

DANIO PRĘGOWANY JAKO ORGANIZM MODELOWY W BADANIACH NAD NOWOTWORAMI



Maciej Olszewski i Magdalena Prusko (Warszawa)

Streszczenie

Wraz z rozwojem cywilizacyjnym i związaną z tym rosnącą długością życia zwiększa się liczba osób zapadających na choroby nowotworowe. Postępy w rozwoju biologii i medycyny powodują, że skuteczność leczenia nowotworów jest o wiele wyższa; niestety postęp ten w większości dotyczy krajów wysoko rozwiniętych. Zważywszy, że naukowcy badający procesy biologiczne w większości posługują się modelami badawczymi, w tym zwierzęcymi, dobór takiego modelu ze względu na jego odpowiedniość w stosunku do stawianych problemów badawczych, a także uwarunkowania ekonomiczne i etyczne jest niezwykle ważny. Na przestrzeni ostatniej dekady nastąpił gwałtowny wzrost popularności ryby danio pręgowanego jako organizmu modelowego w wielu dziedzinach badań biologicznych i biomedycznych. Poniższy artykuł przedstawia skrótoowo możliwości zastosowania danio pręgowanego jako modelu badawczego w badaniach nad biologią nowotworów.

Abstract

Social and economic development contribute to the increase in human lifespan. This, unfortunately, results in increased incidence of cancer. Progress in biomedical research significantly increased survival rates in cancer patients, but this increase is largely limited to more developed countries. Given that biologists usually work with research models, including model animals, the choice of the model with regard to its relevance and economic and ethical ramifications becomes crucial. Within the last decade rapid increase in popularity of zebrafish as a model animal in biomedical research occurred. The following article delineates current uses and opportunities that zebrafish presents in the field of cancer research.

Choroby nowotworowe jako problem społeczny i medyczny

Choroby nowotworowe nazywane są chorobami cywilizacyjnymi i często wzrost zachorowalności na nie kojarzony jest ze stopniem zamożności i rozwoju społeczeństw, w których występują. Dane Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) do pewnego stopnia to potwierdzają. Otóż w 2012 roku, z którego pochodzą najświeższe dane o zasięgu globalnym, 8.2 miliona spośród 56 milionów zgonów, prawie 15%, można przypisać różnego rodzaju chorobom nowotworowym. Częstość występowania nowotworów u mężczyzn w regionie określanym przez WHO jako „kraje bardziej rozwinięte” (obejmującym Europę, Amerykę Północną, Australię, Nową Zelandię i Japonię) wynosi 307 przypadków na 100 000 mieszkańców rocznie, a związana z nowotworami śmiertelność to 138 zgonów na 100 000 mieszkańców rocznie. Dla porównania, w regionie określanym jako „kraje mniej rozwinięte”, obejmującym resztę świata, wskaźniki te wynoszą odpowiednio 163 i 120. Pogłębiona analiza

powyższych danych wskazuje, że jeśli chodzi o całokształt chorób nowotworowych, to podstawowym czynnikiem ryzyka jest wiek pacjenta, co najpewniej wynika z procesu akumulacji mutacji, osłabienia układu immunologicznego i kilku jeszcze innych czynników. Tak więc z biegiem lat, wraz ze zwiększaniem się oczekiwanej długości życia, zwiększa się częstość występowania chorób nowotworowych i dla systemów opieki zdrowotnej zamożnych krajów o starzejących się społeczeństwach leczenie chorób nowotworowych staje się poważnym obciążeniem.

Organizmy modelowe w badaniach nad nowotworami

Z uwagi na istotność problemu publiczne i prywatne ciała finansujące badania naukowe kierują znaczące fundusze na badania związane z leczeniem nowotworów. Tysiące naukowców na całym świecie pracują nad metodami pozwalającymi na selektywne zabijanie bądź zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych, ewentualnie powstrzymanie

