

Model *Danio* pręgowanego w onkologii eksperymentalnej – przegląd systematyczny badań ukierunkowanych na raka jelita grubego i czerniaka

Oliwia Stelmach¹, Dominika Leoniec-Czajka², Maria Walczak²

¹Toksykologiczne Studenckie Koło Naukowe, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków, Polska

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

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

Adres do korespondencji

Dominika Leoniec-Czajka, Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, Polska; e-mail: dominika.leoniec@uj.edu.pl

Źródła finansowania

Nie wskazano źródeł finansowania.

Konflikt interesów

Nie istnieje konflikt interesów.

Otrzymano: 2025.09.12

Zaakceptowano: 2026.01.23

Opublikowano on-line: 2026.01.30

DOI

10.32383/farmpol/217287

ORCID

Oliwia Stelmach –  0009-0007-9792-5251

Dominika Leoniec-Czajka –  0009-0001-9599-3767

Maria Walczak –  0000-0002-5670-9866

Copyright

© Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

To jest artykuł o otwartym dostępie,

na licencji CC BY NC 

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

Zebrafish model in experimental oncology – a systematic review of research focused on colorectal cancer and melanoma

Subject of the Review. The article is a review of scientific publications based on preclinical studies addressing carcinogenesis and associated processes in colorectal cancer and melanoma, in which zebrafish were used as an animal model.

Objective of the Review. The study aims to illustrate the range of possibilities offered by the zebrafish model in cancer research, based on an analysis of studies focusing on colorectal cancer and melanoma.

Materials and Methods. The literature review was conducted using the PubMed, Mendeley, and ScienceDirect databases, applying the following keywords in different combinations: “cancer”, “zebrafish (*Danio rerio*)”, “colorectal neoplasms”, “melanoma”. To clarify more advanced processes, concepts, and phenomena (such as immunoediting, long non-coding RNAs, small nucleolar host genes, or uveal melanoma), an auxiliary review was performed. The “Introduction” and sections concerning colorectal cancer and melanoma include current statistical data on cancer incidence and mortality (GLOBOCAN). The subsection “Melanoma” presents information on the histological similarity of tumors developing in both humans and zebrafish. Among the inclusion criteria for this systematic review were adequate relevance to the selected keywords, a recent publication date (articles from 2019–2025), applicable legal regulations, and the type and language of the article consistent with the study's assumptions (review papers and original research articles written in English). The main subsections of this article (“Colorectal Cancer” and “Melanoma”) are based on ten original research papers. The information contained therein has been expanded and detailed using data from fifteen additional literature sources.

Results. Analyzed publications revealed a broad range of applications of the zebrafish model in preclinical oncology research. These include testing novel therapeutic compounds, developing personalized

treatment strategies, characterizing mechanisms of acquired therapy resistance and evaluating approaches to overcome them, investigating modulation of immune cell functions within the tumor microenvironment, assessing the role of innate immunity in cancer immunoediting, estimating the influence of risk factors on the initiation of carcinogenesis, and studying the role of long non-coding RNAs and small nucleolar host genes in cancer progression.

Conclusions. Based on the reviewed studies on two selected malignancies, the zebrafish model has been confirmed as a valuable tool in preclinical cancer research. The findings support the rationale behind the growing interest in zebrafish as a laboratory organism in experimental oncology.

Keywords: carcinogenesis, zebrafish, colorectal neoplasms, melanoma.

© Farm Pol, 2025, 81(7): 419–437

CO NOWEGO ZAWIERA PRACA?

1. Zwrócenie uwagi na przyczyny i możliwości stosowania modeli innych niż modeli gryzoni w przedklinicznych badaniach nad nowotworzeniem.
2. Zwrócenie uwagi na korzystne właściwości przyczyniające się do wzrostu zainteresowania modelem *Danio* pręgowanego w przedklinicznych badaniach nad nowotworzeniem.
3. Przegląd publikacji badawczych dotyczących raka jelita grubego, w których wykorzystano model *Danio* pręgowanego, ze szczególnym zwróceniem uwagi na przyczyny i zalety wykorzystania modelu.
4. Przegląd publikacji badawczych dotyczących czerniaka, w których wykorzystano model *Danio* pręgowanego, ze szczególnym zwróceniem uwagi na przyczyny i zalety wykorzystania modelu.

WPROWADZENIE

Choroby nowotworowe stanowią obecnie jedno z najszerzej analizowanych zagadnień zdrowotnych [1–3]. Statystyki, pomimo prowadzenia zaawansowanych badań przedklinicznych oraz rozwoju medycyny i diagnostyki, pozostają nieubłagane. W 2022 r. na świecie odnotowano blisko 20 mln nowych przypadków zachorowań na nowotwory oraz 9,7 mln zgonów będących skutkiem choroby [2, 4]. W porównaniu z rokiem 2020, kiedy oszacowano liczbę nowych przypadków na 19,3 mln oraz liczbę zgonów na 10 mln [1], można zauważyć spadek umieralności, jednak zachorowalność wzrosła o około 700 tysięcy przypadków, co pokazuje skalę problemu.

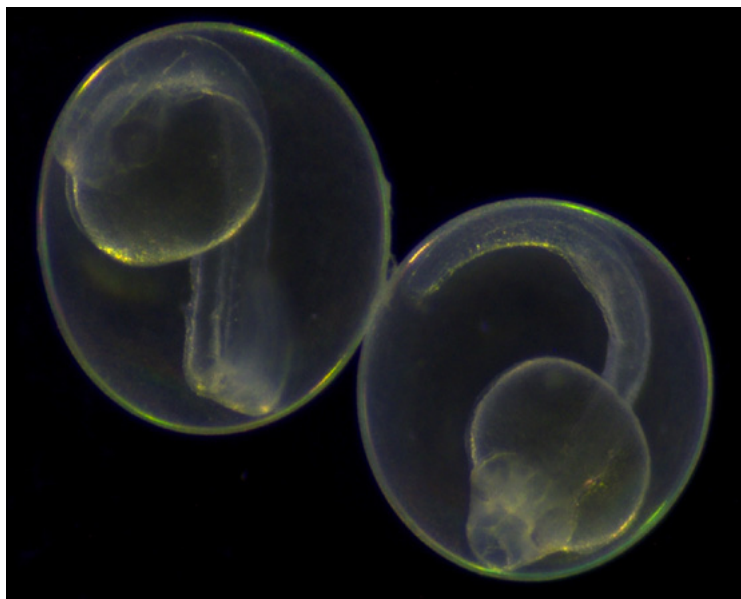
Przyczyny nowotworzenia można w prosty sposób podzielić na egzogenne i endogenne [5]. Wśród przyczyn egzogennych wskazuje się na znaczne narażenie społeczeństwa na czynniki ryzyka, takie jak palenie tytoniu, nadużywanie alkoholu, ogólnie pojętą złą dietę, brak aktywności fizycznej, siedzący tryb życia czy zanieczyszczenie powietrza [4, 6]. Spośród przyczyn endogennych zwraca się uwagę przede wszystkim na aspekty związane z mutacjami genetycznymi, ale także na skutki narażenia na stres oksydacyjny, dysregulację mikrobiomu lub zaburzenia funkcjonalności układu endokrynnego [5, 7]. Warto zauważyć, że w zależności od rodzaju choroby nowotworowej, czynniki ryzyka mogą być odmienne. Na przykład, do najważniejszych czynników ryzyka rozwoju raka płuc klasyfikuje się nałogowe, długotrwałe palenie tytoniu, ekspozycję na dym, spaliny, toksyczność w miejscu pracy itp. [8], podczas gdy prawdopodobieństwo rozwinęcia raka piersi zwiększa m.in. wczesne dojrzewanie płciowe, otyłość i mutacje w genach BRCA1 i BRCA2 [9].

W badaniach przedklinicznych, również tych dotyczących nowotworzenia, szeroko stosuje się modele zwierzęce (modele przyżyciowe, modele *in vivo*). Pojęcie to odnosi się do gatunków innych niż człowiek, wykorzystywanych do oceny przebiegu zainicjowanej choroby, opracowywania nowych metod terapeutycznych oraz szeroko pojętego testowania leków. Model zwierzęcy zwiększa możliwości prowadzenia kompleksowych badań jeszcze przed przeprowadzeniem badań z udziałem ludzi [10]. Ogromną zaletą modeli *in vivo* w badaniach nad nowotworzeniem jest możliwość zobrazowania przy ich użyciu dynamicznie zmieniającego się mikrośrodowiska rozwijającego się guza i komórek będących jego częścią, czego, ze względu na brak złożoności żywego organizmu, nie umożliwiają modele *in vitro* [5, 11, 12]. Modele przyżyciowe pozwalają lepiej zrozumieć procesy leżące u podstaw inwazji i progresji nowotworowej, ułatwiają poznanie etiologii i podstawy molekularnej nowotworzenia, dają wgląd w przebieg procesu metastazy oraz pozwalają lepiej zrozumieć interakcje pomiędzy guzem a gospodarzem. Modele *in vivo* są również nieocenione w rozpoznawaniu nowych markerów nowotworowych, projektowaniu terapii celowanych i badaniu nowych substancji terapeutycznych [12, 13].

Pomimo iż uważa się, że żaden z obecnie stosowanych modeli zwierzęcych nie jest idealnym narzędziem do odwzorowania procesu nowotworzenia toczącego się w organizmie ludzkim [12, 13], w badaniach przedklinicznych wykorzystuje się kilka organizmów, cechujących się

odmiennym spektrum właściwości. Do najczęściej wybieranych należą gryzonie (myszy, szczury, świnki morskie), jednak spotkać się można także z wyborem innych organizmów, takich jak muszki owocowe, kurczaki, króliki, wiewióreczniki (łac. *Scandentia*), świny, psy, koty czy niektóre gatunki małp [5, 12, 13]. W badaniach przedklinicznych ukierunkowanych na problemy onkologiczne, złotym standardem pozostaje model myszy [3, 5, 14], jednak w czasie ostatnich dekad model rybi, oparty na *Danio přegowanym* (łac. *Danio rerio*, ang. *Zebrafish*), wydaje się zyskiwać popularność [12, 15]. Zgodnie z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE [Rozdz. 1. Art. 1. pkt. 3a(i)] oraz Ustawą z dnia 15 stycznia 2015 roku o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz.U. 2015 poz. 266; Rozdz. 1. Art. 2.1.1), osobniki niezdolne do samodzielnego pobierania pokarmu z otoczenia nie podlegają ochronie prawnej [16, 17]. *Danio přegowane* do piątego dnia po zapłodnieniu (ang. *day post fertilisation*, DPF) nie żerują, żywią się jedynie substancjami zawartymi w obrębie żółtka, dlatego też nie są uznawane w świetle prawa za zwierzęta doświadczalne i nie wymagana jest zgoda Komisji Etycznej do prowadzenia badań z ich udziałem. Praca z *Danio rerio* do 5 DPF włącznie stanowi więc metodę alternatywną wobec klasycznych testów *in vivo* [18].

Zwraca się uwagę na liczne właściwości, które przyczyniły się do wzrostu zainteresowania modelem *Danio přegowanego* w badaniach dotyczących ludzkich chorób, w tym także nowotworzenia. Pomimo że organizm ten jest niewielkich rozmiarów, posiada genom blisko w 70% zgodny z genomem ludzkim. W trakcie jednego tarła zapłodnionych zostaje kilkaset embrionów. Sam proces zapłodnienia i późniejszy rozwój *Danio rerio* odbywają się w sposób pozaustrojowy, dzięki czemu możliwe jest prowadzenie przyżyciowych obserwacji już od pierwszych chwil życia ryby. Embrion i młodocianą larwę, a także osobniki dorosłe genetycznie modyfikowanej linii *casper*, cechuje przezroczystość powłok ciała, co znacząco ułatwia wizualizację namnażających się komórek nowotworowych i dokonywanie oględzin *in vivo* bezpośrednio od chwili inokulacji. Wprowadzanie różnego rodzaju manipulacji genetycznych do genomu ryby jest czynnością stosunkowo łatwą, dlatego też w celach badawczych wykorzystuje się organizmy modyfikowane, cechujące się na przykład fluorescencyjnym wyznakowaniem układu naczyniowego lub wybranego rodzaju komórek. Wzrost i dojrzewanie *Danio přegowanego* przebiegają o wiele szybciej niż u wyższych kręgowców (por. **rycina 1**),



Rycina 1. Embriony *Danio přegowanego* w 1. dobie po zapłodnieniu (około 24 godziny). Mikroskopia ciemnego pola. Fotografia własna.

Figure 1. Zebrafish embryos 1 day post fertilisation (around 24 hours). Dark field microscopy. Own photography.

co znacząco skraca czas potrzebny do pozyskania istotnych klinicznie wyników. Ważną cechą modelu jest niejednoczesne dojrzewanie wrodzonej i nabytej odporności – u wyższych kręgowców odporność nabyta rozwija się już od pierwszych chwil życia, natomiast u *Danio přegowanego* w pierwszym miesiącu życia działają wyłącznie mechanizmy odporności wrodzonej, dlatego też wskaźnik odrzuceń przeszczepu podczas podejmowanych prób inokulacji jest znacznie niższy niż w przypadku innych modeli przyżyciowych. Warto także podkreślić, że koszt utrzymania osobników w eksperymencie jest wyraźnie niższy niż w przypadku kręgowców wyższych [3, 12, 14, 19–21].

