów

Nie istnieje konflikt interesów.

Otrzymano: 2023.09.15

Zaakceptowano: 2023.12.01

Opublikowano on-line: 2023.12.07

DOI

10.32383/farmpol/176196

ORCID

Magdalena Czuma -  0009-0007-6244-3199

Agnieszka Koziół -  0009-0004-0648-9537

Maciej Tadeusz Gawlik -  0000-0002-0808-4603

Copyright

© Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

To jest artykuł o otwartym dostępie,

na licencji CC BY NC 

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Advantages of the zebrafish (*Danio rerio*) model in solving contemporary problems of neurotoxicity, teratotoxicity and genotoxicity of xenobiotics

The zebrafish (*Danio rerio*), a small fish belonging to the *Cyprinidae* family, is one of the most popular animals used in laboratory studies, including toxicology. It has many beneficial features, such as a transparent body structure, easy and economical breeding, a large number of offspring, and a short life cycle. In addition, the genome of the zebrafish shows a high homology to the human genome, which makes this fish an attractive research model. The article points to the contemporary challenges of toxicology in terms of neurotoxicity, teratotoxicity and genotoxicity, which can be analysed based on the results of studies carried out on the zebrafish model. The dynamic implementation of new factors, such as nanoparticles, e-cigarettes, new generations of cosmetics or a wide range of chemical enhancers into human living and working environments, can have serious consequences for the health of the general population and the ecosystem as a whole. The work presents the latest research results regarding, among others, the neurotoxic effects of ethanol, the teratotoxic and neurotoxic effects of e-cigarettes, and the teratotoxic, neurotoxic and genotoxic effects of selected nanoparticles and microplastics assessed in experiments using the zebrafish model. The characteristics of the micronucleus test and the comet test are also presented as the most frequently chosen methods for assessing the genotoxic effect of xenobiotics in studies on the *Danio rerio* model. The results of the studies underline the need for further analysis and monitoring of the effects of these substances, in particular their harmful effects on living organisms, and potential remedial measures to protect the environment. As we have tried to demonstrate in this article, one of the very convenient possibilities in this respect is the use of the striped zebrafish model.

A particularly valuable premise in assessing the genotoxic effects of xenobiotics in this case is the above-mentioned high homology of the *Danio rerio* and human genomes.

Keywords: zebrafish, toxicity, ethyl alcohol, environmental toxins, exposure risk assessment, carcinogenic activity.

© Farm Pol, 2023, 79(8): 463–471

Wstęp

Pomimo coraz szerszego zastosowania w toksykologii modeli komputerowych, analiza działania biologicznego ksenobiotyków na modelach zwierzęcych wciąż pozostaje kluczowym elementem ostatecznego wnioskowania. Próbuąc ograniczyć niepotrzebne cierpienie zwierząt oraz koszty badań, a jednocześnie zapewnić jak najlepsze warunki dla przeprowadzanych eksperymentów, badacze optymalizują również wybór modelowego gatunku, najlepiej odpowiadającego zamierzeniom podjętych dociekań. Nieprzypadkowo jednym z częściej wybieranych gatunków jest danio pręgowany [1], na co w niniejszej pracy próbuje się zwrócić uwagę w kontekście współczesnych problemów diagnozowania oraz przeciwdziałania neurotoksycznym, teratogenicznym i genotoksycznym efektom oddziaływania czynników środowiskowych.

Na podstawie przeglądu aktualnego piśmiennictwa, w pracy przedstawiono możliwości wykorzystania danio pręgowanego, m.in. w ocenie wpływu e-papierosów, nanocząstek oraz niektórych nowych tworzyw sztucznych. Dotychczasowe

badania wykazały, że związki obecne w e-papierosach, takie jak aldehyd cynamonowy, etylowa nilina, wanilina i 1,2-propanodiol, mogą prowadzić do opóźnień w rozwoju i wywoływać efekty genotoksyczne u ryb. Wśród substancji potencjalnie toksycznych coraz większe znaczenie zyskują odgrywać nanocząstki, które ze względu na swoje właściwości są wykorzystywane w wielu dziedzinach przemysłu oraz w badaniach naukowych, co powoduje łatwiejsze uwalnianie tych substancji do środowiska. Kolejnym czynnikiem, którego nie sposób pominąć, są szeroko pojęte tworzywa sztuczne, stanowiące niezwykle zróżnicowaną grupę pod względem właściwości, sposobu degradacji oraz działania na organizmy żywe. W artykule opisano i porównano dwie metody oceny genotoksyczności, które zdaniem autorów są najciekawsze.

Analizę źródłową piśmiennictwa prowadzono z wykorzystaniem elektronicznych baz Pubmed, Mendeley i Google Scholar, z dostępem w od października 2022 r. do sierpnia 2023 r. Użyto słów kluczowych: „zebrafish” lub „*Danio rerio*”, „ethanol” lub „ethyl alcohol”, „e-cigarettes” lub „electronic cigarettes”, „nanoparticles” lub „nanomaterials”, „microplastics”, „neurotoxicity”, „teratotoxicity” oraz „genotoxicity”.

Danio pręgowany jako zwierzę laboratoryjne

Danio pręgowany (*Danio rerio*, ang. *zebrafish*), niewielkich rozmiarów przedstawiciel rodziny karpiowatych (*Cyprinidae*), to jeden z najpopularniejszych modeli zwierzęcych wykorzystywanych w badaniach laboratoryjnych, również w zakresie toksykologii. W naturze jest spotykany w małych rzekach oraz wodzie stojącej na terenie Indii, Bangladeszu, Nepalu, Birmy oraz Pakistanu. Długość ciała dorosłego osobnika osiąga 4,5–5 cm. Wyraźnie zaznaczony dymorfizm płciowy skutecznie ułatwia hodowlę oraz pracę badawczą [1]. Wzdłuż tułowia rybki biegną niebieskie lub fioletowe pasy, od których pochodzi jej angielska nazwa [2] (**Rycina 1**).