przerzutowania, co zwiększa szanse na sukces klasycznej terapii chirurgicznej bądź chemioterapii. Żeby prowadzić badania w laboratorium nad jakąkolwiek chorobą naukowcom potrzebny jest model badawczy. Z reguły oznacza to uproszczony układ biologiczny, czyli organizm niższego rzędu, w którym jednak pewien obszar procesów biologicznych pokrywa się z tym znajdującym u człowieka, a więc i w komórkach nowotworowych. Dobrym przykładem są tutaj drożdże (*Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*) oraz jeżowiec z rodzaju *Arbacia*, na których badania prowadzili Leland Hartwell, Paul Nurse i Timothy Hunt, odkrywcy podstawowych mechanizmów molekularnych regulujących podziały komórkowe, za które uhonorowani zostali Nagrodą Nobla w 2001 roku. W 2016 roku Nagrodę Nobla otrzymał Yoshinori Ohsumi, naukowiec, który z użyciem drożdży badał procesy autofagii, istotne dla wielu procesów fizjologicznych i patologicznych, w tym nowotworzenia. Wspomniane wyżej mechanizmy w swej istocie są wspólne dla wszystkich organizmów eukariotycznych, włączając człowieka, a ich znakomite zachowanie w ewolucji wskazuje na ich krytyczną istotność, ale także doskonałość znalezionej przez ewolucję rozwiązania. Zaburzenia tych właśnie podstawowych procesów regulacyjnych, które w dużym stopniu współdzielimy z drożdżami, leżą u podstaw patogenezy bardzo wielu nowotworów, prowadząc do nabywania przez zdrowe komórki zdolności do nieskończonych i niewłaściwie kontrolowanych podziałów komórkowych i w efekcie do pojawienia się nowotworu.

Jakkolwiek proste modele sprawdzają się w wielu zastosowaniach, to mają swoje ograniczenia związane z różnicami w genetyce, fizjologii czy zdolności reagowania na leki. Na przestrzeni ponad stulecia naukowcy testowali różne organizmy jako potencjalne modele badawcze. Do dziś w powszechnym użyciu są np. nicienie (*Caenorhabditis elegans*), muszki owocówki (*Drosophila melanogaster*) czy myszy i szczury laboratoryjne (*Mus musculus* i *Rattus norvegicus*). Dla wszystkich tych organizmów rozwinęły się liczne techniki modyfikacji genetycznych, które pozwalają na wprowadzanie mutacji odzwierciedlających stany patologiczne znajdujące u pacjentów i tym samym tworzenie organizmów modelowych. Należy jednak zauważyć, że w przypadku używania organizmów wyższych, być może doskonalszych jako model badawczy, ale jednocześnie zdolnych do odczuwania bólu i stresu, w grę zaczynają wchodzić kwestie etyczne. Stąd też względnie niedawne pojawienie się nowego organizmu modelowego, ryby danio pręgowanego (*Danio rerio*), pozwala niejednokrotnie

pogodzić wymogi odpowiedniości modelu z uwagowaniami etycznymi. Zalety danio pręgowanego jako organizmu modelowego, mającego zastosowanie w wielu dziedzinach badań biomedycznych, przedstawione są w artykule na stronach 255–263 bieżącego numeru *Wszechświata*; w tym miejscu należałoby wspomnieć jednak o kilku cechach, które szczególnie predestynują tę rybkę do roli modelu w badaniach nad nowotworami. Jest to organizm, który pozwolił zapełnić lukę pomiędzy prostymi (np. muszka owocówka) i zaawansowanymi (gryzonie) modelami: prosty kręgowiec, u którego występuje wiele narządów wspólnych z człowiekiem (np. skóra, wątroba, trzustka czy chociażby mózg), a także posiadający układ immunologiczny, co pozwala modelować różnego rodzaju białaczki. Opracowano także wiele technik pozwalających na modyfikacje genetyczne danio, dzięki czemu można tworzyć zwierzęta mające skłonność do zapadania na określone typy nowotworów, a także przenosić do modelu zwierzęcego mutacje znajdujące u pacjentów ludzkich i obserwować ich efekty w danio. Ponadto, dzięki dostępności metod modyfikacji genetycznej, wytworzono znaczącą liczbę transgenicznych linii danio, w których poszczególne organy bądź układy wykazują fluorescencję, co umożliwia przyżyciową obserwację ryby, u której np. naczynia krwionośne fluoryzują na zielono, makrofagi na czerwono, a neutrofile na niebiesko. Można dzięki temu obserwować nie tylko rozwój nowotworu w czasie, ale również reakcję układu immunologicznego gospodarza na komórki nowotworowe.

