



**PISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA PRZYRODNIKÓW IM. KOPERNIKA**  
WYDAWANE PRZY WSPÓŁDZIALE: AKADEMII GÓRNICZO-HUTNICZEJ  
MINISTERSTWA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO I POLSKIEJ AKADEMII UMIEJĘTNOŚCI

TOM 117  
ROK 134

PAŹDZIERNIK – LISTOPAD – GRUDZIEŃ 2016

ZESZYT 10–12  
2634–2636

Cykl pięciu artykułów na temat wykorzystania *Danio* pręgowanego jako organizmu modelowego w badaniach pracowników Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie realizujących w latach 2012–2016 projekt 7PR RegPot pt. „Fishing for Medicines and their targets using Zebrafish models of human diseases”.



## MAŁA RYBKA – WIELKIE WYZWANIA

*Piotr Jan Korzeniowski i Małgorzata Wiweger (Warszawa)*

### Streszczenie

Dynamiczny rozwój badań biomedycznych narzucił konieczność poszukiwania nowych modeli zwierzęcych, pozwalających na dokładniejsze poznanie złożonych procesów fizjologicznych i patologicznych. Jednym z takich modeli jest danio pręgowane (*Danio rerio*, ang. *zebrafish*). Ta niepozorna ryba wyznaczyła nowe trendy w badaniach z zakresu genetyki i rozwoju, farmakodynamiki, toksykologii, kontroli środowiska, behawioru itp., stwarzając szansę na znalezienie nowych dróg w leczeniu różnych chorób. Pomimo pozornej prostoty hodowli i przeprowadzenie badań z wykorzystaniem tego organizmu niesie za sobą szereg wyzwań, z którymi warto się zmierzyć.

### Abstract

The dynamic development of biomedical research imposed the need for new animal models that would allow a more precise understanding of complex physiological and pathological processes. One such model is the zebrafish (*Danio rerio*). This modest fish set new trends in research: genetics and development, pharmacodynamics, toxicology, environmental control, behaviour, etc. creating an opportunity to find cure for various diseases. Despite the apparent simplicity, breeding and performing experiments on this organism carries a number of challenges which are worth addressed.

Gromada ryb (*Pisces*) stanowi najbardziej zróżnicowaną grupę współcześnie żyjących kręgowców. Skupia ponad 30 tysięcy gatunków, cechujących się

ogromną zmiennością budowy i fizjologii, podyktowaną dostosowaniem się do odmiennych warunków środowiskowych. Ryby zasiedlają wody słone, słodkie

oraz o charakterze mieszanym. Można je znaleźć od przybrzeżnych płycin po najgłębsze miejsca oceanów. Są również gatunki, które okresowo wychodzą na ląd, np. poskokczek mułowy (*Periophthalmus barbarus*). Wizerunki ryb można zobaczyć na najstarszych malowidłach i w manuskryptach stworzonych przez człowieka. Nic w tym dziwnego, ponieważ ryby, jako źródło wartościowego pokarmu i podstawa rozwoju wielu społeczności, zawsze były silnie związane z naszym gatunkiem. Oprócz dużego znaczenia gospodarczego ryby od wieluset lat były i są uznanymi „zwierzętami towarzyszącymi”. Już w starożytnych Chinach doceniano ich piękno i hodowano ozdobne odmiany karasia, tworząc wzorce poprawności kształtów i ubarwienia, kreując trendy, które przetrwały do dnia dzisiejszego. Dzięki dynamicznemu rozwojowi akwarystyki słodkowodnej (a także i morskiej) pięknie urządzone akwaria, z ciekawymi gatunkami eksponowanych w nich ryb, pozwalają nam utrzymać fragment przyrody we własnym domu i dają tak potrzebne wytchnienie od codziennych obowiązków. Gama zmienności anatomicznych i fizjologicznych oraz sposobów dostosowania się do różnych warunków środowiska jest także przedmiotem fascynacji i obiektem badań naukowych. Takie gatunki jak: gupik (*Poecilia reticulata*), mieczyk (*Xiphophorus helleri*), ryżanka japońska (*Oryzias latipes*; ang. medaka), ryby z rodzaju *Nothobranchius* (ang. killifish) czy też ryby łososiowate i jesiotrowate oraz wiele innych wniosły duży wkład w rozwój badań w różnych dziedzinach biologii, medycyny i toksykologii. Jednak to pewna mała, azjatycka ryba, hodowana od dziesięcioleci w akwariach domowych, zrobiła zawrotną karierę jako zwierzę laboratoryjne, użytkowane w setkach ośrodków naukowych na całym świecie. Jest nią danio pręgowany *Danio (Brachydanio) rerio* (ang. zebrafish), gatunek po raz pierwszy opisany w roku 1822 przez doktora Francisca Buchanan-Hamiltona, szkockiego medyka i przyrodnika.