Na popularność w wykorzystaniu laboratoryjnym danio pręgowanego wpływ miały m.in. łatwość w utrzymaniu hodowli, łatwość wprowadzania zmian genetycznych oraz przezroczysta budowa ciała we wczesnych stadiach rozwojowych (w specjalnie wyhodowanych liniach cecha ta została utrwalona również u dorosłych osobników), pozwalająca śledzić wizualnie fenotyp oraz ewentualne zmiany i uszkodzenia [1]. Kolejną zaletą jest niewielki rozmiar ryb, co umożliwia przechowywanie wielu osobników na małej przestrzeni. Kluczową cechą okazuje się również



Rycina 1. Danio pręgowany – dorosły osobnik (fot. Magdalena Czuma).
Figure 1. Adult zebrafish (fot. Magdalena Czuma).

fakt, że danio pręgowany ma krótki cykl życiowy (dojrzałość płciowa w trzecim miesiącu życia), a w ciągu jednego tarła składanych jest do 300 jajeczek [2]. Pozwala to przeprowadzać eksperymenty w licznych, wielopokoleniowych koloniach. Co ważne, procesy zachodzące w organizmie rybki oraz ich stopień złożoności są podobne do tych zachodzących w organizmie człowieka [1]. Genom naszego gatunku oraz danio pręgowanego wykazują dość znaczne podobieństwo (według różnych źródeł 70% [1] – 80% [2] genów danio pręgowanego ma odpowiednik u ludzi).

Ryby do badań naukowych są pozyskiwane przede wszystkim z certyfikowanych hodowli [1]. Należy jednak pamiętać, że jakość modelu oraz powodzenie badań zależy w dużej mierze od warunków, w jakich ryby żyją już w laboratorium.

Do celów naukowych zaczęto wykorzystywać danio pręgowanego już w latach 70. XX w., a popularność modelu znacznie wzrosła w latach 90., kiedy opisano stadia rozwojowe rybki oraz wprowadzono pierwsze linie zmodyfikowane genetycznie [3]. W 2001 r. rozpoczęto sekwencjonowanie genomu danio pręgowanego. Warto również wskazać na prawdopodobnie najbardziej spektakularny punkt w historii wykorzystania tego gatunku – danio pręgowany został wysłany w kosmos po raz pierwszy w 1976 r. [4].

Pomimo wielu wymienionych zalet, model ryby posiada również pewne ograniczenia. Wśród nich najistotniejszym wydaje się fakt, że danio pręgowany to organizm wodny, zatem badania nad nim mogą nie być odpowiednie dla zrozumienia procesów specyficznych dla organizmów lądowych. Innym problemem jest dość znaczna podatność rybek na wszelkiego rodzaju schorzenia, również spontaniczne procesy nowotworowe, a zatem m.in. te, których przyczyny pod wpływem narażenia na ksenobiotyki próbuje się badać [1]. Potwierdza to zasadniczą tezę, że przy wyborze modelu do badania konkretnego problemu naukowego musi się uwzględnić specyfikę danego zagadnienia i możliwości, jakie daje dany organizm.

Badania toksyczności etanolu i e-papierosów

Biorąc pod uwagę, że danio pręgowany jako model zwierzęcy jest wykorzystywany już od wielu dekad, nie sposób nie wspomnieć o jego wkładzie w badania nad ksenobiotykami o niepodlegających dyskusji właściwościach toksycznych. Takim związkiem jest alkohol etylowy. Choć wydawać by się mogło, że kolejne badania nad szkodliwością etanolu nie poszerzą już wiedzy toksykologicznej, nic bardziej mylnego – wciąż pozostaje wiele aspektów, których dokładniejsze

poznawanie jest istotne dla przeciwdziałania, diagnostyki oraz ograniczenia skutków działania tej substancji.

Przykładem może być dokładniejsze poznanie mechanizmów neurotoksyczności, które są jedną ze składowych alkoholowego zespołu płodowego występującego u dzieci, których matki spożywały alkohol w czasie ciąży. Badanie tego zjawiska wymaga modelu pozwalającego na dogodną obserwację rozwoju embrionów, w związku z tym wydaje się, że danio pręgowany jest układem biologicznym ze wszech miar adekwatnym. Między innymi, dzięki temu badacze zaobserwowali, w jaki sposób ulegają zmianie rozwijające się neurony (głównie motoryczne) w embrionach rybki inkubowanych przez określony czas w roztworze o odpowiednim stężeniu etanolu. Potwierdzono również powstawanie nieprawidłowości w budowie serca oraz inne towarzyszące zmiany, skutkujące wytworzeniem zmian rozwojowych i znacznym osłabieniem funkcji [2].

Innymi niebezpiecznymi substancjami używanymi w czasie ciąży są: nikotyna zawarta w dymie tytoniowym, a także aerozole znajdujące się w coraz bardziej popularnych e-papierosach.

W ostatnich latach e-papierosy stały się jednym z najbardziej dyskutowanych tematów w dziedzinie zdrowia publicznego. Ich popularność wzrosła, zwłaszcza wśród młodych osób, które szukają coraz to nowszych metod stymulacji, zastępujących tradycyjne palenie tytoniu. E-papierosy zostały pierwotnie wprowadzone na rynek jako potencjalnie mniej szkodliwa alternatywa dla tradycyjnych papierosów. Jednak wraz z ich intensywnym propagowaniem, pojawiły się obawy dotyczące ich bezpieczeństwa i toksyczności.