Dwa podstawowe podejścia stosowane w badaniach nowotworów z użyciem *D. rerio* to badania nowotworów powstających w organizmie ryby oraz transplantowanie do ryby komórek nowotworowych pochodzących z innych organizmów (np. ludzkich) i badanie interakcji pomiędzy nowotworem a gospodarzem. Wyniki uzyskiwane z użyciem obydwu tych strategii przedstawimy pokrótce poniżej.

Nowotwory powstające w organizmie *Danio rerio*

Proces powstawania i ewentualnego uzłośliwienia nowotworu jest wieloetapowy i z reguły obejmuje uszkodzenia kolejnych poziomów regulacji proliferacji i różnicowania komórkowego. Analiza zmian genetycznych występujących w komórkach nowotworowych pozwoliła na zidentyfikowanie grupy białek, których ściśle kontrolowana aktywność pobudza wzrost komórek, a w przypadku utraty tejże kontroli prowadzi do niekontrolowanego wzrostu. Białka te nazywane są protoonkogenami, a w uszkodzonej formie – onkogenami. W nowotworach występujących

u ludzi bardzo często znajdowane są mutacje w genach kodujących białka z rodzin RAS, RAF lub MYC. Inna niezwykle istotna grupa białek to tzw. supresory nowotworowe – są one odpowiedzialne za hamowanie i utrzymywanie wzrostu komórek pod kontrolą. W przypadku utraty funkcji takiego białka z powodu mutacji w kodującym je genie, również może dojść do niekontrolowanych podziałów komórkowych i w efekcie do rozwoju nowotworu. Najbardziej chyba znanym przedstawicielem tej grupy białek jest p53, produkt genu *TP53*, który ulega różnego rodzaju mutacjom w ponad połowie nowotworów występujących u ludzi. Obydwa te systemy kontrolują się wzajemnie i często konieczne są mutacje w genach należących do obydwu ścieżek, żeby doszło do nowotworu. Uzasadniona wydaje się tu analogia motoryzacyjna, mówiąca, że dopiero jednoczesne naciśnięcie gazu do podłogi (onkogen) i zepsucie hamulców (supresor nowotworowy) gwarantuje wypadek. Wracając do danio, wiele istniejących modeli chorób nowotworowych jest efektem wprowadzenia do genomu ryby mutacji znajdujących u ludzi w genach kodujących protoonkogeny lub supresory nowotworowe. W tabeli 1 zestawiono cztery spośród wielu dostępnych modeli nowotworowych, które pokrótce są omówione poniżej. W przypadku specyficznej tkankowo, ograniczonej do wątroby ekspresji genu kodującego białko KRAS z substytucją dwunastej reszty aminokwasowej glicyny na resztę waliny, która często znajdowana jest w ludzkich nowotworach, następuje gwałtowny rozrost wątroby o charakterystyce nowotworowej [1]. Jednocześnie autorzy tej publikacji pokazali, że traktowanie ryb ze sztucznie wytworzonym nowotworem wątroby substancjami blokującymi sygnały wzrostowe w komórkach nowotworowych prowadzi do zahamowania wzrostu tych komórek. Tym samym nie tylko wykazali, że u danio przegowanego fenotyp mutacji przeniesionej od pacjentów odpowiada temu znajdowanemu u ludzi, ale także, że ryba jest dobrym modelem do testowania potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Inny ciekawy model nowotworu wątroby nie jest oparty na aktywacji protoonkogenu, ale na utracie funkcji supresora nowotworowego p53 i jednoczesnej ekspresji genu pochodzącego z wirusa powodującego wirusowe zapalenie wątroby typu B (WZW B) [2]. Badania epidemiologiczne u ludzi wskazują, że zachorowanie na WZW B nie tylko prowadzi do zaburzeń funkcjonalnych wątroby w rodzaju zwłóknienia czy marskości, ale też zwiększa ryzyko późniejszego zachorowania na raka wątroby. Badania wykonane na modelu danio wykazały, że obecność białka HBx, pochodzącego z wirusa, prowadzi do wspomnianego upośledzenia