Danio pręgowany jest przedstawicielem rodziny karpowatych (*Cyprinidae*) – dalekim kuzynem karpia. W naturze zasiedla wody Indii, Pakistanu, Bangladeszu, Nepalu i Birmy. Bytuje w wodach o zróżnicowanym charakterze: od rzek, przez rozlewiska, do małych cieków wodnych i zbiorników zastoinowych. Preferuje zarośnięte płycizny, gdzie łatwo może zdobyć pożywienie (ryby danio są wszystkożerne) oraz skryć się przed drapieżcą. Ryby te są stosunkowo mało wymagające. Dobrze znoszą temperatury od 8°C do 32°C i przewodnictwo wody wahające się w granicach od 100 do 1400  $\mu\text{S}$  ( $\mu\text{S}$  – jednostka układu SI dotycząca przewodności i admitancji elektrycznej). Dla porównania: woda destylowana ma ok 5  $\mu\text{S}$ ,

a woda kranowa ma ok 500–800  $\mu\text{S}$ . Danio cechuje się dość dużą płodnością i krótkim cyklem rozwojowym. Te naturalne cechy oraz niewielki rozmiar ciała (dorosłe osobniki osiągają 4–5 cm) sprzyjają utrzymywaniu ich w warunkach laboratoryjnych (Ryc. 1). Danio w formie dzikiej charakteryzuje się smukłym ciałem o typowym ubarwieniu, składającym się z pasów biegnących wzdłuż ciała. Jest jednak wiele odmian fenotypowych, w których pasiasty wzór nie jest zachowany: *leopard*, *albino*, *nacre*, *roy orbison*, *casper*, *crystal* [2].

Warto poświęcić trochę uwagi początkom badań z wykorzystaniem danio. Wprawdzie w czerwcu 1976 r. ryby danio zostały po raz pierwszy wysłane w kosmos na pokładzie radzieckiej stacji kosmicznej Salut 5 (Almaz 3), ale za prekursora badań z zastosowaniem tego modelu jest uważany prof. George Streisinger, urodzony w Budapeszcie w 1927 roku. Skomplikowana historia tego okresu spowodowała, że jego rodzina wyemigrowała do USA. Po przejściu kolejnych etapów edukacji prof. Streisinger swoją pracę związał z badaniami z zakresu biologii molekularnej wirusów. Do potwierdzenia uniwersalności swoich odkryć dotyczących struktury i kodu genetycznego faga T4 (bakteriofag składający się z kapsydu i dwuniciowego DNA, atakujący bakterie *E. coli*; jeden z najlepiej poznanych wirusów) wybrał rybę danio pręgowaną. Jego entuzjazm związany z wykorzystaniem ryb danio, jako modelu do studiowania genetyki i rozwoju kręgowców niższych, początkowo zetknął się z umiarkowanym przyjęciem. Na szczęście sceptycyzm osłabł, a linie danio uzyskane w laboratorium prof. Streisingera (Oregon University w Eugene) są do dzisiaj używane w badaniach na całym świecie. Kariera małej rybki uzyskała znaczne przyspieszenie w latach 80. i 90. ubiegłego wieku, kiedy w tzw.: „Tübingen screen” (kierowanym przez prof. Christiane Nüsslein-Volhard, laureatkę Nagrody Nobla za badania nad genetyką rozwojową muszki owocowej) oraz „Boston screen” utworzone zostały pierwsze kolekcje mutantów danio. Genetyka danio stała się interesującą dla szerszej grupy naukowców [5]. Rok 2001 to początek sekwencjonowania genomu danio pręgowanego w Instytucie Sanger (UK). W tym samym roku w Eugene (Oregon, USA) powstał „Zebrafish International Resource Center” (ZIRC) – bank genów danio, w którym przechowywane są tysiące linii dzikich, transgenicznych i z mutacjami. W Europie siostrzane centrum – „European Zebrafish Resource Center” (EZRC) otwarte zostało dopiero w 2012 r. w Karlsruhe w Niemczech. W tym samym roku został otwarty także chiński odpowiednik – China Zebrafish Resource Center (CZRC).

W Polsce badania z użyciem modelu danio prowadzone są w kilku ośrodkach, ale tylko nieliczne zwierzętarnie prowadzą licencjonowaną hodowlę, a tylko z takiej zwierzęta mogą być pozyskiwane z myślą o wykorzystaniu do celów naukowych bądź edukacyjnych.

odpornościowego oraz choroby infekcyjne (wirusowe i bakteryjne). Możliwość oceny zjawisk patologicznych, leżących u podłoża tych chorób na poziomie molekularnym i komórkowym, stwarza szanse na znalezienie nowych dróg w ich leczeniu. Oprócz tego prowadzone są badania z zakresu: genetyki



Ryc.1. Hodowla laboratoryjna danio pęgowanego w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie – przykładowe pojemniki hodowlane. Zdjęcie autorstwa mgr. Michała Bazały.