Wstępny optymizm dotyczący e-papierosów wynikał z przekonania, że zawierają one mniej szkodliwych ksenobiotyków niż tradycyjne papierosy. E-papierosy działają poprzez podgrzewanie cieczy zawierającej nikotynę oraz inne substancje chemiczne. W ten sposób powstaje para, która jest wdychana przez użytkowników papierosów elektronicznych. Niestety, coraz więcej badań sugeruje, że e-papierosy stanowią zagrożenie dla zdrowia.

W miarę wzrastającej popularności e-papierosów, naukowcy coraz bardziej koncentrują się na ocenie działania genotoksycznych i rakotwórczych związków związanych z papierosami elektronicznymi. Mimo powszechnej opinii o braku substancji smolistych we wdychanym areozolu, niektóre badania wykazują obecność w nim związków takich jak: nitrozoaminy specyficzne dla tytoniu (TSNA), wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), karbonyle, lotne związki organiczne (LZO), a także glikol etylenowy, metale

ciężkie oraz nikotyna [5]. Różnorodność dostępnych na rynku rodzajów liquidów skłoniła badaczy do oceny dziewięciu z nich pod względem ich toksycznego działania [6]. W tym celu zarodki danio pręgowanego eksponowano na działanie liquidów o różnych smakach, które w składzie zawierały mieszaninę poszczególnych związków, takich jak: glikol propylenowy, alkohol benzyłowy, aldehyd cynamonowy, octan etylu, maślan etylu, etylowanilina oraz wanilina w zróżnicowanych proporcjach. W badaniu oceniano rozwój morfologiczny ryby oraz jej zachowanie fotomotoryczne. Nieprawidłowości rozwojowe w postaci wygiętej osi ciała, wad szczęki, nieprawidłowe wykształcenie oka, obrzęk woreczka żółciowego i osierdzia oraz wady tułowia zaobserwowano w związku z narażeniem na aldehyd cynamonowy, etylowanilinę i wanilinę.

Aby podkreślić szczególną toksyczność aldehydu cynamonowego, przeprowadzono badania, w których embriony danio pręgowanego narażono na ten związek [7]. W tym celu wykorzystano liquidy o smaku cynamonowym oraz analizowano ich wpływ na rozwój kości, chrząstki i naczyń w zarodkach danio pręgowanego oraz sukces wylęgu. Zauważono, że wraz ze wzrostem stężenia liquidu zmniejsza się sukces wylęgowy danio.

Innym związkiem powszechnie występującym w e-papierosach jest 1,2-propanodiol. Stwierdzono, że danio pręgowany we wczesnym stadium rozwojowym, wystawione na działanie 5% roztworu 1,2-propanodiolu uległo poważnym deformacjom, przy czym ekspozycja na roztwór o stężeniu 1,25% tego związku powodowała nadaktywne pływanie ryb [8]. Autorzy publikacji kontynuowali swoje badania rok później, poszerzając je o analizę długoterminowych skutków neurobehawioralnych [9]. Sugerowano, że 1,2-propanodiol wykazuje działanie podobne do alkoholu etylowego (ang. *alcohol-like*), w związku z tym może wywierać analogiczny wpływ na ośrodkowy

układ nerwowy (OUN). Ciekawym aspektem badań okazało się wprowadzenie dwóch nowatorskich testów, których celem była ocena zachowania dorosłych osobników danio narażonych na ksenobiotyk w okresie zarodkowym. W trakcie pierwszego eksperymentu, który określano jako test nurkowania w zbiorniku, prowadzono obserwacje dotyczące przeciętnej odległości ryb od dna w czasie sześciu minut ich pływania oraz całkowitego dystansu, jaki pokonały. Zauważono, że ryby narażone w przeszłości na wyższe stężenie 1,2-propanodiolu pływały bliżej dna akwenu w porównaniu z grupą kontrolną, co sugeruje gorszą adaptację do nowego środowiska oraz występowanie objawów lękowych. W teście unikania drapieżników, bodźcem imitującym zagrożenie była prezentacja w programie Power Point obrazująca niebieską, wolno rosnącą kropkę albo czerwona, szybko rosnącą kropkę, które pojawiły się wielokrotnie na jednym z ekranów. Sekwencja składała się z naprzemiennych minutowych stymulacji bodźcem oraz jego brakiem. Uzyskane pomiary obejmowały przebytą odległość od boku zbiornika, na którym wyświetlana była prezentacja. Ze względu na to, że odległość od imitującego zagrożenie ekranu była mniejsza u ryb badanych niż u ryb kontrolnych, stwierdzono znacznie zmniejszone postrzeganie niebezpieczeństwa oraz zaburzenie instynktowego mechanizmu ucieczki. Zatem dorosłe osobniki, które były narażone na ksenobiotyk w okresie zarodkowym reagowały w nieadekwatny sposób na zagrożenia, wykazywały większe stany lękowe, co zaobserwowano w nowym teście nurkowania w zbiorniku i teście unikania drapieżników. Obserwowane efekty narażenia na etanol oraz substancje zawarte w e-papierosach przedstawiono w tabeli 1.

Badania toksyczności nanocząstek

Wśród substancji potencjalnie toksycznych coraz większe znaczenie zaczynają odgrywać

Tabela 1. Wybrane efekty toksyczne działania etanolu i e-papierosów obserwowane w badaniach na modelu danio pręgowanego (szczegółowy opis w tekście).

Table 1. Selected toxic effects of ethanol and e-cigarettes observed in studies on the zebrafish model (detailed description in the text).