CEL PRACY

Celem niniejszego przeglądu systematycznego jest zobrazowanie spektrum możliwości, jakie oferuje model *Danio přegowanego* w badaniach z zakresu onkologii eksperymentalnej, w oparciu o przegląd oryginalnych prac badawczych dotyczących dwóch wybranych nowotworów złośliwych: raka jelita grubego oraz czerniaka.

METODYKA WYSZUKIWANIA I DOBORU PIŚMIENNICTWA

Przeglądu literatury dokonano korzystając w przeważającym zakresie z baz danych PubMed i Mendeley oraz z bazy Science Direct w stopniu uzupełniającym, używając słów kluczowych:

nowotwór (ang. *cancer*), Danio pręgowany (ang. *zebrafish*, łac. *Danio rerio*), nowotwory jelita grubego (ang. *colorectal neoplasms*), czerniak (ang. *melanoma*) w kombinacjach *cancer and zebrafish*; *zebrafish and colorectal neoplasms*; *cancer and zebrafish and colorectal neoplasms*; *zebrafish and melanoma*; *cancer and zebrafish and melanoma*, wprowadzając, jako dodatkowe kryterium, datę publikacji (Pubmed, funkcja *results by year*: 2019–2026; Mendeley i Science Direct, funkcja „*year/years*”: 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024, 2025). W celu wyjaśnienia bardziej zaawansowanych procesów, pojęć i zjawisk, takich jak immunoedycja (ang. *immunoediting*), długie niekodujące RNA (ang. *long non-coding RNA*), geny gospodarza małego jąderkowego RNA (ang. *small nucleolar RNA host genes*), czerniak błony naczyniowej oka (ang. *uveal melanoma*) wykonano przegląd pomocniczy przy użyciu tych samych baz danych (w procesie wyszukiwania korzystano z pojedynczych haseł kluczowych, bez tworzenia kombinacji, w znaczącej przewadze opierając się na informacjach zawartych w pracach przeglądowych). W podrozdziałach dotyczących raka jelita grubego oraz czerniaka ujęto globalne dane statystyczne na temat nowotworzenia (GLOBOCAN), porównując ze sobą raporty pochodzące z lat 2020 i 2022 (ang. *global cancer statistics 2020*; *global cancer statistics 2022*). W podrozdziale „Czerniak”, przedstawiono dodatkowo informacje na temat podobieństwa histologicznego guzów rozwijających się zarówno u człowieka, jak i u Danio pręgowanego.

W początkowym, pierwszym etapie pracy źródła bibliograficzne selekcjonowało trzech autorów w sposób niezależny od siebie, biorąc pod uwagę tematykę niniejszej pracy oraz typ artykułu (prace przeglądowe i oryginalne prace badawcze, z wyłączeniem dokumentów będących streszczeniami konferencyjnymi, pracami dyplomowymi i preprintami). W drugim etapie pracy wspólnie przeprowadzono selekcję zgromadzonej literatury, rozpoczynając od wyeliminowania prac powtarzających się oraz, uznanych na drodze kompromisu, za niewystarczająco istotne. W tym celu wspólnie przeprowadzono ponowną analizę prac zgromadzonych przez wszystkich współautorów. W kolejnym, trzecim etapie, oceniono zasadniczą treść zgromadzonej literatury pod kątem zgodności ze wspólnie wybranymi i zaakceptowanymi kryteriami włączenia i wyłączenia. Do kryteriów włączenia zaliczono: zgodność względem wybranej terminologii kluczowej, język angielski prac, rok publikacji obejmujący lata 2019–2025. Wśród kryteriów wykluczających prace z niniejszego przeglądu wyróżniono: nieaktualną datę wydania (artykuły

opublikowane przed rokiem 2019, z wyjątkiem nadal obowiązujących aktów prawnych), niewłaściwy typ i brak dopasowania względem wybranych słów kluczowych oraz język pracy inny niż język angielski (por. **diagram 1**: schemat blokowy PRISMA). Preferencyjnie brano pod uwagę prace, w których prowadzono badania z wykorzystaniem Danio pręgowanego w sposób przyżyciowy, dlatego we wszystkich wybranych publikacjach figuruje model *in vivo*. Czterdzieści dwa spośród czterdziestu sześciu cytowanych źródeł literaturowych stanowiły prace opublikowane w latach 2020–2024.

Wszystkie kluczowe etapy selekcji bibliografii przeprowadzono z zachowaniem kompromisu (zostały przeprowadzone przez trzech współpracujących ze sobą autorów). Wyłącznie etap pierwotnej selekcji był procesem przeprowadzonym niezależnie, na podstawie wspólnie ustalonych kryteriów wstępnych, dlatego podjęto decyzję o odstąpieniu od statystycznego pomiaru formalnego stopnia zgodności międzyocenianącej.

Główne podrozdziały niniejszego artykułu („Rak jelita grubego”, „Czerniak”) oparto na dziesięciu oryginalnych pracach badawczych, opublikowanych w latach 2021–2024 i ukierunkowanych na jedną z dwóch kluczowych dla niniejszej pracy chorób nowotworowych (do analizy nie włączono prac, w których głównym obiektem badawczym był nowotwór innego typu), a zawarte w nich informacje rozszerzono i uszczegółowiono, posługując się danymi zawartymi w piętnastu dodatkowych źródłach literaturowych, opublikowanych w latach 2020–2024.

Nie zarejestrowano protokołu niniejszego przeglądu systematycznego w bazie danych PROSPERO.

WYNIKI I DYSKUSJA

Rak jelita grubego

Nawiązując do globalnych statystyk dotyczących nowotworzenia (GLOBOCAN) z 2022 r., rak jelita grubego (ang. *colorectal cancer*, CRC) zajmuje trzecie miejsce pod względem zapadalności oraz drugie pod względem śmiertelności spośród wszystkich chorób nowotworowych na świecie [2]. W porównaniu ze statystyką z roku 2020, zachorowalność wydaje się utrzymywać na podobnym poziomie, natomiast umieralność nieznacznie zmalała [1]. Ze względu na liczbę zachorowań oraz nadal wysoką umieralność z powodu CRC, naukowcy stale poszukują najlepszych możliwych metod detekcji oraz leczenia tej jednostki, posługując się między innymi modelem zwierzęcym Danio pręgowanego.

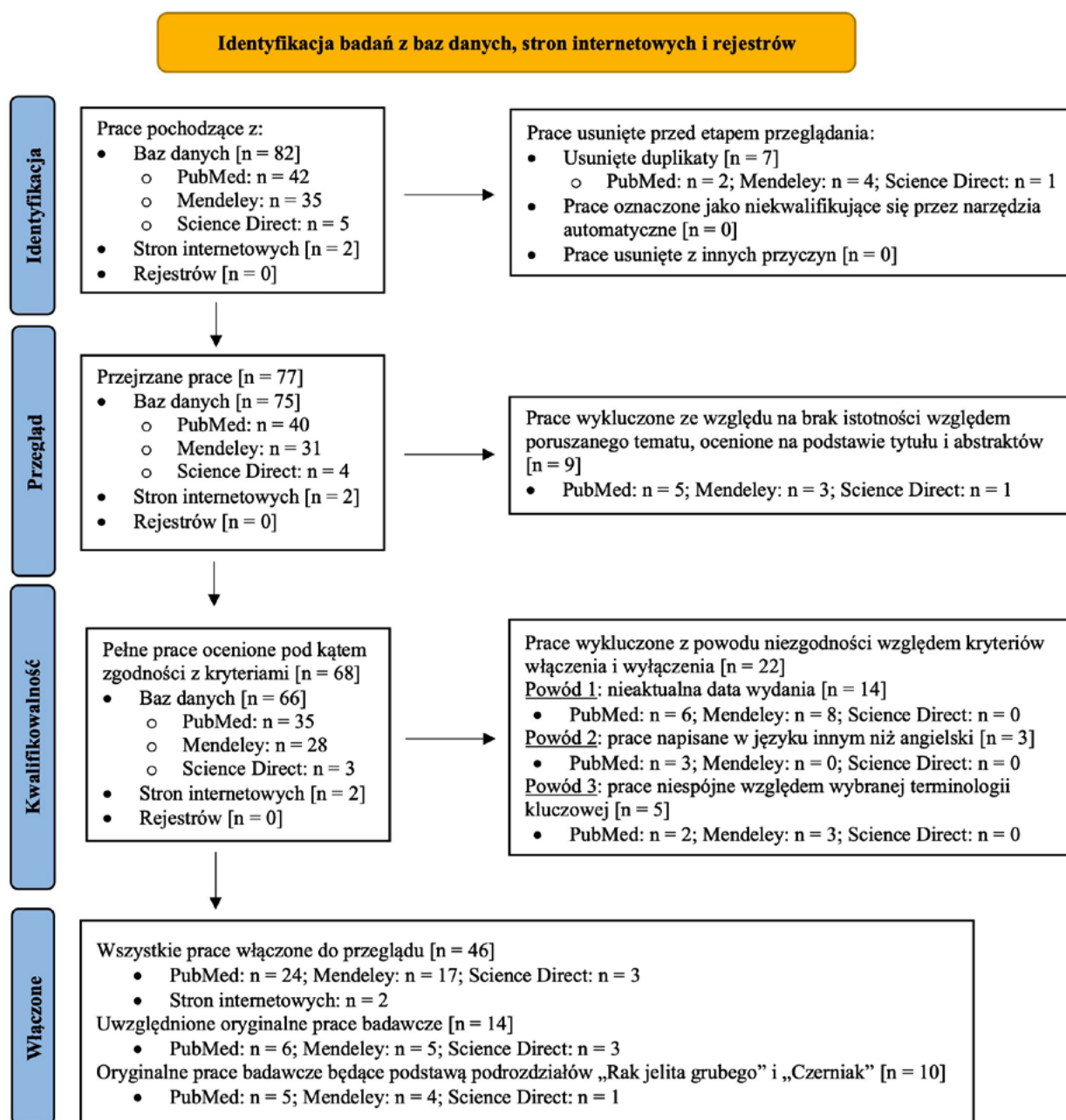


Diagram 1. Schemat blokowy PRISMA 2020 dla nowych przeglądów systematycznych, które obejmowały przeszukiwanie baz danych, rejestrów i innych źródeł. Pobrano ze strony oficjalnej PRISMA: <https://www.prisma-statement.org/prisma-2020-flow-diagram>

Diagram 1. The PRISMA 2020 flow diagram for new systematic reviews that included searching databases, registers, and other sources. Downloaded from the official PRISMA website: <https://www.prisma-statement.org/prisma-2020-flow-diagram>

W pracy Tao i in. opublikowanej w 2021 r. opisano badania przeprowadzone w celu przetestowania skuteczności leczenia raka jelita grubego nowym ksenobiotykiem z udziałem modelu *Danio rerio* [22]. Obecnie, w chemioterapii CRC często wykorzystywanym organicznym związkem cytostatycznym jest 5-fluorouracyl (5-FU). Działanie 5-FU związane jest z występowaniem licznych skutków ubocznych, co stało się przyczyną poszukiwania alternatywnych opcji leczenia. W badaniu

opisano hamujący wpływ naturalnego polisacharydu bogatego w mannozę, pozyskanego ze storczyka gatunku *Dendrobium officinale* (ang. *Dendrobium officinale polysaccharide*, DOPW-1), na komórki CRC. Badania na temat roli tego czynnika w leczeniu raka opierają się głównie na wynikach testów *in vitro*, prowadzonych na ludzkich liniach komórkowych raka jelita grubego HT-29. Niewystarczająca liczba badań *in vivo* skłoniła naukowców do wykorzystania modelu zwierzęcego.

Obiecującym wyborem okazał się *Danio* pręgowany. W pracy podjęto decyzję o wyborze tego modelu przede wszystkim ze względu na takie cechy jak: szybkie zdolności reprodukcyjne, transparentność powłok ciała oraz fizjologiczne i genetyczne podobieństwo do organizmu ludzkiego. Przeprowadzone badania dowiodły, że DOPW-1 wykazuje obiecujące przeciwnowotworowe właściwości zarówno w przypadku badań *in vitro*, jak i *in vivo* w modelu *Danio rerio*. Wykazano spójność badań *in vitro* i *in vivo* w przypadku wyższej skuteczności połączenia terapii DOPW-1 i 5-FU niż samodzielnego stosowania 5-FU, nie stwierdzono natomiast istotnych różnic między terapią kombinowaną DOPW-1 i 5-FU a monoterapią DOPW-1, co okazuje się niespójne z badaniami *in vitro*. Powyższe wyniki sugerują korzystny efekt stosowania DOPW-1 jako terapii samodzielnej lub w połączeniu z 5-FU w leczeniu CRC, jednak istnieje potrzeba potwierdzenia uzyskanych wyników w przyszłości [22]. Wykorzystanie modelu *in vivo* *Danio* pręgowanego pozwoliło na wizualizację badań prowadzonych *in vitro* i ocenę korelacji między nimi. Dodatkowo, ze względu na liczne cechy podobieństwa organizmu *Danio rerio* i człowieka, szczególnie w zakresie genomu, wyniki badań mogą być ekstrapolowane na organizm ludzki i stanowić podstawę do wdrożenia nowej terapii CRC z wykorzystaniem DOPW-1.