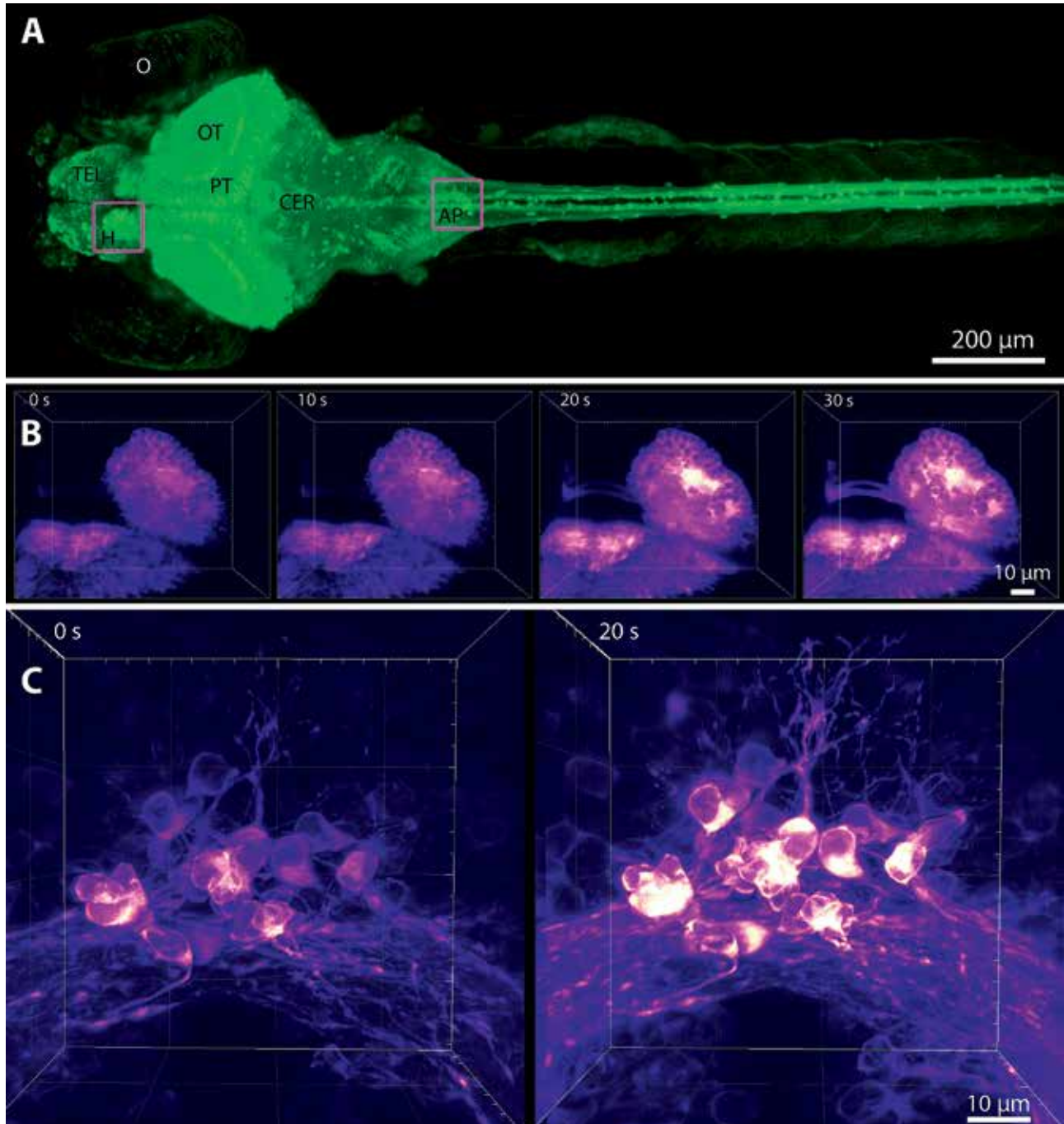
Wiele czynników wpłynęło na to, że danio pęgowany jest popularnym modelem badawczym na całym świecie. Łatwość rozmnażania i krótki cykl rozwojowy (ok. 3 miesiące od jaja do osobnika dorosłego) oraz możliwość częstego pozyskiwania dużych ilości materiału badawczego są niewątpliwie jednym z najważniejszych aspektów. Niemniej ważny jest fakt, że stadia larwalne danio mają niewielki rozmiar (ok. 3 mm) oraz są przezroczyste, co pozwala na śledzenie *in vivo* zachodzących w organizmie procesów. Zsekwencjonowany genom (danio posiada 25 chromosomów) oraz obecność odpowiedników ok. 70% genów ludzkich decyduje o wyjątkowości tego zwierzęcia [3]. Do najważniejszych chorób, zaliczanych do zagrożeń cywilizacyjnych, nad którymi prowadzone są badania przy zastosowaniu modelu danio należą: choroby neurodegeneracyjne i psychiczne, choroby nowotworowe i serca, choroby układu mięśniowo-kostnego, różnego typu zaburzenia układu