	Obserwowany efekt toksyczny	Źródło
Alkohol etylowy	Nieprawidłowości rozwojowe: zmiana rozwoju neuronów (głównie motorycznych) w embrionach, nieprawidłowości w budowie serca.	[2]
E-papierosy (aldehyd cynamonowy, etylowanilina, wanilina)	Nieprawidłowości rozwojowe: wygięta oś ciała, wady szczęki, wady oka, obrzęk woreczka żółciowego i osierdzia, wady tułowia; zmniejszony sukces lęgowy.	[6, 7]
E-papierosy (1,2-propanodiol)	Nieprawidłowości rozwojowe: deformacje ciała; dorosłe osobniki: nadaktywność; wpływ na ośrodkowy układ nerwowy; zmiany behawioralne: osłabiona adaptacja w środowisku, nieadekwatne reakcje na zagrożenia.	[8, 9]

nanocząstki i nanomateriały. Są to z definicji struktury materii wykazujące choćby jeden wymiar liniowy o wartości nieprzekraczającej 100 nm, charakteryzujące się wysokim stosunkiem powierzchni do objętości. Klasyfikacja nanomaterialów wprost opiera się na liczbie wymiarów liniowych tych struktur powyżej rozmiaru nano-, co przekłada się na występowanie m.in. nanocząstek (nanomateriały zerowymiarowe, np. nanocząstki srebra), nanorurek, nanodrutów i nanoprętów (nanomateriały jednowymiarowe, np. nanorurki węglowe) czy nanowarstw (nanomateriały dwuwymiarowe, np. grafen). Ze względu na swoje właściwości, nanocząstki i nanomateriały mogą być wykorzystywane w wielu dziedzinach, między innymi w farmacji (np. jako nośniki leków), w przemyśle tekstylnym czy jako elementy filtrów oczyszczających wodę [10]. Tak szerokie zastosowanie może wiązać się z łatwiejszym uwalnianiem tych substancji do środowiska [11], przy czym skutki ich oddziaływania nie są jeszcze do końca poznane.

Hodowla danio przegowanego w odpowiednio przygotowanej wodzie w stosunkowo łatwy sposób pozwala sprawdzić wpływ tych związków na narażone ryby słodkowodne (a także szerzej – kręgowce) [11]. Oprócz oceny dawki toksycznej, w badaniach ekspozycji danio na nanocząstki złota (AuNPs) zauważono zmniejszoną skuteczność pobierania pokarmu oraz spadek rozrodczości. Wykazano zależny od stężenia AuNPs wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej oraz katalazy, a także zwiększoną peroksydację lipidów po 48-godzinnej ekspozycji. Ocena stresu oksydacyjnego jest istotna, ponieważ niedostateczne mechanizmy eliminacji wolnych rodników mogą uszkadzać błony komórkowe, co prowadzi do niestabilności komórek nerwowych i potencjalnie ich obumierania poprzez apoptozę lub nekrozę. Po regeneracji danio w wodzie bez dodatku nanocząstek złota, spadała aktywność wszystkich enzymów z wyjątkiem katalazy, powróciło również prawidłowe spożycie pokarmu [11].

W innych badaniach obserwowano wpływ wielkości nanocząstek na rozwój embrionu rybki, ale także sposób ich przedostawiania się do jego komórek. W tym celu inkubowano embriony z nanocząstkami srebra o różnej wielkości, a następnie obrazowano zmiany za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) [12].

Nanocząstki stanowią wyzwanie dla współczesnej toksykologii ze względu na stosunkowo niewiele przeprowadzonych badań oceniających ich odległe skutki działania. Temat ten został podjęty przez naukowców, aby określić zmiany

histopatologiczne oraz ingerencje w strukturę DNA po ostrej (96 godzin) i przewlekłej (30 dni) ekspozycji danio na nanocząstki tytanu (TiO₂-NPs) [13]. Zarówno po ostrej, jak i przewlekłej ekspozycji zauważono zwiększenie grubości kosmków jelitowych oraz wakuolizację hepatocytów. Genotoksyczne skutki narażenia w postaci zwiększenia liczby mikrojąder w teście mikrojądrowym, którego zasadę działania opisano w części „Preferencje modelu danio przegowanego w ocenie ryzyka narażenia na ksenobiotyki o działaniu genotoksycznym w środowisku”, zaobserwowano jedynie po długotrwałym narażeniu. Powyższe wyniki sugerują, że nawet krótkotrwałe narażenie na nanocząstki tytanu może powodować zmiany histopatologiczne narządów, zwłaszcza w obrębie jelita, które jest barierą dla nanocząstek, oraz wątroby, czyli w miejscu akumulacji talu. Natomiast genotoksyczność, w której prawdopodobnie pośredniczą reaktywne formy tlenu (RFT), ujawnia się po dłuższej ekspozycji.

TiO₂-NPs zostały również przetestowane pod kątem ich neurotoksycznego i teratotoksycznego działania [14]. W tym celu zarodki danio ekspozycjonowano na wzrastające stężenia nanocząstek. W wyniku przeprowadzonej analizy toksykogenomicznej przy użyciu metody PCR w czasie rzeczywistym, zaobserwowano zmniejszoną ekspresję genów związanych z neurogenezą (*NRD* i *ELAVL3*), natomiast ekspresja genów związanych z rozwojem aksonów (*GAP43* i *MBP*) zwiększyła się. Sugerowano, że może być to rezultatem mechanizmu kompensacyjnego, który ma miejsce w odpowiedzi na ograniczony wzrost aksonów po ekspozycji na TiO₂-NPs. Inne badania wykazały zdolność TiO₂-NPs do przenikania przez barierę krew-mózg, co wiązało się z ujawnieniem objawów choroby Parkinsona, w wyniku hamowania rozwoju neuronów dopaminergicznych [15]. W związku z tym, badania potwierdziły, że narażenie danio na TiO₂-NPs we wczesnym etapie życia prowadzi do niekorzystnych skutków neurologicznych oraz do zaburzenia rozwoju aksonów neuronów ruchowych. W tabeli 2 wymieniono skutki ekspozycji na opisane powyżej nanocząstki.