Warte uwagi badanie z udziałem modelu *Danio rerio* przedstawiono w 2021 r. w pracy Póvoa i in., dotyczącej roli wrodzonej odpowiedzi immunologicznej w procesie immunoedycji (ang. *immunoediting*) [23]. Immunoedycja to hipotetyczny proces, w którym zmutowane komórki wyswabdzają się spod nadzoru immunologicznego, inicjując proces nowotworzenia. Proces ten składa się z trzech faz: eliminacji, równowagi i ucieczki. W pierwszej fazie komórki układu odpornościowego poprawnie rozpoznają i eliminują komórki potencjalnie nowotworowe. Niektórym z komórek nowotworowych udaje się przetrwać ten etap i przejść do fazy równowagi, gdzie dzielą się pod nadzorem układu odpornościowego i mogą pozostać niezauważone nawet przez cały czas trwania życia. Można stwierdzić, że procesy eliminacji komórek nowotworowych i nowotworzenia na tym etapie współwystępują ze sobą. W fazie równowagi może dojść także do wyselekcjonowania w mikrośrodowisku guza (ang. *tumor microenvironment*, TME) klonów nowotworowych opornych na działanie układu immunologicznego. W wyniku tego zjawiska następuje faza trzecia, tj. ucieczka, w której komórki nowotworowe przełamują mechanizmy obronne organizmu i uwalniają się spod nadzoru

immunologicznego. Dochodzi do rearanżacji TME na immunosupresyjne, co warunkuje dalszy rozwój guza [23–25].

W przebiegu badania oceniano wpływ różnych mechanizmów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej na aktywny proces nowotworzenia, posługując się modelem *Danio* pręgowanego [23]. Wykorzystano dwa rodzaje komórek CRC, pochodzących od jednego pacjenta, z dwóch różnych stadiów rozwojowych guza: komórki pierwotnego raka jelita grubego SW480 oraz komórki metastatyczne SW620, przerzutu z obrębu guza pierwotnego do węzłów chłonnych. Dowiedziono, że obie grupy komórek różnią się dynamiką rozwoju. SW480 uważa się za komórki regresji guza, natomiast SW620 wykazują wyższą oporność względem układu immunologicznego i powodują progresję zmian nowotworowych. Ponieważ wykazano, że układ odpornościowy *Danio* pręgowanego angażuje podobne mechanizmy obronne we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej do tych występujących u ludzi (układ dopełniacza, fagocytyzujące makrofagi, neutrofile, receptory Toll – podobne), zdecydowano o wyborze tego modelu i zrezygnowaniu z popularnego modelu mysiego. W trakcie badań, embriony *Danio* pręgowanego podzielono na grupy i wykonano iniekcję znakowanych komórek SW480 i SW620 osobno oraz w połączeniu w różnych stosunkach ilościowych. Wyniki wykazały istotny wpływ komórek wrodzonego układu immunologicznego na przyrost nowotworu. Potwierdzono zróżnicowanie dynamiki rozwoju dwóch różnych linii komórkowych CRC: linia pierwotnego nowotworu okazała się wrażliwsza na procesy hamujące jej rozwój poprzez zwiększoną rekrutację neutrofili i makrofagów, natomiast linia pochodząca z przerzutu wykazała zdolność umiejętnego wymykania się spod nadzoru immunologicznego poprzez modyfikację TME [23]. O wyborze modelu *Danio* pręgowanego zdecydowano ze względu na konserwatywność wrodzonego układu immunologicznego z ludzkim oraz możliwość przeprowadzenia eksperymentu i ukazania dynamiki zmian nowotworowych w krótkim czasie – 4 dni [23].

W 2022 r. opublikowano badanie Wanga i in., w którym wykorzystano model *Danio* pręgowanego do analizy roli długiego niekodującego RNA (ang. *long non-coding RNA*, lncRNA) i ekspresji genów gospodarza małego jąderkowego RNA (ang. *small nucleolar RNA host genes*, SNHG) w rozwoju CRC [26]. Długie niekodujące RNA to grupa transkryptów dłuższych niż 200 nukleotydów, niekodujących białka, ale zaangażowanych w wiele funkcji fizjologicznych, a także procesy związane z progresją nowotworu [27, 28]. Z kolei SNHG to grupa genów, których ekspresja powiązana jest

ze wzmocnionym rozwojem różnych nowotworów, w tym CRC [29]. Jednym z nich jest gen SNHG4, będący przykładem lncRNA o udowodnionym wpływie na proliferację i migrację komórek CRC *in vitro* [30]. Ze względu na potrzebę oceny wpływu SNHG4 na procesy metastatyczne w CRC oraz mechanizmy leżące u ich podstaw *in vivo*, wybrano model *Danio* pręgowanego. W eksperymencie wykorzystano embriony w 2 DPF, cztery ludzkie linie komórkowe CRC (SW480, HCT116, HT29, LoVo) oraz linię prawidłowych komórek nabłonka jelita grubego (ang. *fetal human colon*, FHC), z których ekstrahowano całkowite RNA [26]. Pozyskane RNA poddano odwrotnej transkrypcji na DNA w celu oszacowania poziomu ekspresji SNHG4 w komórkach poszczególnych linii, a następnie wykonano ksenoprzeszczep linii do przestrzeni okołozółtkowej embrionów. Wyniki jednoznacznie sugerują, że ekspresja lncRNA SNHG4 jest wyższa w każdej z testowanych linii CRC w porównaniu z FHC. W celu potwierdzenia uzyskanych wyników zweryfikowano wpływ wyciszenia SNHG4 przez siRNA poprzez wykonanie ksenoprzeszczepu linii HTC116, traktowanej uprzednio si-SNHG4 do embrionu *Danio* pręgowanego. Rezultaty ocenione za pomocą mikroskopii konfokalnej i stereomikroskopii wykazały supresję proliferacji i migracji komórek CRC poprzez siRNA [26].

W badaniu wykazano wiele korzyści płynących z wyboru prostego i szybkiego modelu *Danio rerio* w porównaniu z popularnym modelem mysim. Autorzy wskazują na znaczące ułatwienie prowadzenia obserwacji w sposób przyżyciowy, dzięki przezroczystości powłok ciała osobników w stadium embrionalnym i larwalnym. Wykorzystanie zaawansowanych technologii pozwala na ocenę procesu nowotworzenia toczącego się w organizmie ryby na poziomie pojedynczych komórek, już od najwcześniejszych etapów rozwoju choroby i późniejszej metastazy, co w przypadku modelu mysiego jest niemożliwe. Kolejno, zwrócono uwagę na możliwość jednoczesnej oceny proliferacji i migracji komórek nowotworowych *in vivo* już w ciągu 4 dni od inokulacji, podczas gdy w przypadku modelu mysiego czas ten wydłuża się nawet do 4 tygodni. Jedną z ważnych przyczyn wyboru *Danio* pręgowanego w powyższym badaniu okazała się również sprawdzona skuteczność modelu w badaniu roli lncRNA w przebiegu kancerogenezy. Co istotne, sam poziom zaawansowania procedur wykorzystywanych podczas posługiwania się modelem rybem jest niższy niż poziom analogicznych procesów w modelu mysim – iniekcja do przestrzeni okołozółtkowej *Danio rerio* jest znacznie mniej skomplikowana niż inokulacja do żyły ogonowej myszy [26].

Celem pracy Cruz-Duarte i in. była próba wykrycia nowych biomarkerów oporności na cetuksymab w terapii CRC [31]. Cetuksymab to chimeryczne przeciwciało monoklonalne o udowodnionym działaniu przeciwnowotworowym, stosowane w leczeniu raka jelita grubego. Niestety terapia tym lekiem nie przynosi skutecznych efektów terapeutycznych u wszystkich leczonych pacjentów, ze względu na rozwój oporności w ich organizmach [31, 32]. W większości przypadków CRC rozwój guza warunkuje zaburzenie funkcji receptora naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*, EGFR). Działanie cetuksymabu polega na wiązaniu z EGFR i blokowaniu przyłączenia ligandu, który go aktywuje, co zaburza przekaznictwo sygnałów w komórce. Dodatkowo, cetuksymab działa cytotoksycznie na komórki nowotworowe poprzez aktywację odporności wrodzonej oraz nabytej. Aby zwiększyć jego potencjał terapeutyczny, zdecydowano o próbie zdefiniowania mechanizmów stojących za opornością pacjentów na terapię tym lekiem. Jako jedną z przyczyn wskazano działanie cząsteczki sygnałowej PLC γ 1, aktywującej EGFR. Do wizualizacji postępów terapii oraz biologii guza zastosowano model *Danio* pręgowanego. Znakowaną fluorescencyjnie linię komórkową ludzkiego raka okrężnicy CACO-2 inokulowano do embrionów *Danio rerio* (2 DPF). Następnie, embriony obciążone ksenoprzeszczepem traktowano cetuksymabem przez 72h. Wyniki obejmujące wielkość guza, apoptozę, przerzuty i proliferację komórek porównano z grupą kontrolną przy użyciu mikroskopii konfokalnej. Uzyskane rezultaty sugerują istotny wpływ cząsteczki PLC γ 1 na rozwój guza, zarówno podczas terapii cetuksymabem, jak i bez podjęcia leczenia. Wykazano, że wyższa ekspresja cząsteczki PLC γ 1 koreluje z opornością na cetuksymab – pacjenci poddani działaniu tego leku, posiadający wysoki poziom ekspresji PLC γ 1, wykazują progresję choroby szybszą niż pacjenci z niskimi poziomami badanej cząsteczki sygnałowej [31]. Przeprowadzenie badań *in vivo* na modelu *Danio rerio* umożliwiło wysnucie wniosku, że poziom ekspresji PLC γ 1 może okazać się pomocnym biomarkerem w przewidywaniu oporności na cetuksymab u pacjentów chorujących na CRC. Wykorzystanie *Danio* pręgowanego umożliwiło ocenę zachowania guza, oszacowanie efektywności terapii przeciwnowotworowej oraz opracowanie nowej strategii w leczeniu oporności na cetuksymab u pacjentów [31].

Niezwykle ważnym aspektem wykorzystania modelu *Danio rerio* jest możliwość inokulacji do embrionów ryb ludzkich komórek nowotworowych, pochodzących od chorego pacjenta

(ksenoprzeszczep; zAvatar). Badanie z 2024 r., przeprowadzone przez Costę i in., opiera się na ksenoprzeszczepianiu znakowanych fluorescencyjnie komórek nowotworowych pacjenta, chorującego na CRC, do embrionów Danio pręgowanego w 2 DPF w celu wykonania szybkiego i funkcjonalnego testu terapii *in vivo* oraz późniejszej oceny wpływu wybranej metody leczenia na remisję choroby [33]. Do badań wybrano 55 pacjentów, różniących się między sobą typami, subtypami, mutacjami oraz stadiami rozwojowymi CRC i inokulowano komórki z ich guzów odpowiadającym im modelom rybnym w sposób 1:1 (jeden pacjent = jeden embrion *Danio rerio*). zAvatary traktowano analogicznym leczeniem co odpowiadających im pacjentów. Wyniki eksperymentu dowiodły, że modele ksenoprzeszczepów Danio pręgowanego mogą prognozować odpowiedź kliniczną pacjenta na leczenie. Dowiedziono, że badanie z zastosowaniem zAvatarów w prognozowaniu wrażliwości pacjenta na daną terapię charakteryzuje się specyficznością równą 76% i czułością wynoszącą 91%. Nieocenioną zaletą modelu jest także możliwość obserwacji incydentów mikrometastaz przyżyciowo już 3 dni po ksenoprzeszczepie w całym organizmie zwierzęcia, gdy nie jest jeszcze poddane żadnemu leczeniu. Można zatem wysnuć wniosek, że jeżeli komórki nowotworowe są w stanie rozwinąć mikrometastazy w organizmie ryby, to tym samym powinny również charakteryzować się zdolnością do ucieczki spod nadzoru immunologicznego w organizmie gospodarza. Naukowcy dowiedli, że pacjenci, u których nastąpiła progresja choroby po leczeniu, mieli odpowiadające im zAvatary z większą liczbą mikroprzerzutów niż zAvatary odpowiadające pacjentom bez progresji choroby [33]. Niewątpliwą zaletą wyboru modelu *Danio rerio* jest maksymalne skrócenie czasu trwania eksperymentu – wzrost guza i reakcję na leczenie ocenia się już w ciągu 10 dni. Jest to okienko czasowe, w którym zwykle podejmuje się decyzje kliniczne dotyczące zastosowania danej terapii.