i rozwoju, farmakodynamiki, toksykologii oraz kontroli środowiska. Poza zaawansowanymi badaniami na poziomie komórkowym i molekularnym, warte wymienienia są również badania behawioralne. Dzięki nowoczesnym urządzeniom stworzonym do precyzyjnej obserwacji zarówno form młodocianych, jak i ryb dorosłych, możliwa jest analiza pozwalająca na ocenę zmian w zachowaniu spowodowanych zmianami patologicznymi, działaniem leków czy innych różnorodnych czynników. Jako zwierzę modelowe danio poddawane było szeregu modyfikacjom. Mutageniza ENU ( $C_3H_7N_3O_2$ , związek chemiczny o silnie mutagennym charakterze) została użyta m. in. do stworzenia pierwszych kolekcji mutantów (wcześniej wspomniany „Tübingen screen”). Była także podstawą projektu „The Zebrafish Mutation Project (ZMP)” realizowanego w Instytucie Sangera (UK), którego celem było utworzenie knock-out’ów we wszystkich genach kodujących białka w genomie



danio pręgowanego. W metodzie tej samce danio poddawane są krótkiej kąpiel w roztworze mutagenu w celu wywołania zmian w DNA gamet. W założeniu, po tarle, każdy zarodek powinien odziedziczyć unikalny zestaw mutacji, z których część będzie utrwalona w następnych pokoleniach. Metoda ta jest wprawdzie przypadkowa i mało wydajna, jednak jest podstawą w „forward genetic screen”, w których kolekcję potencjalnych mutantów przeszukuje się pod kątem interesujących fenotypów. Dopiero te próbuje

się wiązać z zaistniałą mutacją. Takie działanie pozwala na odkrywanie nowych genów/mechanizmów regulacji. ENU działa na różne zwierzęta, ale ze względu na to, że przeprowadzenie „forward genetic screen” wymaga użycia dużej ilości osobników, aspekty etyczne i ekonomiczne sprawiają, że danio jest jednym z nielicznych kręgowców, u których tę metodę warto zastosować. Inaczej jest w przypadku metody CRISPr/Cas9 (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*; CRISPR, CRI-



Ryc.2. Obrazowanie *in vivo* neuronów u transgenicznej, pięciodniowej larwy danio wyznakowanej sondą GCaMP5g [1] przy użyciu mikroskopu Light-sheet Z.1. (A) widok poglądowy: TEL-telencephalon, O-oculus, H-habenulla, OT-optic tectum, PT-pre tectum, CER-cerebellum, AP - area postrema; (B,C) seria zdjęć w kolejnych punktach czasowych, z rejonów zaznaczonych różową ramką, przedstawiających rosnące poziomy wapnia w cytoplazmie neuronów po indukcji środkiem powodującym rozprężanie błon mitochondrialnych (CCCP); (B) rejon nadwzgorza (zbliżenie na uzdeczkę-habenulla); (C) okolice pola dalszego (*area postrema*). Im jaśniejszy kolor, tym wyższy poziom wapnia. Zdjęcie autorstwa mgr. Michała Bazały.

SPR-associated (*Cas*) genes), która od paru lat rewolucjonizuje świat nauki. Jest to sztandarowa technika, bazująca na naturalnych mechanizmach obrony występujących u bakterii. W aspekcie chorób rzadkich, zastosowanie tej metody z wykorzystaniem modelu danio ma szczególnie duży potencjał. Szybki rozwój rybiego zarodka oraz dostępność materiału umożliwia przyspieszenie i intensyfikację badań, dzięki czemu (technicznie i ekonomicznie) możliwe jest przetestowanie nawet kilkunastu genów/mutacji i ich funkcji w organizmie kręgowca. Przy produkcji linii transgenicznych najczęściej stosowane były dwie metody – TALEN (ang. *transcription activator-like effector* (TALE) *nucleases*) i system Tol2, także oparte na mechanizmach obronnych bakterii. Metody te pozwalały na inkorporację stosunkowo długich fragmentów obcego DNA, ale zarówno przygotowanie konstruktów, jak i wyprowadzenie transgenicznej linii były żmudne i mało wydajne. Od czasu zaadaptowania CRISPR/Cas9 także do produkcji linii reporterowych i knock-in'ów pozwalających na kontrolowane włączanie i wyłączanie genów, klasyczne procedury TALEN i Tol2 są zastępowane tą prostszą i znacznie efektywniejszą metodą [4]. Możliwość uzyskania świecących w różnych kolorach (mikroskopia fluorescencyjna i konfokalna) organów, komórek, czy samych organeli umożliwia śledzenie złożonych procesów fizjologicznych i patologicznych na różnych poziomach (od organizmu do poziomu subkomórkowego, Ryc. 2). Przygotowując się do edytowania DNA u danio należy pamiętać o tym, że genom tej ryby charakteryzuje się bardzo wysokim stopniem polimorfizmu. Dlatego warto poznać dokładną sekwencje rejonu, w którym chcemy wprowadzać zmiany, we wszystkich rybach, które będą użyte do pozyskania ikry. Tylko w ten sposób unikniemy niespodzianek związanych z obecnością polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*; SNP), który może spowodować, że sekwencja, która miała być homologiczna, akurat w jednej z ryb nie będzie miała wystarczającego podobieństwa lub spowoduje, że wprowadzone zmiany będą miały innych charakter.