Badania toksyczności tworzyw sztucznych

Inne niewielkie cząstki o prawdopodobnie szkodliwym działaniu to szeroko pojęty mikroplastik. Do tej grupy substancji zaliczane są fragmenty, włókna czy granulki o wielkości pomiędzy 0,1µm a 5 mm, które mogą być uwalniane z ogromnej liczby produktów praktycznie na

Tabela 2. Wybrane efekty toksyczne działania nanocząstek obserwowane w badaniach na modelu danio pręgowanego (szczegółowy opis w tekście).

Table 2. Selected toxic effects of nanoparticles observed in studies on the zebrafish model (detailed description in the text).

Czynnik	Obserwowany efekt toksyczny	Źródło
Nanocząstki złota (AuNPs)	Zmniejszona skuteczność pobierania pokarmu; spadek rozrodczości; wzrost dysmutazy nadtlenkowej, katalazy oraz peroksydacji lipidów.	[11]
Nanocząstki tytanu (TiO ₂ -NPs)	Zmiany histopatologiczne narządów (szczególnie jelita oraz wątroby); efekt genotoksyczny przy dłuższej ekspozycji; działanie teratogenne; zmiany neurotoksyczne: zmiany rozwojowe w obrębie neuronów.	[13-15]

każdym etapie użytkowania. Cząstki te stanowią niezwykle zróżnicowaną grupę pod względem właściwości, sposobu degradacji oraz działania na organizmy żywe [16].

Jednym z zagrożeń wynikających z obecności mikroplastiku w środowisku jest uwalnianie bisfenoli. Warto zaznaczyć, że niekorzystne oddziaływanie tych substancji można zaobserwować nie tylko w zakresie funkcjonowania układu hormonalnego, ale także w przypadku OUN. Czynnikiem warunkującym toksyczność bisfenoli jest ich charakter lipofilowy oraz zdolność przenikać przez barierę krew-mózg. Bisfenol wykazuje również zdolność do indukcji stresu oksydacyjnego, co może prowadzić do agregacji hiperfosforylowanego białka tau, które jest głównym biomarkerem choroby Alzheimera, jak również innych skutków działania wolnych rodników. W jednym z badań przeprowadzonych na danio pręgowanym sprawdzano wpływ bisfenolu na skototaksję oraz zdolność do reakcji na warunki środowiska [17]. W tym celu wykonano test preferencji światła lub ciemności (ang. *Light-dark preference test*, LDPT). Jako że danio w naturalnym środowisku przejawiają wyraźne skłonności do przebywania w zacienionych miejscach, przejście do oświetlonej strefy świadczy o występowaniu stanów lękowych, co zaobserwowano przy ekspozycji na bisfenol. Efekt ten został odwrócony dzięki zaaplikowaniu sylibiny i naringeniny o działaniu neuroprotektynym.

Model danio wykorzystywano również do oceny neurotoksycznego działania mikroplastiku polistyrenowego [18]. W tym celu analizowano wpływ zanieczyszczeń na żywotność

neuroblastów, biorąc pod uwagę, że obwodowe neurony czuciowe mają bezpośredni kontakt z skażoną wodą, oraz badano aktywność acetylocholinesterazy, która jest markerem funkcji cholinergicznej. W przypadku neuroblastów odnotowano wzrost liczby tych komórek w obrębie głowy danio, natomiast w dystalnej części tułowia żywotność komórek zmniejszyła się. Przedstawione wyniki sugerują pewne odrębności co do działania mikroplastiku na poszczególne części ciała. Wykazano również, że aktywność acetylocholinesterazy zwiększa się po ekspozycji na mikroplastik, jednak warto zaznaczyć pewne rozbieżności literaturowe w tej kwestii. W innych badaniach odnotowano spadek aktywności enzymu [19], jak również brak znaczącego wpływu na enzym [20]. Różnice w przeprowadzonych eksperymentach mogą wynikać z zastosowania odmiennych gatunków organizmów wodnych i wieku badanych osobników, typów mikroplastików, a także zmiennych takich jak czas i sposób ekspozycji.

Ze względu na trudności związane z eliminacją tworzyw sztucznych dąży się do wykorzystywania zamienników ulegających biodegradacji, takich jak kwas poliglikolowy (PGA) oraz kwas polimlekowy (PLA). Są one uznawane za obiecującą alternatywę dla tradycyjnych tworzyw sztucznych, choć nie jest to równoznaczne z ich neutralnym wpływem na zdrowie. Z tego względu przeprowadzono badania dotyczące wpływu PGA i PLA na zachowanie oraz rozwój danio pręgowanego [21]. Wykazano, że ekspozycja na PGA oraz PLA zaburza ruchliwość ryb i może wywoływać stany lękowe. Ponadto, dochodzi do zakłócenia cyklu dobowego danio poprzez zmniejszenie

Tabela 3. Wybrane efekty toksyczne działania tworzyw sztucznych obserwowane w badaniach na modelu danio pręgowanego (szczegółowy opis w tekście).

Table 3. Selected toxic effects of plastics observed in studies on the zebrafish model (detailed description in the text).

Czynnik	Obserwowany efekt toksyczny	Źródło
Bisfenole	Zmiany behawioralne: zaburzenia lękowe; upośledzenie skototaksji	[17]
Mikroplastik polistyrenowy	Zmiany w obrębie żywotności neuroblastów; możliwe zaburzenia wytwarzania acetylocholinoesterazy	[18, 19]

ekspresji neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (ang. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF). Jest to białko wydzielane przez neurony należące do rodziny czynników wzrostu nerwów. Badania potwierdziły, że nieprawidłowe zachowanie motoryczne oraz problemy ze snem i czuwaniem u danio pręgowanego mogą być związane z niedoborem białka BDNF. Wykazano również zmniejszoną aktywność acetylocholinoesterazy, co wzmacniało działanie neurotoksyczne u ryb narażonych na działanie kwasu polimlekowego [22].