Współcześnie naukowcy skupiają się na doskonaleniu aspektów medycyny celowanej, której celem jest indywidualne dopasowanie terapii do każdego pacjenta. Dzięki powyższym zaletom wykorzystania modelu *Danio rerio* do oceny wpływu danej terapii na stan zdrowia pacjenta, możliwe jest dostosowanie najodpowiedniejszej formy leczenia. Zwiększa to odsetek sukcesów w leczeniu, jednocześnie zmniejszając koszty złe dobranej i włączonej terapii. Można zatem uznać wykorzystanie modelu Danio pręgowanego jako niezwykle korzystne dla rozwoju medycyny spersonalizowanej [33].

Opisane powyżej eksperymenty badawcze zdają się jednoznacznie potwierdzać tezę o użyteczności Danio pręgowanego w diagnostyce ukierunkowanej na CRC. Wysoki stopień podobieństwa genetycznego *Danio rerio* do człowieka pozwala na skuteczną ekstrapolację uzyskanych eksperymentalnie wyników na organizm ludzki. Szczególnie cenny wydaje się kierunek badań związany z rozwojem medycyny celowanej CRC, osiągalny dzięki wysokiej skuteczności ksenoprzeszczepiania materiału z ludzkiego guza do organizmu ryby. Bardzo ważną zaletą opisywanego modelu jest możliwość zgłębiania procesów związanych z wczesnymi etapami metastazy oraz przyżyciowej obserwacji incydentów mikrometastaz. Są to aspekty, których nie zapewnia popularny model myszy, dlatego wprowadzenie do diagnostyki nowotworowej Danio pręgowanego wydaje się skutecznie poszerzać możliwości prowadzenia badań *in vivo*, nie tylko w zakresie CRC, ale też innych nowotworów złośliwych.

Podsumowanie kluczowych aspektów wybranych do niniejszego przeglądu prac badawczych, ukierunkowanych na raka jelita grubego, przedstawiono w tabeli 1.

Czerniak

Zgodnie ze statystyką GLOBOCAN z 2022 r. skórna postać czerniaka zajmuje dopiero 17 miejsce spośród 36 analizowanych podtypów nowotworów, jednak porównując dane dotyczące zachorowalności i śmiertelności ze statystyką z roku 2020, można zaobserwować zarówno wzrost zapadalności, jak i umieralności z powodu tej jednostki chorobowej [1, 2].

Wśród nowotworów wykazujących znaczące podobieństwo histologiczne guzów rozwijających się zarówno w organizmie ludzkim, jak i u *Danio rerio* zwraca się uwagę między innymi na raka prostaty, raka piersi, raka gruczołów ślinowych oraz właśnie czerniaka [21, 34, 35]. Podobnie jak u człowieka, tak i u Danio pręgowanego melanocyty zlokalizowane są w warstwie podstawnej naskórka, a ich rozwój biologiczny przebiega w analogiczny sposób [36]. Fakty te stanowią przyczynę prowadzenia badań *in vivo* mających na celu zwiększanie wiedzy na temat rozwoju, przerzutowości i skutecznego leczenia najgroźniejszego nowotworu skóry, w których wykorzystuje się omawiany model rybi. Przykłady takich badań opisano w kolejnym podrozdziale.

W badaniu opisanym w 2021 r. przez Tobię i in. analizowano użyteczność Danio pręgowanego w poszerzaniu wiedzy na temat procesów metastazy i metod leczenia rzadkiego złośliwego nowotworu, jakim jest czerniak błony

Tabela 1. Podsumowanie kluczowych aspektów wybranych do przeglądu prac badawczych ukierunkowanych na raka jelita grubego.

W kolumnie „Specyfika zastosowanego modelu badawczego” zebrano informacje na temat wykorzystanej w badaniu linii *Danio* przegowanego, linii inokulowanych komórek nowotworowych i zastosowanej metody iniekcji oraz czasu trwania procesu badawczego.

Table 1. Summary of key aspects of the research articles focused on colorectal cancer selected for the review.

The column “Specifics of the research model used” contains information on the zebrafish line used in the study, the line of inoculated cancer cells, the injection method used, and the duration of the research process.

Badanie	Cel badania	Specyfika zastosowanego modelu badawczego	Najważniejsze przyzyny wyboru modelu <i>Danio rerio</i>	Główne wnioski
Tao i in. (2021) [22]	Przyżyciowa ocena skuteczności DOPW-1 w leczeniu CRC przy wykorzystaniu modelu <i>Danio</i> przegowanego.	- linia <i>Danio rerio</i>: AB; - wykorzystana linia komórek nowotworowych: HT-29; - metoda iniekcji komórek nowotworowych: mikroiniekcja do dolnej części żółtka embriionów <i>Danio rerio</i> (2 DPF; -200 komórek/organizm); - czas trwania procesu badawczego: pomiar toksyczności DOPW-1; 2 dni; ocena efektu DOPW-1 na rozwój CRC w modelu heteropreszczepu: 2 dni.	- wysokie zdolności reprodukcyjne modelu rybiego; - transparentność powłok ciała ryb młodocianych; - fizjologiczne i genetyczne podobieństwo <i>Danio rerio</i> do organizmu ludzkiego.	DOPW-1 wykazuje obiecujące przeciwnowotworowe właściwości w eksperymentalnym modelu rybin.
Póvoa i in. (2021) [23]	Ocena roli wrodzonej odpowiedzi immunologicznej w procesie nowotworowej immunoodpły przy wykorzystaniu modelu <i>Danio</i> przegowanego.	- linia <i>Danio rerio</i>: Tg(mpx:EGFP); Tg(mpeg1:mCherry-F); Tg(mpeg1:mCherry-F; tnfa:GFP-F); osobniki z mutacją w genie <i>runx1^{wt/wt}</i>, osobniki z mutacją w genie <i>csf1ra^{Δblue}</i> (panther); Tubingen; Casper; - wykorzystane linie komórek nowotworowych: w badaniu przewodnim SW480, SW620, HT29; - metoda iniekcji komórek nowotworowych: mikroiniekcja do przestrzeni okołozółtkowej embriionów <i>Danio rerio</i> (2 DPF; 500-1000 komórek/embriion); - Czas trwania procesu badawczego: 4 dni od momentu mikroiniekcji komórek nowotworowych.	- maksymalne skrócenie czasu analizy; - konserwatywność struktury ludzkiego i rybiego wrodzonego układu immunologicznego.	Komórki guza pierwotnego CRC reagują i komórki metastatyczne CRC reagują w odmiennym stopniu na procesy hamujące ich rozwój, inicjowane przez wrodzony układ odpornościowy.
Wang i in. (2022) [26]	Analiza roli lncRNA SNHG4 w progresji CRC przy wykorzystaniu modelu <i>Danio</i> przegowanego.	- linia <i>Danio rerio</i>: AB; Tg(fli1a:EGFP); - wykorzystane linie komórek nowotworowych: SW480, HCT116, HT29, LoVo; - metoda iniekcji komórek nowotworowych: mikroiniekcja do przestrzeni okołozółtkowej <i>Danio rerio</i> (2 DPF; -300 komórek/organizm); - czas trwania procesu badawczego: 4 dni od momentu mikroiniekcji komórek nowotworowych.	- maksymalne skrócenie czasu analizy; - transparentność powłok ciała ryb młodocianych; - potwierdzona skuteczność modelu w przyżyciowym obrazowaniu na poziomie pojedynczych komórek; - potwierdzona skuteczność modelu w badaniu roli lncRNA w przebiegu nowotworzenia; - istotne ułatwienie procedur eksperymentalnych w porównaniu do procedur stosowanych w modelu mysim.	Ludzkie linie komórkowe CRC wykazują wyższą ekspresję lncRNA SNHG4 niż prawidłowe komórki nabłonka jelita grubego, przyczyniając się do progresji CRC.
Cruz-Duarte i in. (2022) [31]	Ocena funkcji cząsteczki PLCy1 w nabywaniu oporności na cetuksymab w terapii CRC przy wykorzystaniu modelu <i>Danio</i> przegowanego.	- linia <i>Danio rerio</i>: Casper; Nacre; Tg(fli1:EGFP); - wykorzystane linie komórek nowotworowych: SW48, CACO-2, COLO20DM; LIM1215; - metoda iniekcji komórek nowotworowych: mikroiniekcja do przestrzeni okołozółtkowej <i>Danio rerio</i> (2 DPF); - czas trwania procesu badawczego: 4 dni od momentu mikroiniekcji komórek nowotworowych.	- maksymalne skrócenie czasu analizy; - potwierdzona możliwość zaobserwowania zróżnicowanej odpowiedzi organizmu na terapię cetuksymabem przy wykorzystaniu linii komórkowych i materiału klinicznego.	Nadekspresja PLCy1 dodatnio koreluje z rozwojem oporności na cetuksymab i może służyć jako predykcyjny biomarker lekooporności w przebiegu leczenia CRC.
Costa i in. (2024) [33]	Przedkliniczna ocena skuteczności terapii CRC w przyżyciowym modelu zAvatar, badanie przydatności modelu rybiego w rozwijaniu metod leczenia spersonalizowanego CRC.	- linia <i>Danio rerio</i>: Casper; Nacre; Tg(fli1:EGFP); Tg(mpeg1:mCherry-F); - wykorzystane linie komórek nowotworowych: brak (materiał pobrany z tkanki nowotworowej chorujących pacjentów); - metoda iniekcji komórek nowotworowych: mikroiniekcja do przestrzeni okołozółtkowej <i>Danio rerio</i> (2 DPF); - czas trwania procesu badawczego: 3 dni od momentu mikroiniekcji komórek nowotworowych.	- maksymalne skrócenie czasu analizy; - możliwość analizy potencjału metastatycznego i angiogenego w modelu <i>in vivo</i>.	Modele zAvatar stanowią obiecujące narzędzie eksperymentalne w prognozowaniu odpowiedzi pacjenta na podejmowaną terapię.

naczyniowej oka (ang. *uveal melanoma*, UM). Szacuje się, że u blisko połowy pacjentów rozwija on wariant metastatyczny, co wiąże się ze znaczną umieralnością, nawet w przypadku wczesnego wykrycia i podjęcia leczenia [37–39]. Nietrudno o wniosek, że opracowanie wiarygodnego modelu *in vivo*, który mógłby stanowić platformę do testowania nowych leków, jest konieczne. W niniejszym badaniu podjęto próbę inokulacji czterech linii komórkowych – wysoce metastatycznych mysich linii B16–BL6 oraz B16–LS9, ludzkich komórek czerniaka linii A375M oraz ludzkich komórek UM linii 92.1 – bezpośrednio do rozwijającej się naczyniówki gałki ocznej embrionów *Danio rerio* w 2 DPF. Po uzyskaniu potwierdzenia, że wybrane mikrośrodowisko sprzyja rozwojowi i migracji komórek nowotworowych z miejsca inokulacji, podjęto próbę opracowania ilościowej metody analizy badanych komórek. Aby pokonać dotychczasowe niepowodzenia w tym zakresie, wynikające z niesprzyjającej budowy anatomicznej oka, zaproponowano alternatywną metodę pomiaru ilościowego, w której znakowano komórki linii nowotworowych enzymem lucyferazą i mierzono sygnał generowanej przez nie bioluminescencji. Po otrzymaniu obiecujących rezultatów, przystąpiono do głównej części eksperymentu, w której oceniano aktywność przeciwnowotworową trzech leków (paklitaksel, ewerolimus, panobinostat) w opracowanym modelu rybim. W oparciu o pomiar bioluminescencji, stwierdzono, że najwyższą efektywnością charakteryzuje się bezpośrednia podaż leków do gałek ocznych obciążonych rozwojem nowotworu. Przeprowadzone badania pozwoliły na potwierdzenie, że organizm *Danio rerio* mógłby być odpowiedzią na potrzebę wprowadzenia wiarygodnego modelu *in vivo* do oceny skuteczności nowych leków, nie tylko w terapii UM, ale potencjalnie też innych nowotworów oka oraz nowotworów przerzutuujących do narządu wzroku. Opracowana metoda pomiaru bioluminescencji znakowanych komórek nowotworowych zmniejszyła trudności wynikające z niesprzyjającego oznaczeniom środowiska gałki ocznej, umożliwiając tym samym prowadzenie badań ilościowych nowotworów w standardowym miejscu ich rozwoju w organizmie ludzkim przy użyciu modelu *Danio* przegowanego [37].