Wiele czynników ma wpływ na efektywność i powtarzalność wyżej wymienionych metod. Ważne jest przygotowanie odpowiedniego materiału (projektowanie, synteza, zbiór komórek, roztwór/zawiesina robocza, przechowywanie), dostępność odpowiedniego sprzętu, manualne zdolności oraz doświadczenie operatora nastrzykującego zarodki, jakość ikry oraz stadium rozwoju zarodka, a także miejsce wkłucia. Produkcja igieł jest sztuką, ale czas zainwestowany w zdobycie wprawy, zwróci się z pewnością. Dużo

czasu i cierpliwości wymaga także nauczanie się różnych technik nastrzykiwania czy transplantacji. Mając na uwadze to, że dobierając odpowiednie miejsce wkłucia możemy spowodować: wyciszenie genu w całym zarodku lub powstanie organizmu mozaikowego (na przykład tylko część neuronów będzie wyznakowana), a także to, że materiał (np. bakteria czy komórka nowotworowa) będzie migrować lub zostanie w miejscu iniekcji, warto poznać zarówno teorię, jak i zdobyć praktyczne doświadczenie pod okiem doświadczonego praktyka.

Typowa szpilka krawiecka ma 35 mm długości i 0,6 mm grubości. Cieniutkie igły do akupunktury mają ok. 0,26 mm, jednak w porównaniu z głową 5-cio dniowego danio (1,2 mm średnicy), nawet tak drobne przedmioty są duże. Narzędzia używane do pracy z danio muszą być odpowiednio dopasowane (zarówno dla zarodków, jak i dla osobników dorosłych), aby umożliwić prawidłowe wykonanie zabiegu. W sprzedaży pojawia się coraz większa gama narzędzi, jednak potrzeba przygotowywania własnych przyrządów wydaje się być wpisana w rozwój nauki. Komplikacje niosą także analizy zarodków/larw. O ile obserwacje pojedynczych sztuk nie są kłopotliwe – można je wykonać pod standardowym mikroskopem i udokumentować zwykłą kamerą, o tyle prześledzenie zmian fenotypowych u większej grupy (zwykle 24–96 sztuk, a czasem 2 tysięcy) nie jest łatwe. Zarodki rozwijają się dynamicznie. Dlatego dane, aby były porównywalne, muszą być zbierane w tym samym czasie. Są wprawdzie systemy umożliwiające automatyczne obrazowanie komórek, ale ich zastosowanie dla zarodków jest bardzo ograniczone (zarodki są zbyt grube i ruchliwe, a w dodatku trzeba zanalizować dużą ich liczbę). Z tych powodów techniczne ograniczenia są chyba jednym z największych wyzwań, z jakimi muszą się mierzyć osoby pracujące z modelem danio pręgowany. Dlatego tak ważna jest współpraca biologów z inżynierami, informatykami i innymi osobami, którym nie obce są nowości techniczne. Przykładem takiej współpracy są urządzenia do EKG, roboty do sortowania ikry i nowoczesne systemy do prowadzenia hodowli laboratoryjnej danio pręgowanego.