Tego typu badania mogą być dobrym wskaźnikiem uszkodzenia układu nerwowego, a także mogą znaleźć miejsce w monitorowaniu zanieczyszczenia mikroplastikami ekosystemów wodnych. W tabeli 3 zestawiono zaburzenia związane z narażeniem na tworzywa sztuczne.

Preferencje modelu danio pręgowanego w ocenie ryzyka narażenia na ksenobiotyki o działaniu genotoksycznym w środowisku

Perspektywy rozwoju przemysłu zaawansowanych technologii, urbanizacji miast oraz ekspansji działalności antropogenicznej prowadzą do coraz większego zanieczyszczenia środowiska. Wiąże się to z koniecznością kontroli skażenia, nie tylko na poziomie ilościowego oznaczenia stężenia substancji toksycznych, lecz także ich wpływu na organizm w kontekście szkodliwego oddziaływania, ze szczególnym uwzględnieniem materiału genetycznego. Substancje takie jak WWA, pestycydy, pyły zawieszane w powietrzu czy też obecne w ściekach bioaktywne związki, między innymi leki, mogą być przyczyną uszkodzenia DNA. Ze względu na środowisko, w jakim bytuje danio pręgowane oraz jego ekspozycję na zanieczyszczenia, model ryby zyskuje preferencje w środowiskowej analizie oceny narażenia na substancje o działaniu genotoksycznym.

Badania genotoksyczności coraz częściej przeprowadzane są zgodnie z założeniami metod alternatywnych, czyli takich, które spełniają wszystkie lub którąkolwiek z zasad 3R zaproponowanych przez Russella i Burcha w 1959 [23]:

- Replacement – wykorzystanie modeli badawczych nieodczuwających cierpień zamiast zwierząt w eksperymencie;
- Reduction – ograniczenie liczby zwierząt potrzebnych do przeprowadzenia badań;
- Refinement – ulepszanie metod tak, aby minimalizować cierpienie zwierząt podczas eksperymentów.

Do badań alternatywnych realizowanych z uwzględnieniem powyższych zasad, według

wytycznych Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD) [24, 25], zaliczane są między innymi:

- test mikrojądrowy *in vitro* – pod wpływem ekspozycji na czynnik genotoksyczny wrzeczona kariotypyczna w trakcie podziału komórki ulegają uszkodzeniu, co prowadzi do wyodrębnienia jednego lub kilku mniejszych jąder zawierających głównie acentryczne fragmenty chromosomów, a czasem nawet całe chromosomy; powstałe mikrojądra można wybarwić odczynnikiem Giemzy, ponieważ zbudowane są z tego samego materiału co jądro, czyli z chromatyny jądrowej, lub barwnikami fluorescencyjnymi, oraz oceniać pod mikroskopem [24];
- test kometowy *in vitro* – komórki zostają umieszczone w żelu agarozowym w obecności badanego czynnika genotoksycznego; w wyniku lizy, zdegradowany pod wpływem ksenobiotyku materiał genetyczny uwalniany jest z komórki, a następnie poddany elektroforezie; migrujące DNA tworzy „ogon”, który zostaje zwizualizowany dzięki barwieniu barwnikami fluorescencyjnymi; miarą poziomu uszkodzeń DNA jest długość ogona i ilość zawartego w nim DNA [25].

Według najnowszych danych, test kometowy jest główną techniką wśród wymienionych metod alternatywnych, wykorzystywaną w badaniach genotoksyczności na modelu danio pręgowanego w kontekście zanieczyszczenia środowiska [26]. W celu identyfikacji zmian genetycznych powstałych u danio pod wpływem różnych leków, w tym karbamazepiny, znanego środka przeciwpadaczkowego, i diklofenaku, niesteroidowego środka przeciwzapalnego, wykrytych w wodach rzeki Volturno w Kampanii, zastosowano alkaliczną wersję testu kometowego, aby ocenić obecność pęknięć DNA pojedynczej nici [27]. W tym celu pobrano krew danio pręgowanego spod skrzelii (pierwszego organu narażonego na zanieczyszczenia podczas oddychania) za pomocą heparynizowanej strzykawki. Badania wykazały, że jądrzaste erythrocyty wyizolowane z krwi, eksponowane na karbamazepinę i diklofenak, po elektroforezie w agarozie przypominały komety z ogonem pofragmentowanego i zdekondensowanego DNA. Świadczy to o istotnie wyższym odsetku uszkodzonego materiału genetycznego oraz utracie jego integralności w porównaniu z komórkami kontrolnymi, które miały zaokrąglone i skondensowane jądro.

Model danio oraz test kometowy znalazły również zastosowanie w określeniu stopnia uszkodzenia DNA w wyniku ekspozycji na WWA zidentyfikowane w wodzie wokół laguny Lagos w Nigerii [28]. W tym celu wykorzystano zarodki

Danio rerio zgodnie z ostatnimi międzynarodowymi wytycznymi (OECD) [29], które dopuszczają zastosowanie wczesnych stadiów życia ryb do dokumentowania skutków zanieczyszczeń. WWA jako prokancerogeny, a podobnie jak inne ksenobiotyki, są w organizmach żywych metabolizowane, a w pierwszej fazie ich przemiany zachodzi proces hydroksylacji, którego katalizatorami są enzymy z nadrodziny cytochromów P-450. Konsekwencją aktywacji metabolicznej jest powstawanie reaktywnego metabolitu o charakterze elektrofilowym, takim jak *trans*-dihydrodiol epoksyd, który łącząc się kowalencyjnie z DNA i białkami tworzy addukty, co przyczynia się do niestabilności genetycznej, błędów w replikacji, transkrypcji oraz biosyntezie białek. Parametrem, który pozwala ocenić uszkodzenia DNA w teście kometowym jest moment ogonowy (ang. *tail moment*, TM), czyli iloczyn procentowej zawartości DNA w „ogonie” komety i jego długości. Poza działaniem genotoksycznym wykazano również embriotoksyczne oraz teratogenne działanie WWA na zarodki danio.