Celem kolejnych badań, przeprowadzonych przez Yin i in., było sprawdzenie, czy organizm *Danio* przegowanego może być użytecznym modelem *in vivo* w rozwijaniu metod leczenia spersonalizowanego UM [40]. W tym wypadku postanowiono jednak o ksenotransplantacji komórek pochodzących bezpośrednio od pacjentów

chorujących na tę jednostkę. Autorzy zdecydowali się na popularny sposób inokulacji komórek nowotworowych do przewodu Cuviera, dzięki czemu możliwa była prosta metoda podaży badanych substancji przeciwnowotworowych do środowiska bytowania ryb. Szereg podjętych badań umożliwiło potwierdzenie, że stworzone w warunkach laboratoryjnych kultury sferoidalne, pochodzące z pierwotnych tkanek UM, zachowują właściwości biologiczne melanocytów i skłonności metastatyczne po inokulacji do embrionów *Danio rerio*. W wygenerowanym modelu oceniono efektywność działania dwóch potencjalnych substancji przeciwnowotworowych (nawitoklaks, ewerolimus). Stwierdzono, że zarówno monoterapia, jak i terapia kombinowana wstrzymują nowotworzenie i metastazę, jednak lepsze rezultaty zaobserwowano w przypadku terapii łączonej. Uzyskane wyniki, podobnie jak w opisanym powyżej badaniu Tobia i in., potwierdziły, że *Danio* przegowany mógłby stanowić odpowiedni model do badań *in vivo* nowych leków przeciwnowotworowych. Co więcej, może być on także użyteczny w szacowaniu odpowiedzi pacjenta na spersonalizowane leczenie UM. Zwrócono uwagę, że organizm *Danio rerio* charakteryzuje się większą skutecznością przyjęcia ksenoprzeszczepu UM niż większe zwierzęta laboratoryjne, przede wszystkim ze względu na fakt, że każdy pierwotny rozrost UM w gałce ocznej jest niewielkich rozmiarów i w większych organizmach może zostać wyeliminowany przez układ odpornościowy, który, jak wiadomo, w początkowym etapie życia ryb pozostaje nierozwinięty. Omawiany model wydaje się również obiecujący w obrazowaniu procesów inwazji naczyniowej, ekstrakwasacji i angiogenezy UM, nie tylko ze względu na transparentność embrionów, ale także możliwość wykorzystania modelu transgenicznego, z wyznakowanym fluorescencyjnie układem naczyniowym [40].

W pracy Lu i Patton podjęto próbę sprawdzenia, czy organizm *Danio* przegowanego, o dotychczas potwierdzonej użyteczności w zgłębianiu wiedzy na temat mechanizmów inicjacji i progresji nowotworu oraz opracowywaniu nowych metod terapii czerniaka, mógłby posłużyć w obrazowaniu procesu nabywania oporności w trakcie długotrwałego leczenia [41]. Zdecydowano o wyborze dorosłych, w pełni rozwiniętych osobników, ponieważ prezentują zbliżone do ludzkich mechanizmy oporności wrodzonej i nabytej, a dodatkowo, szlak metabolizmu leków przebiega u nich w sposób analogiczny jak u człowieka. W celu przezwyciężenia trudności wynikającej z nieefektywnej podaży precyzyjnej dawki leku stworzono szczegółową recepturę, służącą opracowaniu nowatorskiego sposobu podaży leku (tutaj:

wemurafenibu) w formie dobrze przyswajalnego granulatu, podawanego do wody i wchłanianego doustnie przez ryby w sposób dobrowolny. Metoda okazała się skuteczna, nieinwazyjna, nietoksyczna i dobrze tolerowana przez dorosłe osobniki, dzięki czemu możliwa stała się ilościowa podaż dziennej dawki wemurafenibu rybom obciążonym podtypem czerniaka z mutacją BRAF V600E. Leczenie kontynuowane przez 10 tygodni pozwoliło na zaobserwowanie regresji choroby z następującą progresją, związaną z nabywaniem oporności na stosowane leczenie, co wydaje się zbieżne z reakcją obserwowaną u pacjentów leczonych przewlekle. Praca dała podłoże dla modelowania zjawiska oporności u *Danio* pręgowanego oraz zgłębiania procesów związanych z jej nabywaniem u pacjentów. Opracowany sposób doustnej, dobrowolnej podaży testowanego leku dorosłym *Danio rerio*, znacząco ułatwia efektywne wykorzystanie tego organizmu w podobnych eksperymentach w przyszłości [41].

W pracy Montal i in. zwrócono uwagę na fakt, że w przypadku płci męskiej czerniak rozwija się z większą częstotliwością u pacjentów otyłych niż szczupłych [42]. Badania nad charakterem tych interakcji prowadzono dotychczas z udziałem myszy, nigdy jednak nie brano w nich pod uwagę wpływu płci. Uznano za konieczne przeprowadzenie analizy, w której wzięto by pod uwagę zależność pomiędzy wszystkimi trzema czynnikami. Zdecydowano o wyborze modelu *Danio* pręgowanego przede wszystkim ze względu na znaczne skrócenie czasu analizy względem wyższych kręgowców oraz łatwość wprowadzenia modyfikacji genetycznej do organizmu. Otyłość o typie trzewnym u ryb wywołano poprzez inicjację nadekspresji białka związanego z Agouti (ang. *Agouti-related protein*, AGRP), odpowiedzialnego za regulację łaknienia, i zauważono, że ten rodzaj manipulacji zwiększa podatność *Danio rerio* na rozwój otyłości po zastosowaniu diety wysokotłuszczowej. W kolejnej fazie badań potwierdzono, że ryby z otyłością nabytą w wyniku nadekspresji AGRP znacznie szybciej niż ryby z grupy kontrolnej rozwijają omawiany nowotwór skóry. Podobnie jak w przypadku ludzi, korelację tego typu spostrzeżono wyłącznie wśród osobników męskich. W ostatnim etapie badań porównano ze sobą dwa genotypy czerniaka. Stwierdzono korelację pomiędzy otyłością a rozwojem czerniaka z mutacją BRAF V600E i p53 w połączeniu z delecją Rb1, nie zaobserwowano natomiast tego typu związku w przypadku połączenia z delecją Pten. Przeprowadzone badania potwierdzają, że interakcje pomiędzy omawianymi czynnikami ustrojowymi a rozwojem czerniaka zależą także od samego genotypu nowotworu. Wieloetapowa analiza zdaje

się popierać tezę, że kluczowe jest kreowanie swoistych platform *in vivo*, które umożliwiłyby jednoczesną analizę wielu aspektów nowotworzenia, pochodzących zarówno z organizmu pacjenta, jak i bezpośrednio od zmiany nowotworowej. Wydaje się, że *Danio* pręgowany może być idealnym kandydatem do prowadzenia tego typu analiz na szeroką skalę [42].

Codolo i in. w swoim badaniu wskazali na pewne cechy komórek czerniakowych, które ułatwiają przebieg procesów związanych z inicjacją nowotworzenia. Zwrócono uwagę na zdolność komórek do produkcji czynników działających supresyjnie na układ odpornościowy człowieka oraz umiejętność rekrutacji do TME komórek immunologicznych, w tym makrofagów, które w najbliższym środowisku guza ulegają modyfikacji, uzyskując aktywność pronowotworową. W niniejszej pracy badano rolę białka *Helicobacter pylori* aktywującego neutrofile (ang. *Helicobacter pylori neutrophil activating protein*, HP-NAP) w przeciwdziałaniu powyższym procesom za pośrednictwem modulacji aktywności makrofagów, które znalazły się pod wpływem TME [43]. Do realizacji celu wybrano model *Danio* pręgowanego ze względu na potwierdzoną skuteczność w badaniach nad nowotworzeniem i układem immunologicznym. Zwrócono uwagę także na wysokie podobieństwo struktury układu odporności wrodzonej w organizmie *Danio rerio* i człowieka. W początkowej fazie badań, larwom *Danio* pręgowanego inokulowano ludzkie komórki linii nowotworowej czerniaka. W 4 DPF ryby w grupie badanej poddano działaniu HP-NAP. Po upływie 5 dni zaobserwowano zmniejszoną masę guza u larw, redukcję liczby ognisk metastatycznych oraz wzrost przeżywalności względem grupy kontrolnej. Szereg badań *in vitro* umożliwił wysnucie wniosku, że aktywność HP-NAP *in vivo* nie jest oparta na bezpośrednim działaniu na komórki czerniaka, dlatego w drugiej części eksperymentu wykorzystano linię *Danio* pręgowanego Tg(mpeg1:eGFP)gI22, cechującą się fluorescencyjnym wyznakowaniem makrofagów, w celu zbadania wpływu HP-NAP na aktywność fagocytów. W grupie larw ekspozowanej na białko bakteryjne zauważono wzmożoną rekrutację makrofagów do miejsca inokulacji komórek czerniaka oraz tendencję fagocytów do działań antykancerogennych, a ekspresja cytokin prozapalnych na ich powierzchni okazała się znacznie wyższa niż na komórkach z grupy kontrolnej. W ten sposób udowodniono, że bezpośrednim celem HP-NAP są właśnie makrofagi oraz że analizowane białko jest zdolne do hamowania rozwoju guza poprzez przywrócenie przeciwnowotworowej aktywności fagocytów, nawet

przy braku pełnej odporności. To potwierdza, że HP-NAP posiada potencjał w terapii przerzutującego czerniaka. Przeprowadzenie tego typu badań byłoby niemożliwe bez organizmu cechującego się opóźnionym rozwojem mechanizmów odporności nabytej. Analiza działania HP-NAP z wykorzystaniem larw *Danio* pręgowanego umożliwiła ocenę wpływu białka na elementy odporności wrodzonej, w sytuacji upośledzonej aktywności limfocytów. Nie bez znaczenia pozostaje możliwość wykorzystania transgenicznej linii *Danio rerio*, z wyznakowaną linią makrofagów, co znacząco ułatwia wizualizację wyników *in vivo* w czasie rzeczywistym [43].

Wykorzystanie *Danio* pręgowanego w omówionych pracach, związanych ze zgłębianiem procesów leżących u podstaw rozwoju, metastazy i terapii czerniaka, niosło ze sobą wiele niepodważalnych korzyści. Omawiany organizm modelowy okazał się dobrym wyborem zarówno w przypadku badań „klasycznej” postaci czerniaka, jak i podtypu UM. *Danio rerio*, dzięki wspomnianemu niskiemu odsetkowi odrzuceń ksenoprzeszczepów, również tych o niewielkich rozmiarach, wykazuje dużo wyższą skuteczność modelowania nowotworów gałki ocznej niż wyższe kręgowce. W opisanych badaniach nad czerniakiem czerpie się korzyści wynikające z takich cech *Danio rerio* jak: niejednoczesne dojrzewanie mechanizmów wrodzonej i nabytej odporności, łatwość wprowadzania manipulacji genetycznych oraz możliwość wykorzystywania linii transgenicznych, o właściwościach ułatwiających przyżyciową wizualizację. Bardzo cenna wydaje się możliwość wykorzystania *Danio* pręgowanego jako platformy do badań nowych substancji terapeutycznych oraz szacowania skuteczności terapii spersonalizowanych, niezbędnych do efektywnego leczenia najgroźniejszego nowotworu skóry, jakim jest czerniak.

Podsumowanie kluczowych aspektów wybranych do niniejszego przeglądu prac badawczych, ukierunkowanych na czerniaka, przedstawiono w tabeli 2.

WNIOSKI

Celem niniejszej pracy był przegląd systematyczny publikacji naukowych, w których posłużono się modelem zwierzęcym *Danio* pręgowanego w badaniach przedklinicznych dotyczących raka jelita grubego oraz czerniaka. Na podstawie przedstawionych informacji oszacowano możliwości wykorzystania organizmu w realizacji prac badawczych ukierunkowanych na proces nowotworzenia i uznano, że *Danio rerio*, dzięki unikalnemu zestawowi cech, stanowi obiecującą

platformę eksperymentalną, umożliwiającą wykonywanie czynności, które przy użyciu innych popularnych modeli przyżyciowych byłyby utrudnione lub wręcz niemożliwe.

Zebrane i przedstawione powyżej opracowania wybranych publikacji naukowych uwidaczniają szerokie spektrum zastosowania modelu rybiego w testowaniu nowych substancji terapeutycznych [22, 37], w tym także, co bardzo istotne, w rozwoju metod leczenia spersonalizowanego. Do podobnych wniosków doszli Al-Hamaly i in., opisując model *Danio rerio* jako stosunkowo prostą, szybką i skuteczną platformę do prowadzenia badań farmakologicznych, w tym także zgłębiania aspektów terapii celowanej [44]. Badania tego typu oparte są na ksenoprzeszczepianiu materiału pochodzącego bezpośrednio z tkanki nowotworowej chorującego pacjenta do organizmu *Danio* pręgowanego i późniejszym wyborze najsukieczniejszej opcji leczenia. Proces ten cechuje wysoka efektywność, przede wszystkim dzięki opóźnieniu dojrzewania mechanizmów odporności nabytej u młodocianej ryby, a także możliwości uzyskania funkcjonalnego przeszczepu nawet z tkanki o bardzo małej objętości, co w przypadku wyższych kręgowców jest zazwyczaj niewykonalne [33, 40]. Współczesne osiągnięcia w zakresie wykorzystania *Danio* pręgowanego w rozwoju terapii celowanej mogą w przyszłości okazać się przełomowe.

Danio rerio z sukcesem zastosowano do scharakteryzowania procesu nabywania oporności w przebiegu długotrwałego leczenia, rutynowo stosowanego w terapii onkologicznej. Wykorzystane w badaniu dorosłe osobniki cechują się pełną immunokompetentnością i analogicznym metabolizmem leków względem człowieka, stanowią więc model potencjalnie wysoce zbliżony do organizmu ludzkiego [31, 41]. Fazio i in. w swojej pracy także analizowali perspektywy i ograniczenia zastosowania modelu rybiego w prognozowaniu oporności na podejmowane leczenie i wykazali, że *Danio* pręgowany może być bardziej przydatny w predykcji oporności pierwotnej niż wtórnej [45]. W badaniach przedklinicznych z udziałem *Danio* pręgowanego poszukuje się również nowych biomarkerów związanych z nabywaniem oporności na wybraną metodę leczenia oraz testuje się rozwiązania mogące zapobiegać podobnym przypadkom [31]. Na przydatność modelu rybiego w poszukiwaniu nowych biomarkerów prognostycznych i ustalaniu ich roli w przebiegu nowotworzenia zwrócili uwagę Sajjad i in., nie ukierunkowując jednak swoich rozważań na zjawisko nabywania oporności [12].