Początkowo ryby utrzymywano w typowych akwariach z różnymi układami filtracji i napowietrzania. Standardy utrzymania hodowli danio w warunkach laboratoryjnych muszą być na wyższym poziomie, podobnie jak w przypadku innych zwierząt laboratoryjnych. Z tego powodu powstały systemy wodne dedykowane danio laboratoryjnemu. Obecnie istnieje kilka firm produkujących takie zestawy. Wspólnymi cechami tych urządzeń są: wydajna filtracja

mechaniczna, chemiczna i biologiczna, ciągła kontrola podstawowych parametrów wody (temperatury, pH,  $\mu\text{S}$ , natlenienia), możliwość automatycznej wymiany części wody (najczęściej stosowana objętość wymienianej dobowo wody to 10–15%, ale w sytuacjach, gdy w systemie przebywa więcej ryb, można ją zwiększyć), automatyczna produkcja wody hodowlanej na bazie wody RO (ang. *reverse osmosis*), czyli wody uzyskanej po zastosowaniu filtra odwróconej osmozy. Systemy takie są również wyposażone w silne lampy UV, zmniejszające ryzyko szerzenia się infekcji w obrębie akwakultury. Parametry wody są dodatkowo kontrolowane, nie automatycznie, ale manualnie, w akwariach, przy użyciu testów akwarystycznych. Przy tych kontrolach szczególną uwagę zwraca się na stężenie amoniaku i azotanów w wodzie, jako metabolitów wysoce toksycznych dla ryb. Jako integralna część systemu, bądź też jako urządzenia działające niezależnie, instalowane są systemy alarmowe powiadamiające o zagrożeniach takich jak: zmiany pH, przewodności, temperatury, brak zasilania czy zakłócenia cyklu świetlnego. Ryby utrzymywane w warunkach laboratoryjnych mają określony program żywieniowy. Pokarm jest dopasowany do wieku (etapu rozwoju) i rozmiaru ryby. Dominują pokarmy suche w formie granulatów i płatków. Zastosowanie znajdują również pokarmy żywe. Są one cennym źródłem składników odżywczych i urozmaiceniem (polowanie jako przejaw naturalnego zachowania), jednak niosą ryzyko transmisji patogenów drogą pokarmową. Z tego powodu wrotki, pantofelki czy wylęg artemii muszą pochodzić z czystych hodowli – najlepiej prowadzonych przez daną pracownię (z materiału początkowo pozyskanego wyłącznie z autoryzowanych źródeł). Ryby karmione są od 3 do 6 razy dziennie w zależności od ich potrzeb i oceny aktualnego stanu. W dużych pracowniach sprawdzają się automaty do karmienia. Hodowla danio w warunkach laboratoryjnych ma charakter intensywny – cechuje się koniecznością uzyskania jak największej ilości materiału do badań. Przekłada się to na duże zagęszczenie ryb (w USA jest to maks. 10–15 ryb w litrze wody, do 5 ryb według zaleceń UE), konieczność prowadzenia oceny wydajności rozrodczej (indeks tareł) przy jak najniższej śmiertelności ryb dorosłych i narybku, z zachowaniem dobrostanu zwierząt. Pogodzenie tych wszystkich wymogów jest zadaniem trudnym, wymagającym wiedzy hodowlanej i dużego doświadczenia. Należy zwrócić uwagę, że nie tylko nadmierne zagęszczenie zwierząt może być niekorzystne. Danio to ryba o charakterze stadnym i z tego powodu powinna być utrzymywana w grupach liczących co najmniej 6 sztuk. W mniejszych grupach wzrasta

agresja i poczucie strachu, co może negatywnie wpłynąć na dobrostan zwierząt.

Dość interesujący jest proces rozmnażania danio w laboratoriach. U dorosłych osobników na ogół silnie zaznaczony jest dymorfizm płciowy. Samce posiadają zdecydowanie smuklejszą sylwetkę, a ich ubarwienie ma silne akcenty koloru pomarańczowego i niebieskiego, co szczególnie jest widoczne na brzuchu



Ryc.3. Różnorodność fenotypowa u danio pręgowanego. Zdjęcie autorstwa mgr. Michała Bazały.

i płetwach. Samice mają wyraźnie uwydatnioną partię brzuszną, a ubarwienie ma przewagę koloru żółtego i jasno-srebrnego. Nieco trudniejsze jest określenie płci u ryb o odmiennym kolorach w porównaniu do formy dzikiej (Ryc. 3). Szczyt możliwości rozrodczych przypada w przedziale wiekowym 5–10 miesięcy życia. Zapłodnienie jest zewnętrzne. Do pozyskiwania materiału do badań stosuje się najczęściej dwie podstawowe metody rozmnażania – tarła par i tarła grupowe. W obydwu przypadkach, w celu pozyskania zarodków na określonym etapie rozwoju, można zastosować dzielniki (przegrody, po usunięciu których dochodzi do tarła) izolujące samce od samic.