Oprócz zanieczyszczeń pochodzących z przemysłu, duży problem stanowią insektycydy fosforoorganiczne stosowane w rolnictwie. Obecność pestycydów stwierdzono w różnych środowiskach wodnych, w tym w opadach atmosferycznych, wodach powierzchniowych i podziemnych, co oznacza, że związki te znajdują się we wszystkich rodzajach wód krążących w ekosystemie. Należą one do związków chemicznych charakteryzujących się znaczną toksycznością, ze względu na hamowanie aktywności enzymów z grupy cholinesteraz, czego konsekwencją może być pobudzenie cholinergiczne oraz blok depolaryzacyjny. Oprócz powyższego działania wykazano, że mają również zdolność wywoływania uszkodzeń na poziomie DNA. Pestycydy oddziałują na materiał genetyczny w sposób bezpośredni, powodując pęknięcia nici DNA lub pośredni, w wyniku wytwarzania RFT. Aby potwierdzić genotoksyczne działanie monokrotofosu (MCP), przeprowadzono badania z wykorzystaniem testu mikrojądrowego, który umożliwia ocenę klastogenności tego związku, czyli jego zdolności do wywoływania strukturalnych aberracji chromosomalnych. Dodatkowo, wykorzystano test kometowy dostarczający informacji na temat wpływu monokrotofosu na integralność DNA. Badania zostały przeprowadzone w oparciu o model *Danio rerio* [30]. Wykazano, że wraz ze wzrostem dawki MCP oraz długością ekspozycji komórek krwi obwodowej ryby na toksynę, zwiększa się ilość mikrojąder w teście mikrojądrowym oraz długość „ogona” zawierającego zdegradowany materiał genetyczny w teście kometowym.

Podsumowanie

Przedstawione informacje wskazują, że *Danio rerio* jest użytecznym i coraz częściej wybieranym, alternatywnym modelem zwierzęcym w badaniach toksykologicznych, np. w stosunku do standardowych modeli wykorzystujących gryzonia. Jedną z istotnych zalet tego modelu jest fakt, że zarodki danio pręgowanego rozwijają się poza organizmem ryby, co pozwala naukowcom badać szczegóły rozwoju począwszy od zapłodnienia poprzez cały okres życia. Bardzo dokładnie opisana charakterystyka morfologiczna oraz fizjologiczna ryby ułatwia projektowanie kolejnych badań oraz analizę i gromadzenie informacji. Kolejną przyczyną zastosowania ryb jest stosunkowo łatwa dostępność oraz tania hodowla. Warto również podkreślić, iż wykazujący znaczną homologię z genomem ludzkim, genom *Danio rerio* jest dobrze poznany, co umożliwia prowadzenie rozmaitych testów badających wpływ ksenobiotyków na DNA i skalowanie efektów na organizm ludzki. Ma to duże znaczenie w prognozowaniu działania rakotwórczego ksenobiotyków, również tych wprowadzanych dopiero do ogólnego użytku. W stosowanym dotychczas standardzie, ocena działania rakotwórczego stanowi najdłuższy i najbardziej żmudny element oceny ryzyka toksykologicznego, co np. w przypadku nowych leków znaczenie przeciąga procedurę dopuszczenia do obrotu w czasie. Badania nad wystandaryzowaniem modelu danio pręgowanego w tym zakresie wpisują się we współczesną tendencję uzyskiwania jak najszybszego dostępu do zdobyczy nauk medycznych i farmaceutycznych.

Piśmiennictwo

1. Korzeniowski PJ, Wiweger M. Danio pręgowany jako zwierzę laboratoryjne. Podstawowe zagadnienia z zakresu pielęgnacji i opieki lekarsko-weterynaryjnej nad rybami w warunkach hodowli laboratoryjnej. *Życie Weterynaryjne* 2014; 89(09): 750-756. Dostępny w internecie: https://www.vetpol.org.pl/zycie-wet/czasopismo/cat_view/90-zycie-weterynaryjne-wybraneartykuly/497-rocznik-89-rok-2014/524-nr-9-2014-wrzesien. Dostęp: 19.09.2023.
2. Elias M, Migocka-Patrzałek M. Danio pręgowany jako przykład organizmu modelowego wykorzystywanego w badaniach naukowych. *Poszerzamy Horyzonty*. Tom XIII. Mateusz Weiland Network Solutions; 2019.
3. Kamaszewski M, Ostaszewska T, Adamek D, et al. Ryby akwariowe w badaniach naukowych. *Przegląd Hodowlany*. 2016; 6(6): 15-17. Dostępny w internecie: <http://ph.ptz.icm.edu.pl/index.php/2016/11/29/ph-62016-listopad-grudzien/>. Dostęp: 19.09.2023.
4. Korzeniowski PJ, Wiweger M. Mała rybka - wielkie wyzwania. *Wszechświat* 2016; 117(10-12). Dostępny w internecie: <https://wszechswiat.ptpk.org/index.php/wszechswiat/article/view/199>. Dostęp: 19.09.2023.
5. Amendáriz-Castillo I, Guerrero S, Vera-Guapi A, et al. Genotoxic and Carcinogenic Potential of Compounds Associated with Electronic Cigarettes: A Systematic Review. *Biomed Res Int*. 2019. doi:10.1155/2019/1386710.