W pracach badawczych dotyczących nowotworzenia powszechnie korzysta się z właściwości

Tabela 2. Podsumowanie kluczowych aspektów wybranych do przeglądu prac badawczych ukierunkowanych na czerniaka.

W kolumnie „Specyfika zastosowanego modelu badawczego” zebrano informacje na temat wykorzystanej w badaniu linii Danio przegowanego, linii inokulowanych komórek nowotworowych i zastosowanej metody iniekcji oraz czasu trwania procesu badawczego.

Tabela 2. Summary of key aspects of the research articles focused on colorectal cancer selected for the review.

The column “Specifics of the research model used” contains information on the zebrafish line used in the study, the line of inoculated cancer cells, the injection method used, and the duration of the research process.

Badanie	Cel badania	Specyfika zastosowanego modelu badawczego	Najważniejsze przyczyny wyboru modelu <i>Danio rerio</i>	Główne wnioski
Tobia i in. (2021) [37]	Badanie skuteczności modelu <i>Danio przegowanego</i> w analizie procesów metastatycznych i ocenie aktywności przeciwnowotworowej leków w terapii UM.	- linia <i>Danio rerio</i>: Tg(krlf:EGFP) - Wykorzystane linie komórek nowotworowych: B16–BL6, B16–LS9, A375M, 92.1; - metoda iniekcji: komórek nowotworowych: mikroiniekcja do gałki ocznej (2 DPF, 100 komórek/embrion); - czas trwania procesu badawczego: 4 dni od momentu mikroiniekcji komórek nowotworowych.	- potwierdzona skuteczność modelu w przyżyciowym obrazowaniu procesów nowotworowych (progresji, angiogenezy, formowania ognisk metastatycznych) na poziomie pojedynczych komórek; - możliwość analizy procesów nowotworowych w różnych lokalizacjach anatomicznych.	Model rybi posiada cechy wiarygodnego modelu <i>in vivo</i> w ocenie skuteczności nowych terapii UM i innych nowotworów zlokalizowanych w gałce ocznej.
Yin i in. (2023) [40]	Ocena przydatności modelu rybiego w rozwijaniu metod leczenia spersonalizowanego UM.	- linia <i>Danio rerio</i>: Tg(fli:GFP); <i>Casper</i>; - wykorzystane linie komórek nowotworowych: brak (materiał pobrany z tkanki nowotworowej chorujących pacjentów); - metoda iniekcji: komórek nowotworowych: mikroiniekcja do tylnej części przewodu Cuviera od strony grzbietowej (300–500 komórek/larwa po dechoriacji); - czas trwania procesu badawczego: 5 dni od momentu mikroiniekcji komórek nowotworowych.	- potwierdzona skuteczność modelu w utrzymaniu ksenoprzeszczepu niewielkich rozmiarów; - brak rozwinętych mechanizmów odporności nabytej we wczesnych stadiach rozwoju <i>Danio rerio</i>; - wysoka skuteczność przyżyciowego obrazowania procesów inwazji naczyniowej, ekstraswacji i angiogenezy UM.	Danio przegowany jest skutecznym modelem przyżyciowym w analizie nowych leków przeciwnowotworowych i szacowaniu odpowiedzi pacjenta na leczenie spersonalizowane.
Lu, Patton (2022) [41]	Badanie skuteczności modelu rybiego w obrazowaniu procesu nabywania oporności w przebiegu długotrwałego leczenia.	- linia <i>Danio rerio</i>: osobniki z mutacją p53^{M246L}, osobniki z mutacją mitfa–BRAP^{W00E}; - wykorzystane linie komórek nowotworowych: brak (nowotworzenie zainicjowane na drodze mutacji genetycznej); - metoda iniekcji: komórek nowotworowych: nie dotyczy (nowotworzenie zainicjowane na drodze mutacji genetycznej); - czas trwania procesu badawczego: 10 tygodni.	zbliżone mechanizmy odporności wrodzonej i nabytej oraz analogiczny szlak metabolizmu leków u dorosłych <i>Danio przegowanego</i> i w organizmie człowieka.	Dorosły organizm <i>Danio przegowanego</i> stanowi obiecujący model do obrazowania procesu nabywania oporności w przebiegu długotrwałej terapii przeciwnowotworowej.
Montal i in. (2023) [42]	Ocena wzrostu częstotliwości występowania czerniaka u osobników otyłych płci męskiej przy wykorzystaniu modelu <i>Danio przegowanego</i> .	- linia <i>Danio rerio</i>: <i>Casper</i> (mitfa:BRAP^{W00E}, p53^{+/+}, mitfa^{+/+}, mpv17^{+/+}); Tg(3.5ubb:pln2–tdTomato); Tg(–3.5ubb:zAgRP1–2A–EGFP); <i>Casper</i> Tg(3.5ubb:pln2–tdTomato, –3.5ubb:zAgRP1–2A–EGFP); <i>Casper</i>; - wykorzystane linie komórek nowotworowych: brak (nowotworzenie zainicjowane na drodze mutacji genetycznej); - metoda iniekcji: komórek nowotworowych: nie dotyczy (nowotworzenie zainicjowane na drodze mutacji genetycznej); - MiniCoopR, TEAZ); - czas trwania procesu badawczego: 6 miesięcy.	- maksymalne skrócenie czasu analizy; - łatwość wprowadzania różnego rodzaju manipulacji genetycznych do genomu <i>Danio rerio</i> – możliwość wykorzystania transgenicznego linii <i>Danio rerio</i> o cechach korzystnych z punktu widzenia planowanego badania.	Istnieje dodatnia korelacja między występowaniem omawianych czynników ustrojowych a wzrostem podatności na rozwój czerniaka. Opisane interakcje zależą także od genotypu samego nowotworu.
Codolo i in. (2022) [43]	Ocena roli HP–NAP w przeciwdziałaniu procesom modulacji funkcji komórek immunologicznych w obrębie TME.	- linia <i>Danio rerio</i>: Tubingen; Tg(mpeg1:eGFP)g22; - wykorzystane linie komórek nowotworowych: M121224, RPM1–7951, A375; - metoda iniekcji: komórek nowotworowych: mikroiniekcja do żółtka (~50 komórek/embrion); - czas trwania procesu badawczego: 7 dni od momentu mikroiniekcji komórek nowotworowych.	- potwierdzona skuteczność modelu rybiego w badaniach nad nowotworzeniem i układem immunologicznym; - konserwatywność struktury ludzkiego i rybiego wrodzonego układu immunologicznego; - brak rozwinętych mechanizmów odporności nabytej we wczesnych stadiach rozwoju <i>Danio rerio</i>; - możliwość wykorzystania transgenicznego linii <i>Danio rerio</i> o cechach korzystnych z punktu widzenia planowanego badania.	HP–NAP posiada potencjał terapeutyczny w leczeniu przerzutu czerniaka, działając poprzez przywrócenie aktywności fagocytyzującej makrofagom, których funkcja uległa modyfikacji w obrębie TME.

Danio pręgowanego, jaką jest niejednoczesne dojrzewanie mechanizmów odporności wrodzonej oraz nabytej. Cecha ta daje sposobność prowadzenia badań ukierunkowanych na obserwację zjawiska modulacji funkcji komórek immunologicznych w obrębie TME, oszacowania możliwości odwracania tego procesu, a także oceny roli odporności swoistej w procesie nowotworowej immunoedycji. W publikacjach podkreśla się wysoką konserwatywność odporności wrodzonej pomiędzy organizmem ludzkim i rybem [23, 43]. Potwierdzenie dla powyższych spostrzeżeń można znaleźć w pracy Chen i in., w której wyszczególniono wiele zalet płynących z wykorzystania modelu *Danio rerio* w badaniach nad TME [20].

Omawiany model zwierzęcy znalazł również zastosowanie w ocenie wpływu różnych czynników ryzyka na rozwój nowotworzenia. Jako przyczynę wyboru *Danio rerio* w tego rodzaju badaniach wskazano maksymalne skrócenie czasu analizy oraz łatwość wprowadzania manipulacji genetycznych, co umożliwia prowadzenie przyżyciowej obserwacji i wizualizację wyników [42]. Wykazano także skuteczność modelu w badaniu roli lncRNA oraz SNHG w progresji nowotworzenia [26]. Temat ten został szeroko opisany w pracy Hu i in., którzy na podstawie przytoczonych źródeł literaturowych potwierdzili słuszność zastosowania *Danio pręgowanego* w badaniach ukierunkowanych na analizę funkcji lncRNA, biorących udział w progresji nowotworzenia [34].

Wszystkie przedstawione w niniejszej pracy cechy *Danio pręgowanego* oraz wybrane i opisane badania związane z kancerogenezą i procesami pokrewnymi, wydają się jednoznacznie potwierdzać użyteczność modelu rybiego w onkologii eksperymentalnej i wprost tłumaczyć coraz powszechniejsze zainteresowanie omawianym organizmem laboratoryjnym w sferze badań przedklinicznych.

Ograniczenia analizy

W trakcie omawiania kluczowych wniosków z przytoczonych badań, autorzy preferencyjnie zwrócili uwagę na rezultaty pozytywne, które są istotne z punktu widzenia obranego celu, jakim było zobrazowanie spektrum możliwości modelu *Danio pręgowanego* w badaniach nad nowotworzeniem. Aby zachować obiektywność oceny, należy jednoznacznie stwierdzić, że model rybi, jak każdy inny model wykorzystywany w badaniach przedklinicznych, posiada nie tylko zalety, ale również wady. Kobar i in. wskazują na umiarkowaną wartość predykcyjną i translacyjną modelu *Danio pręgowanego* [46]. Yin i in. podkreślają, że w przypadku zastosowania modelu rybiego, testowane ksenobiotyki są zazwyczaj wprowadzane bezpośrednio do środowiska wodnego, w którym funkcjonują organizmy

Tabela 3. Ocena ryzyka błędów systematycznego w wybranych do przeglądu pracach badawczych ukierunkowanych na raka jelita grubego.

Table 3. Assessment of the risk of bias in selected research studies focused on colorectal cancer.

Badanie	Randomizacja i zaślepienie prób	Błąd utraty/wykluczenia	Kompletność raportowania	Ograniczenia analizy wskazane przez autorów pracy
Tao i in. (2021) [22]	- informacja na temat randomizacji grup ujęta w rozdziale „Materials and methods”; - brak informacji na temat zaślepienia prób.	- przedstawiono przejrzyste dane dotyczące liczebności grup badanych i kontrolnych; - nie zamieszczono informacji na temat liczby zwierząt zmarłych w przebiegu eksperymentu.	- zamieszczono informacje dot. zgody komisji etycznej na przeprowadzenie badań; - zamieszczono kompletne informacje dot. przeprowadzonej analizy statystycznej; - ujęto informacje dot. uzyskania wyników nieistotnych statystycznie; - omówiono potencjalne przyczyny niespójności wyników względem rezultatów uzyskanych w innych pracach badawczych.	Podkreślono konieczność potwierdzenia uzyskanych wyników, ze względu na występujące niespójności względem rezultatów uzyskanych w innych pracach badawczych.
Póvoa i in. (2021) [23]	- informacja na temat randomizacji grup ujęta w rozdziale „Methods”; - brak informacji na temat zaślepienia prób.	- liczebność osobników na poszczególnych etapach eksperymentu jest wskazana w podpisach do rycin; - nie zamieszczono informacji na temat liczby zwierząt zmarłych w przebiegu eksperymentu	- zamieszczono informacje dot. zgody komisji etycznej na przeprowadzenie badań; - zamieszczono kompletne informacje dot. przeprowadzonej analizy statystycznej; - odniesiono uzyskane wyniki do rezultatów uzyskanych w innych pracach badawczych	Nie wskazano.

Tabela 3. Ocena ryzyka błędu systematycznego w wybranych do przeglądu pracach badawczych ukierunkowanych na raka jelita grubego (cd.).
Table 3. Assessment of the risk of bias in selected research studies focused on colorectal cancer (cont.).