W procesie rozmnażania, oprócz wieku i doskonałej kondycji ryb, bezpośredni wpływ na przystąpienie do tarła ma cykl świetlny (dzień/noc). Ryby najchętniej rozpoczynają tarło w godzinach porannych, tuż po zapaleniu się światła. Ponieważ danio są kanibalami, konieczne jest zabezpieczenie ikry specjalnymi rusztami tarliskowymi, dzięki którym luźno opadająca na dno ikra jest bezpieczna. Samica jednorazowo składa około 100 ziaren ikry. W laboratoriach ikra, o średnicy ok 1,3 mm, jest zbierana na sitkach, płukana, sortowana i dalszy jej rozwój odbywa się w szalkach Petriego wypełnionych w 2/3 swej wysokości wodą. Tempo rozwoju zarodków jest zależne od temperatury. Dla hodowli laboratoryjnej standardem jest, że szalki z zarodkami inkubowane są w cieplarkach, w temperaturze 28,5°C [7]. W takich warunkach pierwszy podział komórkowy trwa ok. 20 min, po 2,5 godzinie zarodek ma 256 komórek, po 33 godzinach widać bijące serce. Po 4–5 dniach od zapłodnienia larwy danio mają ok. 3 mm i stają się zdolne do samodzielnego pobierania pokarmu. Jest to też moment, w którym danio staje się zwierzęciem w myśl ustawodawstwa i w związku z tym, dopiero od tego momentu, wykonanie procedur wymaga zgody komisji etycznej. Dużym wyzwaniem w efektywnej hodowli jest determinacja płci u tej ryby. Danio nie posiada typowych chromosomów płciowych, co powoduje możliwość zmiany płci w zależności od wielu czynników (zjawisko znane również u innych ryb i owadów). Wiadomym jest, że temperatura, wartość pH, zagęszczenie, rodzaj pokarmu i częstotliwość jego podawania, poziom hormonów i zaburzających ich działanie bisfenoli z pochodnymi (uwalniane z plastików) mogą mieć wpływ na segregację płci danio. Niestety nadal nie istnieje sposób na pełne kontrolowanie tego procesu, dlatego w hodowlach laboratoryjnych zawsze utrzymuje się więcej zwierząt niż pojedyncze pary. Hodowla danio na ogół bazuje na ciągłym odnawianiu linii. Związane jest to z koniecznością zabezpieczenia ciągłości prac badawczych. Utrzymywanie dużych ilości ryb, które nie są aktualnie użytkowane, a mogą być potrzebne w przyszłości, bardzo obciąża budżet zwierzętarni. Rozwiązaniem tego problemu, jak również doskonałym zabezpieczeniem linii hodowlanych, jest wprowadzenie bankowania nasienia. Procedura ta wymaga dużego doświadczenia manipulacyjnego (pobieranie nasienia metodą przyżyciową lub pośmiertną) oraz doskonałej znajomości procedur konserwacji i przechowywania w ciekłym azocie. Mrożenie oocytów i zarodków, zabiegi stosowane np. u myszy, nie są dopracowane i w obecnej chwili nie znajdują z tego powodu zastosowania w hodowli laboratoryjnej danio.

Powiedzenie „zdrowy jak ryba” jest bardzo zwodnicze. Istnieje kilka jednostek chorobowych stanowiących poważne zagrożenie dla danio pręgowanego. Zakażenia wirusowe, bakteryjne, grzybicze i pasożytnicze muszą być kontrolowane w hodowlach dbających o wysoki standard utrzymania zwierząt. W przypadku hodowli zwierząt laboratoryjnych standardy i wymagania są wyjątkowo wysokie, ponieważ oprócz aspektów ekonomicznych, potencjalnego zagrożenia dla ludzi (choroby odzwierzęce), stan zdrowia zwierząt może bezpośrednio wpływać na wyniki badań. Aby zapewnić dobrostan zwierząt i najwyższą jakość materiału badawczego, tworzone są programy ochrony zdrowia określające częstość i charakter badań wykonywanych w celu wykrycia patogenów oraz plan zwalczania zagrożeń w przypadku potwierdzenia obecności czynników chorobotwórczych. Rutynowe badania mogą być wykonywane w ośrodku macierzystym. Natomiast jeśli placówka nie dysponuje odpowiednim zapleczem ludzkim i laboratoryjnym, bądź chce potwierdzić wyniki, warto co 6–12 miesięcy wykonać badania w autoryzowanych, zewnętrznych laboratoriach diagnostycznych. Ocena wyników oraz porównawcze zestawienia z dłuższego okresu pozwalają na opracowanie prognozy ułatwiającej dalsze działania zapewniające sprawne funkcjonowanie akwakultury.