6. Holden LL, Truong L, Simonich MT, Tanguay RL. Assessing the hazard of E-Cigarette flavor mixtures using zebrafish. *Food Chem Toxicol.* 2020; 136. doi:10.1016/j.fct.2019.110945.
7. Bhattacharya B, Narain V, Bondesson M. E-cigarette vaping liquids and the flavoring chemical cinnamaldehyde perturb bone, cartilage and vascular development in zebrafish embryos. *Aquat Toxicol.* 2021; 240. doi:10.1016/j.aquatox.2021.105995.
8. Massarsky A, Abdel A, Glazer L, et al. Exposure to 1,2-Propanediol Impacts Early Development of Zebrafish (*Danio rerio*) and Induces Hyperactivity. *Zebrafish* 2017; 14(3):216–222. doi:10.1089/zeb.2016.1400.
9. Massarsky A, Abdel A, Glazer L, et al. Neurobehavioral effects of 1,2-propanediol in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology* 2018; 65:111–124. doi:10.1016/j.neuro.2018.02.007.
10. Langauer-Lewowicka H, Pawlas K. Silver nanoparticles – applications and the impact on health and the environment. *Med Srod.* 2015; 18(3): 3–11. Dostępny w internecie: <https://www.enviromed.pl/Nanocastki-srebra-zastosowanie-i-zagrozenie-dla-zdrowia-i-srodowiska,113087,0,2.html>. Dostęp: 19.09.2023.
11. Souza JP, Mansano AS, Venturini FP, et al. Toxicity of gold nanorods on *Ceriodaphnia dubia* and *Danio rerio* after sub-lethal exposure and recovery. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2021; 28(20): 25316–25326. doi:10.1007/s11356-021-12423-w.
12. Lee KJ, Nallathamby PD, Browning LM, et al. In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *ACS Nano.* 2007; 1(2): 133–143. doi:10.1021/nn700048y.
13. Machado Kayser J, Carolina Schuster A, Zimmermann Prado Rodrigues G, et al. Titanium dioxide nanoparticles promote histopathological and genotoxic effects in *Danio rerio* after acute and chronic exposures. *Cienc Nat.* 2022; 44: e19. doi:10.5902/2179460x67963.
14. Gu J, Guo M, Huang C, et al. Titanium dioxide nanoparticle affects motor behavior, neurodevelopment and axonal growth in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Sci Total Environ.* 2021; 754. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142315.
15. Hu Q, Guo F, Zhao F, Fu Z. Effects of titanium dioxide nanoparticles exposure on parkinsonism in zebrafish larvae and PC12. *Chemosphere* 2017; 173: 373–379. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.01.063.
16. Samsonowska K, Kaszuba A. Mikroplastik w środowisku naturalnym. *Polimery* 2022; 67(1): 28–33. doi:10.14314/polimery.2022.1.4.
17. Thayumanavan G, Jeyabalan S, Fuloria S, et al. Silibinin and Narinigenin against Bisphenol A-Induced Neurotoxicity in Zebrafish Model-Potential Flavonoid Molecules for New Drug Design, Development, and Therapy for Neurological Disorders. *Molecules* 2022; 27(8). doi:10.3390/molecules27082572.
18. Guimarães ATB, Charlie-Silva I, Malafaia G. Toxic effects of naturally-aged microplastics on zebrafish juveniles: A more realistic approach to plastic pollution in freshwater ecosystems. *J Hazard Mater.* 2021; 407. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124833.
19. Eom HJ, Nam SE, Rhee JS. Polystyrene microplastics induce mortality through acute cell stress and inhibition of cholinergic activity in a brine shrimp. *Mol Amp Cell Toxicol.* 2020; 16(3): 233–243. doi:10.1007/s13273-020-00088-4.
20. Schmieg H, Huppertsberg S, Knepper TP, et al. Polystyrene microplastics do not affect juvenile brown trout (*Salmo trutta f. fario*) or modulate effects of the pesticide methiocarb. *Environ Sci Eur.* 2020; 32(1). doi:10.1186/s12302-020-00327-4.
21. Luan J, Zhang S, Xu Y, et al. Effects of microplastic exposure on the early developmental period and circadian rhythm of zebrafish (*Danio rerio*): A comparative study of polylactic acid and polyglycolic acid. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2023; 258. doi:10.1016/j.ecoenv.2023.114994.
22. de Oliveira JPI, Estrela FN, Rodrigues ASL, Guimarães ATB, Rocha TL, Malafaia G. Behavioral and biochemical consequences of *Danio rerio* larvae exposure to polylactic acid bioplastic. *J Hazard Mater.* 2021; 404(Pt A). doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124152.
23. Zemanova MA. Towards more compassionate wildlife research through the 3Rs principles: moving from invasive to non-invasive methods. *Wildl Biol.* 2020; 1. doi:10.2981/wlb.00607.
24. Organisation for Economic Co-operation and Development. Test No. 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test. (online) 2023. doi:10.1787/9789264264861-en.
25. Organisation for Economic Co-operation and Development. Test No. 489: *In Vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay. (online) 2016. doi:10.1787/9789264264885-en
26. Canedo A, Rocha TL. Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: Historical review, current status and trends. *Sci Total Environ.* 2021; 762. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144084.
27. Rocco L, Izzo A, Zito G, Peluso C. Genotoxicity in Zebrafish (*Danio rerio*) Exposed to two Pharmacological Products from an Impacted Italian River. *J Environ Amp Anal Toxicol.* 2011; 01(02). doi:10.4172/2161-0525.1000103.
28. Sogbanmu TO, Nagy E, Phillips DH, et al. Lagos lagoon sediment organic extracts and polycyclic aromatic hydrocarbons induce embryotoxic, teratogenic and genotoxic effects in *Danio rerio* (zebrafish) embryos. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016; 23(14): 14489–14501. doi:10.1007/s11356-016-6490-y.
29. Organisation for Economic Co-operation and Development. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. (online) 2013. doi:10.1787/9789264203709-en.
30. D'Costa AH, Shyama SK, Praveen Kumar MK, Fernandes TM. Induction of DNA damage in the peripheral blood of zebrafish (*Danio rerio*) by an agricultural organophosphate pesticide, monocrotophos. *Int Aquat Res.* 2018; 10(3): 243–251. doi:10.1007/s40071-018-0201-x.