Badanie	Randomizacja i zaślepienie prób	Błąd utraty/wykluczenia	Kompletność raportowania	Ograniczenia analizy wskazane przez autorów pracy
Wang i in. (2022) [26]	- brak informacji na temat randomizacji ujęta - brak informacji na temat zaślepienia prób.	- liczebność osobników na poszczególnych etapach eksperymentu jest wskazana w podpisach do rycin; - nie zamieszczono informacji na temat liczby zwierząt zmarłych w przebiegu eksperymentu.	- zamieszczono informacje dot. licencji na przeprowadzenie badań i zgodności z wytycznymi dot. poprawności etycznej; - zamieszczono kompletne informacje dot. przeprowadzonej analizy statystycznej; - odniesiono uzyskane wyniki do rezultatów uzyskanych w innych źródłach (bazy danych, prace badawcze)	W przebiegu badania nie zauważono zmian w obrębie układu naczyniowego (za przyczynę wskazano niewystarczającą ilość precyzyjnych danych).
Cruz-Duarte i in. (2022) [31]	- informacja na temat zastosowanych metod randomizacji ujęta w rozdziale „Materials and Methods”; - informacja na temat zastosowanych metod zaślepienia ujęta w rozdziale „Materials and Methods”.	- liczebność osobników na poszczególnych etapach eksperymentu jest wskazana na rycinach; - nie zamieszczono informacji na temat liczby zwierząt zmarłych w przebiegu eksperymentu.	- zamieszczono informacje dot. zgody komisji etycznych na przeprowadzenie badań, zgody pacjentów na wykorzystanie materiału do badań oraz zgodności z wytycznymi dot. poprawności etycznej; - przedstawiono szczegółowe informacje na temat zasad włączenia i wyłączenia prób do badań; - zamieszczono kompletne informacje dot. przeprowadzonej analizy statystycznej; - odniesiono uzyskane wyniki do rezultatów uzyskanych w innych źródłach (bazy danych, prace badawcze); - ujęto informacje dot. uzyskania wyników nieistotnych statystycznie.	Nie wskazano.
Costa i in. (2024) [33]	- informacja na temat zastosowanych metod randomizacji ujęta w rozdziale „Methods”; - informacja na temat zastosowanych metod zaślepienia ujęta w rozdziałach „Results” i „Methods”.	- przedstawiono przejrzyste dane dotyczące liczebności osobników w eksperymentach; - oszacowano wskaźnik technicznej skuteczności inicjacji nowotworzenia u zAwtarów (70%) i wskazano przyczynę niepowodzeń (zbyt mała objętość materiału ludzkiego do inicjacji nowotworzenia, nekroza komórek w próbie badanej, śmierć zAwtarów w przebiegu badania); - przedstawiono bezpośrednią wartość predykcyjną dodatnią i predykcyjną ujemną badanego modelu, czułość i swoistość przeprowadzonego badania.	- zamieszczono informacje dot. zgody komisji etycznej na przeprowadzenie badań; - przedstawiono szczegółowe informacje na temat zasad włączenia i wyłączenia prób do badań; - zamieszczono kompletne informacje dot. przeprowadzonej analizy statystycznej; - omówiono potencjalne przyczyny uzyskania wyników niespójnych i wątpliwych.	Podkreślono, że ze względu na ograniczoną objętość materiału badanego, większość prób eksperymentalnych przeprowadzono jednokrotnie, bez powtórzeń – nieznaną powtarzalność uzyskanych wyników.

Kolumna „Błąd utraty/wykluczenia” zawiera informacje dotyczące wielkości grup badanych i kontrolnych, liczby zwierząt, które padły podczas eksperymentu, dane statystyczne, takie jak czułość, swoistość, wartość predykcyjna dodatnia, wartość predykcyjna ujemna, liczba powtórzeń każdego etapu eksperymentu. Kolumna „Kompletność raportowania” zawiera dane dotyczące zgody komisji etycznej na przeprowadzenie badań, kompletności informacji na temat analizy statystycznej, wyników nieistotnych statystycznie, porównania uzyskanych wyników z wynikami innych artykułów badawczych o podobnej tematyce, kompletności informacji na temat kryteriów włączenia i wyłączenia, komentarza na temat trudności metodologicznych napotkanych podczas analizy wraz z metodami zastosowanymi w celu ograniczenia ich wpływu na analizę oraz omówienia przyczyn uzyskania wyników negatywnych, które są niespójne z innymi źródłami lub budzą wątpliwości z analitycznego punktu widzenia. Brak któregośkolwiek z powyższych elementów oznacza, że kwestia ta nie została omówiona w artykule.

The “Attrition bias” column contains information on the size of the tested and control groups, the number of animals that died during the experiment, statistical data such as sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, and the number of repetitions of each stage of the experiment. The “Reporting completeness” column contains data on the ethical committee’s approval to conduct the research, the completeness of information on statistical analysis, statistically insignificant results, comparison of the results obtained with the results of other research articles on similar topics, the completeness of information on inclusion and exclusion criteria, comments on methodological difficulties encountered during the analysis, along with the methods used to limit their impact on the analysis, and a discussion of the reasons for obtaining negative results that are inconsistent with other sources or raise doubts from an analytical point of view. The absence of any of the above elements means that the issue has not been discussed in the article.

badawcze. Technika ta utrudnia ocenę procesów farmakokinetycznych i farmakodynamicznych badanej substancji oraz ogranicza możliwość oszacowania ilościowej dawki przyjętej przez rybę. Rozwiązaniem tej trudności może być wybór metody mikroiniekcyjnej, celem wprowadzenia ksenobiotyku wprost do układu naczyniowego ryby, jest to jednak procedura istotnie bardziej inwazyjna [40]. Chen i in. zwracają uwagę na inne ograniczenia modelu rybiego, związane bezpośrednio z badaniami ukierunkowanymi na nowotworzenie, między innymi na wysoką śmiertelność ryb po inokulacji komórek nowotworowych oraz różnicę w temperaturze ciała *Danio rerio* i ludzi, negatywnie wpływającą na utrzymanie heteroprzeszczepu [20]. Za główne ograniczenie modelu rybiego w zakresie onkologii eksperymentalnej, Adhish i Manjubala uważają fakt, że genetyczne modele nowotworzenia u *Danio* przegowanego często są tworzone na drodze mutacji typu *knockout*, podczas gdy w przebiegu kancerogenezy u człowieka znacznie częściej występują mutacje missensowne, związane ze zmianą funkcji, a nie całkowitym wyciszeniem poszczególnych białek. Zjawisko to utrudnia badanie interakcji białkowych oraz genetycznych podstaw chorób nowotworowych [15].

Autorzy oryginalnych prac badawczych kładą nacisk na wyniki pozytywne, istotne klinicznie i statystycznie, co jest powszechną i w pełni zrozumiałą praktyką, ale, w przypadku braku wyników neutralnych lub negatywnych, może budzić podejrzenia dotyczące wybiórczego raportowania. W celu oszacowania wiarygodności przeanalizowano ryzyko błędu systematycznego w wybranych do przeglądu pracach badawczych, ukierunkowanych na raka jelita grubego i czerniaka (tabela 3, tabela 4). Wyselekcjonowano cztery kategorie oceny: randomizację i zaślepienie prób, błąd utraty/ wykluczenia, ograniczenia analizy wskazane przez autorów poszczególnych publikacji oraz kompletność raportowania, priorytetową w przypadku podejrzenia raportowania wybiórczego. W tym obszarze, za szczególnie istotne uznano przedstawienie przejrzystych informacji na temat trudności metodologicznych napotkanych w czasie prowadzenia badań, uzyskania wyników nieistotnych statystycznie, niespójnych z innymi źródłami, wątpliwych lub negatywnych, a także możliwych przyczyn ich uzyskania. Otwarte oświadczenie w tym zakresie uznano za kluczowe

Tabela 4. Ocena ryzyka błędu systematycznego w wybranych do przeglądu pracach badawczych ukierunkowanych na czerniaka.

Table 4. Assessment of the risk of bias in selected research studies focused on melanoma.

Badanie	Randomizacja i zaślepienie prób	Błąd utraty/wykluczenia	Kompletność raportowania	Ograniczenia analizy wskazane przez autorów pracy
Tobia i in. (2021) [37]	- brak informacji na temat randomizacji prób; - brak informacji na temat zaślepienia prób.	- liczebność osobników na poszczególnych etapach eksperymentu jest wskazana w podpisach do rycin; - liczba powtórzeń poszczególnych etapów eksperymentu jest wskazana w podpisach do rycin; - nie zamieszczono informacji na temat liczby zwierząt zmarłych w przebiegu eksperymentu.	- zamieszczono kompletne informacje dot. przeprowadzonej analizy statystycznej; - odniesiono się do trudności i niepowodzeń napotkanych w przebiegu analizy (obrazowanie, analiza ilościowa) i omówiono metody zastosowane w celu ich ograniczenia; - ujęto informacje dot. uzyskania wyników nieistotnych statystycznie; - omówiono potencjalne przyczyny uzyskania wyników negatywnych; - odniesiono uzyskane wyniki do rezultatów uzyskanych w innych pracach badawczych.	Podkreślono konieczność przeprowadzenia dodatkowych badań dot. oceny skuteczności inhibitorów deacetylazy histonowej w leczeniu UM.
Yin i in. (2023) [40]	- informacja na temat zastosowanych metod randomizacji ujęta w rozdziale „Materials and Methods”; - brak informacji na temat zaślepienia prób.	- przedstawiono przejrzyste dane dot. liczebności osobników na każdym etapie eksperymentu; - przedstawiono przejrzyste dane dot. liczby powtórzeń poszczególnych etapów eksperymentu; - nie zamieszczono informacji na temat liczby zwierząt zmarłych w przebiegu eksperymentu.	- zamieszczono informacje dot. licencji i zgody komisji etycznej na przeprowadzenie badań; - zamieszczono kompletne informacje dot. przeprowadzonej analizy statystycznej; - odniesiono się do trudności napotkanych w przebiegu analizy i omówiono metody zastosowane w celu ich ograniczenia (eliminacja artefaktów pochodzących od zastosowanego barwnika fluorescencyjnego); - odniesiono uzyskane wyniki do rezultatów uzyskanych w innych pracach badawczych.	Podkreślono trudności związane z wyborem <i>Danio</i> przegowanego jako modelu zwierzęcego (różnice w sposobie podaży leku – trudność dokładnej oceny dawkiowania, różnice farmakokinetyczne i farmakodynamiczne między organizmem ludzkim, mysim i rybami).

Tabela 4. Ocena ryzyka błędu systematycznego w wybranych do przeglądu pracach badawczych ukierunkowanych na czerniaka (cd.).
Table 4. Assessment of the risk of bias in selected research studies focused on melanoma. (cont.).

Badanie	Randomizacja i zaślepienie prób	Błąd utraty/wykluczenia	Kompletność raportowania	Ograniczenia analizy wskazane przez autorów pracy
Lu, Patton (2022) [41]	- brak informacji na temat randomizacji prób; - brak informacji na temat zaślepienia prób.	- liczebność osobników na poszczególnych etapach eksperymentu jest wskazana w podpisach do rycin; - nie zamieszczono informacji na temat liczby zwierząt zmarłych w przebiegu eksperymentu.	- zamieszczono informacje dot. licencji i zgody komisji etycznej na przeprowadzenie badań; - informacje dot. przeprowadzonej analizy statystycznej przedstawiono w podpisie do dedykowanej ryciny; - odniesiono uzyskane wyniki do rezultatów uzyskanych w innych pracach badawczych; - ujęto informacje dot. uzyskania wyników nieistotnych statystycznie (w przytoczonym przypadku uzyskanie takich wyników było korzystne z punktu widzenia analizy).	Nie wskazano.
Montali i in. (2023) [42]	- brak informacji na temat randomizacji prób; - brak informacji na temat zaślepienia prób.	- liczebność osobników na poszczególnych etapach eksperymentu jest wskazana w podpisach do rycin; - przedstawiono przejrzyste dane dot. liczby powtórzeń eksperymentu; - nie zamieszczono informacji na temat liczby zwierząt zmarłych w przebiegu eksperymentu.	- zamieszczono informacje dot. zgody Komisji ds. opieki nad zwierzętami i ich wykorzystywania w badaniach naukowych na przeprowadzenie badania; - zamieszczono kompletne informacje dot. przeprowadzonej analizy statystycznej; - ujęto informacje dot. uzyskania wyników nieistotnych statystycznie; - omówiono potencjalne przyczyny uzyskania wyników o nieznanej istotności klinicznej; - odniesiono uzyskane wyniki do rezultatów uzyskanych w innych pracach badawczych; - odniesiono się do trudności i niepowodzeń napotkanych w przebiegu analizy i omówiono metody zastosowane w celu ich ograniczenia (wykorzystanie techniki TEAZ).	Zwrócono uwagę, że zastosowany model nie odzwierciedla wszystkich fenotypów otępiłości występujących u człowieka; zauważono, że nie wszystkie parametry otępiłości są zbliżone u samców i samic; podkreślono nieznany wpływ mutacji genu <i>mpv17</i> na rozwój otępiłości.
Codolo i in. (2022) [43]	- brak informacji na temat randomizacji prób; - brak informacji na temat zaślepienia prób.	- liczebność osobników na poszczególnych etapach eksperymentu jest wskazana w podpisach do rycin; - przedstawiono przejrzyste dane dot. liczby powtórzeń poszczególnych etapów eksperymentu; - przedstawiono dane dot. przeżywalności osobników w przebiegu poszczególnych etapów eksperymentu.	- zamieszczono informacje dot. zgody komisji etycznej na przeprowadzenie badań oraz zgodności z wytycznymi dot. poprawności etycznej; - zamieszczono kompletne informacje dot. przeprowadzonej analizy statystycznej; - odniesiono uzyskane wyniki do rezultatów uzyskanych w innych pracach badawczych.	Nie wskazano.