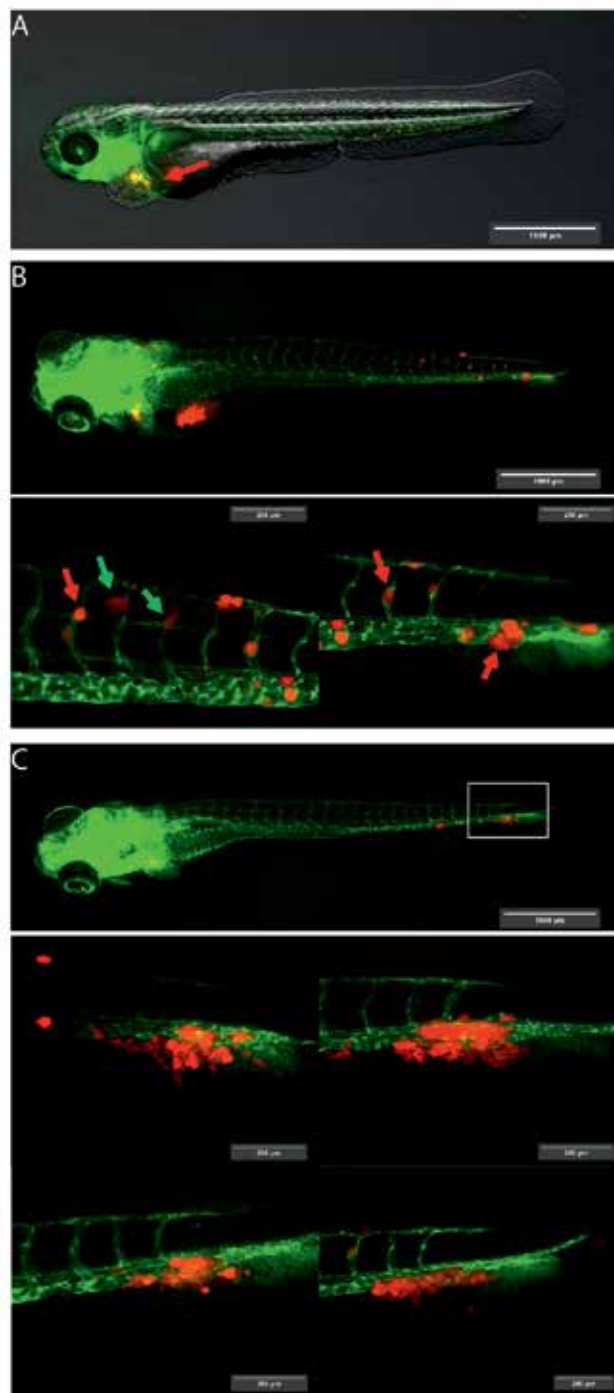
struktury i funkcji wątroby, ale dopiero skojarzenie ekspresji HBx z inaktywacją p53 prowadzi do procesu nowotworowego. Innym nowotworem, którego model stworzono w *D. rerio* jest czerniak [3]. Jest to jeden kilku z nowotworów, na które ryby te zapadają spontanicznie. Różnica pomiędzy spontanicznie powstałymi czerniakami i wspomnianym modelem polega na tym, że w tym drugim do genomu ryby wprowadzono określoną mutację powodującą, że w białku BRAF, będącym protoonkogenem, następuje zmiana V600E (reszta waliny na resztę kwasu glutaminowego), często znajdowana u pacjentów. Okazało się, że u ryb z taką mutacją na skórze pojawiają się czarne znamiona będące skupiskami melanocytów. W przypadku jednoczesnego wystąpienia mutacji w genie kodującym supresor nowotworowy p53, następuje gwałtowny rozwój masy nowotworowej o charakterze czerniaka. Wspomniane powyżej modele stworzone zostały tak, żeby zmiany genetyczne ograniczone były do narządów, które interesowały badaczy. Przykładem innego podejścia jest kolejny model badawczy, gdzie mutacja, podobnie jak w pierwszym z omawianych modeli raka wątroby, wprowadzona została do genu KRAS, a jej efektem jest zamiana dwunastej reszty aminokwasowej glicyny na resztę kwasu asparaginowego w kodowanym przez ten gen białku [4]. Różnica polega na tym, że w tym przypadku ekspresja genu kodującego zmienione białko zachodziła we wszystkich tkankach zwierzęcia i w efekcie u ryb rozwinęły się różne nowotwory: mięsak prążkowanokomórkowy, zaburzenia mieloproliferacyjne (dotyczące komórek krwi), rozrosty w obszarze jelit, a także złośliwy nowotwór wywodzący się z osłonek nerwów obwodowych. Pokazuje to, że przemiana protoonkogenu w onkogen może prowadzić do wystąpienia procesu nowotworowego w prawie każdej tkance i jednocześnie, że identyczna mutacja (tu: G12D) może prowadzić do rozwinięcia się bardzo różnych nowotworów, w zależności od rodzaju komórek, w których wystąpi. Czytelników zainteresowanych pogłębieniem wiedzy dotyczącej wykorzystania danio przegowanego jako gospodarza endogennych nowotworów odsyłamy do pracy przeglądowej w języku angielskim [5].