Dla ryb danio pręgowany profile diagnostyczne obejmują najczęściej bakterie z rodzaju *Mycobacterium*, z których szczególnie niebezpieczne dla ryb oraz ludzi są *M. marinum*, *M. fortuitum* i *M. haemophilum* oraz takie bakterie jak: *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare*, *Pseudomonas spp./Aeromonas spp.*, *Vibrio spp.* oraz pasożyty jednokomórkowe, takie jak *Microsporidia* (*Pseudoloma neurophilia* i *Pleistophora hypohessobricosis*) i nicienie jelitowe (*Pseudocapillaria tomentosa*). Oprócz wymienionych czynników, umieszczonych w podstawowych profilach diagnostycznych, należy pamiętać, że zagrożenie dla danio laboratoryjnych może dodatkowo stanowić wiele innych patogenów występujących w amatorskiej hodowli ryb ozdobnych lub hodowlanych. W hodowlanej praktyce laboratoryjnej, w związku z ryzykiem transmisji zakażeń, nie stosuje się naturalnych podłoży akwarystycznych, żywych roślin oraz niewskazane jest utrzymanie ślimaków i innych organizmów wodnych. Z tego samego powodu nie wolno stosować żywych i mrożonych pokarmów akwarystycznych. Nie należy zapominać o warunkach środowiskowych, których gwałtowne wahania mogą obniżyć wydajność układu immunologicznego ryb i spowodować wystąpienie chorób. Także zmiany genetyczne wielu linii mogą

mieć bezpośredni wpływ na ich odporność. Nadal prowadzona jest dyskusja co do zasadności leczenia zwierząt laboratoryjnych, w tym także danio przegowanego. Głównymi argumentami „za” są wymogi prawne dotyczące zapewniania dobrostanu i właściwego traktowania oraz chęć utrzymania szczególnie cennych ryb, które akurat zachorowały. „Przeciw” leczeniu przemawia to, że nieprzewidywalnym jest wpływ leków na organizm modelowy (przyjmuje się, że nawet drugie pokolenie może nosić ślad działań farmakologicznych). Bardzo duże znaczenie ma prawidłowe przeprowadzanie kwarantanny nowoprzybytych linii. Do systemu głównego akwakułury laboratoryjnej może trafić jedynie potomstwo ryb przebywających w kwarantannie i uznanych za zdrowe. Bezwzględnym warunkiem bezpieczeństwa jest skuteczne odkażanie ikry od nich pochodzącej. Należy mieć świadomość, że istnieją choroby, przed których przeniesieniem nie uchroni nas ani zwykła kwarantanna ani odkażanie ikry. Nie ma na te choroby skutecznych lekarstw. W przypadku danio przegowanego, doskonałym przykładem tego problemu jest zakażenie *Pseudoloma neurophilia* – szczególnie

niebezpieczny pasożyt układu nerwowego [6]. W przypadkach innych chorób, np. infekcji *Mycobacterium spp.*, pomimo istnienia znanych i skutecznych leków, konstrukcja systemów używanych do hodowli danio uniemożliwia skuteczną terapię.

Pracownia Hodowli Ryb Danio („Zebrafish Core Facility”) w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie powstała jako baza projektu FishMed, kierowanego przez Dyrektora Instytutu prof. dr hab. Jacka Kuźnickiego. Po zakończeniu realizacji projektu jest największym w Polsce licencjonowanym obiektem tego typu. Obecnie dysponuje tysiącem akwariów, gdzie hodowane jest około 17 tysięcy ryb, reprezentujących ponad 100 linii dzikich, transgenicznych oraz zmutowanych. Z Pracowni tej korzysta 8 grup badawczych z MIBMiK oraz użytkownicy zewnętrzni, głównie z innych ośrodków warszawskich oraz z Olsztyna i Poznania. Wzrastające zainteresowanie polskich naukowców wykorzystaniem tego przydatnego w badaniach biomedycznych modelu niesie nadzieję na dalszy rozwój Pracowni i innych rybich zwierzętarni w różnych placówkach w naszym kraju.

---

## Bibliografia:

1. Ahrens M. B., Orger M. B., Robson D. N., Li J. M., Keller P. J. 2013. Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. *Nature Methods* 10, 413–420.
2. Antinucci P., Hindges R. 2016. A crystal-clear zebrafish for in vivo imaging. *Scientific Reports* 6: 29490.
3. Howe K., Clark M. D., Torroja C. F., Torrance J., Berthelot C., et al. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503.
4. Li J., Zhang B., Bu J., Du J. 2015. Intron-based genomic editing: a highly efficient method for generating knockin zebrafish. *Oncotarget*. 6(20): 17891–17894.
5. Nüsslein-Volhard Ch. 2012. The zebrafish issue of *Development*. *Development* 139: 4099–4103.
6. Spagnoli S. T., Xue L., Murray K. N., Chow F., Kent M. L. 2015. *Pseudoloma neurophilia*: A Retrospective and Descriptive Study of Nervous System and Muscle Infections, with New Implications for Pathogenesis and Behavioral Phenotypes. *Zebrafish*. 12(2): 189–201.
7. Westerfield, M. (2000). *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.