Kolumna „Błąd utraty/wykluczenia” zawiera informacje dotyczące wielkości grup badanych i kontrolnych, liczby zwierząt, które padły podczas eksperymentu, dane statystyczne, takie jak czułość, swoistość, wartość predykcyjna dodatnia, wartość predykcyjna ujemna, liczba powtórzeń każdego etapu eksperymentu. Kolumna „Kompletność raportowania” zawiera dane dotyczące zgody komisji etycznej na przeprowadzenie badań, kompletności informacji na temat analizy statystycznej, wyników nieistotnych statystycznie, porównania uzyskanych wyników z wynikami innych artykułów badawczych o podobnej tematyce, kompletności informacji na temat kryteriów włączenia i wyłączenia, komentarza na temat trudności metodologicznych napotkanych podczas analizy wraz z metodami zastosowanymi w celu ograniczenia ich wpływu na analizę oraz omówienia przyczyn uzyskania wyników negatywnych, które są niespójne z innymi źródłami lub budzą wątpliwości z analitycznego punktu widzenia. Brak któregośkolwiek z powyższych elementów oznacza, że kwestia ta nie została omówiona w artykule.

The “Attrition bias” column contains information on the size of the tested and control groups, the number of animals that died during the experiment, statistical data such as sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, and the number of repetitions of each stage of the experiment. The “Reporting completeness” column contains data on the ethical committee’s approval to conduct the research, the completeness of information on statistical analysis, statistically insignificant results, comparison of the results obtained with the results of other research articles on similar topics, the completeness of information on inclusion and exclusion criteria, comments on methodological difficulties encountered during the analysis, along with the methods used to limit their impact on the analysis, and a discussion of the reasons for obtaining negative results that are inconsistent with other sources or raise doubts from an analytical point of view. The absence of any of the above elements means that the issue has not been discussed in the article.

w potwierdzeniu kompletności raportowania. Za dodatkowy dowód może posłużyć ostatnia kolumna **tabel 3 i 4**, zawierająca dane na temat ograniczeń metodologicznych, wskazanych przez samych autorów prac, ponieważ ich podkreślenie świadczy bezpośrednio o obiektywności wnioskowania. Szczegółowe informacje na temat przeprowadzonej analizy błędów systematycznych zamieszczono w **tabelach 3 i 4**.

W pracach badawczych zebranych w niniejszym przeglądzie uwagę zwraca znaczna heterogeniczność metodologiczna, wyrażająca się w różnicach w wybranych przez autorów punktach końcowych, wykorzystanej linii Danio přegowanego, pochodzeniu materiału nowotworowego, sposobie jego iniekcji do organizmu modelowego, liczby inokulowanych komórek, a także czasu trwania analizy oraz rodzaju stosowanych leków. Zjawisko heterogeniczności stanowi przyczynę ograniczonej możliwości porównania i przeprowadzenia analizy statystycznej wyników pochodzących z różnych źródeł literaturowych, co można uznać za ograniczenie metodologiczne. Dla uzyskania lepszej powtarzalności, ujednolicenia i standaryzacji protokołów badawczych, konieczna jest ścisła współpraca pomiędzy laboratoriami i wymiana informacji na temat korzystnych i sprawdzonych rozwiązań. W odniesieniu do celu pracy, którym było zobrazowanie spektrum możliwości modelu Danio přegowanego w onkologii eksperymentalnej, przedstawiona różnorodność metodologiczna może jednak stanowić potwierdzenie użyteczności i uniwersalności modelu rybiego, niezależnie od specyfiki zastosowanego modelu badawczego.

Należy podkreślić, że niniejszy przegląd posiada jedynie charakter sygnalizacyjny, dlatego, dla zgłębienia zawartych w nim informacji, konieczne jest przeprowadzenie analizy na szerszą skalę. W przyszłości planuje się dalsze studiowanie zagadnień poruszonych w pracy, co pozwoli na lepsze zrozumienie przyczyn wyboru omawianego modelu zwierzęcego w analizach ukierunkowanych na procesy charakteryzujące inne choroby nowotworowe. Znacząca liczba prac badawczych, w których z sukcesem zastosowano model rybi, prawdopodobnie wpłynie na dalszy wzrost zainteresowania wykorzystaniem Danio přegowanego w onkologii eksperymentalnej.

Protokół niniejszego przeglądu systematycznego nie znalazł się w bazie danych PROSPERO, ponieważ nie wypełniono formularza rejestracyjnego przed rozpoczęciem prac nad artykułem. Baza ta stanowi obecnie istotne źródło wiedzy na temat planowanych publikacji o charakterze przeglądowym, zwiększając wiarygodność, użyteczność i istotność wykonanej pracy, dlatego, pomimo

braku wyraźnego wymogu, niezarejestrowanie artykułu w bazie danych autorzy uznają za ograniczenie metodologiczne.

PIŚMIENNICTWO

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71(3): 209–249.
2. Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024; 74(3): 229–263.
3. Hason M, Bartůněk P. Zebrafish Models of Cancer – New Insights on Modeling Human Cancer in a Non-Mammalian Vertebrate. *Genes (Basel).* 2019; 10(11): 1–30.
4. Wu Z, Xia F, Lin R. Global burden of cancer and associated risk factors in 204 countries and territories, 1980–2021: a systematic analysis for the GBD 2021. *J Hematol Oncol.* 2024; 17(119): 1–14.
5. Onaciu A, Munteanu R, Munteanu VC, et al. Spontaneous and Induced Animal Models for Cancer Research. *Diagnostics (Basel).* 2020; 10(9): 1–36.
6. Friedenreich CM, Ryder-Burbidge C, McNeil J. Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Mol Oncol.* 2021; 15(3): 790–800.
7. Weeden CE, Hill W, Lim EL, et al. Impact of risk factors on early cancer evolution. *Cell.* 2023; 186(8): 1541–1563.
8. Noorudeen R, Bach H. Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(16): 1–18.
9. Obeagu EI, Obeagu GU. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. *Medicine (Baltimore).* 2024; 103(3): 1–6.
10. Mukherjee P, Roy S, Ghosh D, Nandi SK. Role of animal models in biomedical research: a review. *Lab Anim Res.* 2022; 38(18): 1–17.
11. Golebiewska A, Fields RC. Advancing preclinical cancer models to assess clinically relevant outcomes. *BMC Cancer.* 2023; 23(1): 1–3.
12. Sajjad H, Imtiaz S, Noor T, et al. Cancer models in preclinical research: A chronicle review of advancement in effective cancer research. *Animal Model Exp Med.* 2021; 4(2): 87–103.
13. Guo H, Xu X, Zhang J, et al. The Pivotal Role of Preclinical Animal Models in Anti-Cancer Drug Discovery and Personalized Cancer Therapy Strategies. *Pharmaceuticals (Basel).* 2024; 17(8): 1–30.
14. Choi TY, Choi TI, Lee YR, et al. Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Exp Mol Med.* 2021; 53(3): 310–317.
15. Adhish M, Manjubala I. Effectiveness of zebrafish models in understanding human diseases – A review of models. *Heliyon.* 2023; 9(3): 1–17.
16. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (online) 2010. Dostępny w internecie: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063>. Dostęp 3.11.2025.
17. Ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. 2015 poz. 266; online) 2023. Dostępny w internecie: <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/download.xsp/WDU20150000266/U/D20150266L.pdf>. Dostęp 3.11.2025.
18. Rothenbücher TSP, Ledin J, Gibbs D, et al. Zebrafish embryo as a replacement model for initial biocompatibility studies of biomaterials and drug delivery systems. *Acta Biomater.* 2019; 100: 235–243.
19. Raby L, Völkel P, Le Bourhis X, Angrand PO. Genetic Engineering of Zebrafish in Cancer Research. *Cancers (Basel).* 2020; 12(8): 1–37.
20. Chen X, Li Y, Yao T, Jia R. Benefits of Zebrafish Xenograft Models in Cancer Research. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 1–14.
21. Astell KR, Siegel D. Zebrafish In Vivo Models of Cancer and Metastasis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2020; 10(8): 1–17.
22. Tao S, Huang C, Tan Z, et al. Effect of the polysaccharides derived from *Dendrobium officinale* stems on human HT-29 colorectal cancer cells and a zebrafish model. *Food Biosci.* 2021; 41: 1–13.
23. Póvoa V, Rebelo de Almeida C, Maia-Gil M, et al. Innate immune evasion revealed in a colorectal zebrafish xenograft model. *Nat Commun.* 2021; 12(1): 1–15.
24. Gubin MM, Vesely MD. Cancer Immunoediting in the Era of Immuno-oncology. *Clin Cancer Res.* 2022; 28(18): 3917–3928.

25. Lasek W. Cancer immunoediting hypothesis: history, clinical implications and controversies. *Cent Eur J Immunol.* 2022; 47(2): 168–174.
26. Wang J, Zhang XY, Xu DY. Zebrafish xenograft model for studying the function of lncRNA SNHG4 in the proliferation and migration of colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol.* 2022; 13(1): 210–220.
27. Bridges MC, Daulagala AC, Kourtidis A. LNCcation: lncRNA localization and function. *J Cell Biol.* 2021; 220(2): 1–17.
28. Zhang Y. LncRNA-encoded peptides in cancer. *J Hematol Oncol.* 2024; 17(66): 1–33.
29. Luo P, Du J, Li Y, et al. Association between small nucleolar RNA host gene expression and survival outcome of colorectal cancer patients: A meta-analysis based on PRISMA and bioinformatics analysis. *Front Oncol.* 2023; 13: 1–17.
30. Chu Q, Gu X, Zheng Q, et al. Long noncoding RNA SNHG4: a novel target in human diseases. *Cancer Cell Int.* 2021; 21(1): 1–13.
31. Cruz-Duarte R, Rebelo de Almeida C, Negrão M, et al. Predictive and Therapeutic Implications of a Novel PLCγ1/SHP2-Driven Mechanism of Cetuximab Resistance in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2022; 28(6): 1203–1216.
32. Yang J, Mo J, Dai J, et al. Cetuximab promotes RSL3-induced ferroptosis by suppressing the Nrf2/HO-1 signalling pathway in KRAS mutant colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2021; 12(11): 1–11.
33. Costa B, Estrada MF, Gomes A, et al. Zebrafish Avatar-test forecasts clinical response to chemotherapy in patients with colorectal cancer. *Nat Commun.* 2024; 15(1): 1–13.
34. Hu C, Sun L, Chen J, et al. Advantages of the zebrafish tumor xenograft model: the evaluation of efficacy in cancer therapy and the application to the study of lncRNAs. *Front Immunol.* 2024; 15: 1–11.
35. Xiao J, McGill JR, Nasir A, et al. Identifying drivers of breast cancer metastasis in progressively invasive subpopulations of zebrafish-xenografted MDA-MB-231. *Mol Biomed.* 2022; 3(1): 1–16.
36. Travnickova J, Patton EE. Deciphering Melanoma Cell States and Plasticity with Zebrafish Models. *J Invest Dermatol.* 2021; 141(6): 1389–1394.
37. Tobia C, Coltrini D, Ronca R, et al. An Orthotopic Model of Uveal Melanoma in Zebrafish Embryo: A Novel Platform for Drug Evaluation. *Biomedicines.* 2021; 9(12): 1–13.
38. Bustamante P, Piquet L, Landreville S, Burnier JV. Uveal melanoma pathobiology: Metastasis to the liver. *Semin Cancer Biol.* 2021; 71: 65–85.
39. Rantala ES, Hernberg MM, Piperno-Neumann S, et al. Metastatic uveal melanoma: The final frontier. *Prog Retin Eye Res.* 2022; 90: 1–57.
40. Yin J, Zhao G, Kalirai H, et al. Zebrafish Patient-Derived Xenograft Model as a Preclinical Platform for Uveal Melanoma Drug Discovery. *Pharmaceuticals (Basel).* 2023; 16(4): 1–16.
41. Lu Y, Patton EE. Long-term non-invasive drug treatments in adult zebrafish that lead to melanoma drug resistance. *Dis Model Mech.* 2022; 15(5): 1–9.
42. Montal E, Lumaquin D, Ma Y, et al. Modeling the effects of genetic- and diet-induced obesity on melanoma progression in zebrafish. *Dis Model Mech.* 2023; 16(1): 1–13.
43. Codolo G, Facchinello N, Papa N, et al. Macrophage-Mediated Melanoma Reduction after HP-NAP Treatment in a Zebrafish Xenograft Model. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(3): 1–14.
44. Al-Hamaly MA, Turner LT, Rivera-Martinez A, et al. Zebrafish Cancer Avatars: A Translational Platform for Analyzing Tumor Heterogeneity and Predicting Patient Outcomes. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(3): 1–24.
45. Fazio M, Ablain J, Chuan Y, et al. Zebrafish patient avatars in cancer biology and precision cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2020; 20(5): 263–273.
46. Kobar K, Collett K, Prykhodzij SV, Berman JN. Zebrafish Cancer Predisposition Models. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9:1–27.