Danio rerio jako gospodarz transplantacji ksenogenicznej

Jak wspomniano wyżej, w badaniach nad nowotworami z użyciem danio jako modelu badawczego aktualnie stosowane są dwa podstawowe podejścia: mutageneza *in situ* i transplantacja ksenogeniczna, czyli transplantacja komórek nowotworowych

pochodzących z innego organizmu (np. ludzkich) do organizmu ryby. W Zakładzie Biologii Molekularnej Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, kierowanym przez prof. Macieja Żylicza, badania prowadzone są z użyciem metody transplantacji ksenogenicznej. W oparciu o powstałą w ostatnich latach w ramach projektu FISHMED infrastrukturę umożliwiającą hodowlę i badania nad *Danio rerio*, i we współpracy z posiadającą duże doświadczenie w użyciu tej metody grupą badawczą z Lejdy w Holandii, kierowaną przez prof. Ewę Snaar-Jagalską, prowadzimy badania dotyczące wpływu mutacji w genie kodującym białko p53 na chemiooporność i inwazyjność nowotworów, a także na zdolność komórek nowotworowych do stymulacji wzrostu naczyń krwionośnych gospodarza (angiogenezę). Zdolność komórek nowotworowych do naciekania otaczających tkanek w organizmie modelowym jest pewnym odzwierciedleniem ich potencjału metastatycznego (skłonności do tworzenia przerzutów) w organizmie pacjenta. Metodologia naszych badań obejmuje wprowadzenie do genomu komórek nowotworowych interesujących nas mutacji zmieniających białko p53, a także wprowadzenie genu kodującego białko czerwonej fluorescencji. Komórki te są następnie podawane dożylnie do dwudniowych embrionów rybich za pomocą szklanej igły o średnicy około 40 mikrometrów, co w przybliżeniu odpowiada połowie grubości ludzkiego włosa. Ryby używane do tych doświadczeń są zmodyfikowane genetycznie w taki sposób, że komórki ich śródbłónka wykazują zieloną fluorescencję. Prąd krwi porywa komórki nowotworowe i w naczyniach obwodowych przylegają one do śródbłónka. Ryc. 1A pokazuje trzydniowy embrión rybi, który 24 godziny wcześniej został nastrzyknięty komórkami nowotworowymi w miejscu wskazanym strzałką. Następnie niektóre z zaimplantowanych komórek pokonują barierę śródbłónka i wydostają się z naczyń krwionośnych. Ryc. 1B pokazuje czterodniowy embrión rybi, dwa dni po iniekcji. Na powiększeniach widoczne są komórki wewnątrz naczyń krwionośnych (czerwone strzałki) i takie, które wydostały się z naczyń (zielone strzałki). W przypadku użytych w tym doświadczeniu komórek pochodzących z raka płuca, w części ogonowej zwykle wytwarza się kolonia komórek, z której komórki penetrują przylegające tkanki rybie. Na Ryc. 1C pokazany jest ośmioldniowy embrión rybi, sześć dni po iniekcji, z zaznaczonym regionem kolonizacji przez komórki nowotworowe, a na powiększeniach zdjęcia kolonii komórkowych pochodzące z kilku ryb. Kolonie te, jak można zauważyć, wykazują różny stopień inwazyjności, co powinno odzwierciedlać potencjał

metastatyczny tych komórek u pacjenta. Możliwe jest także badanie interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi a organizmem gospodarza poprzez np.

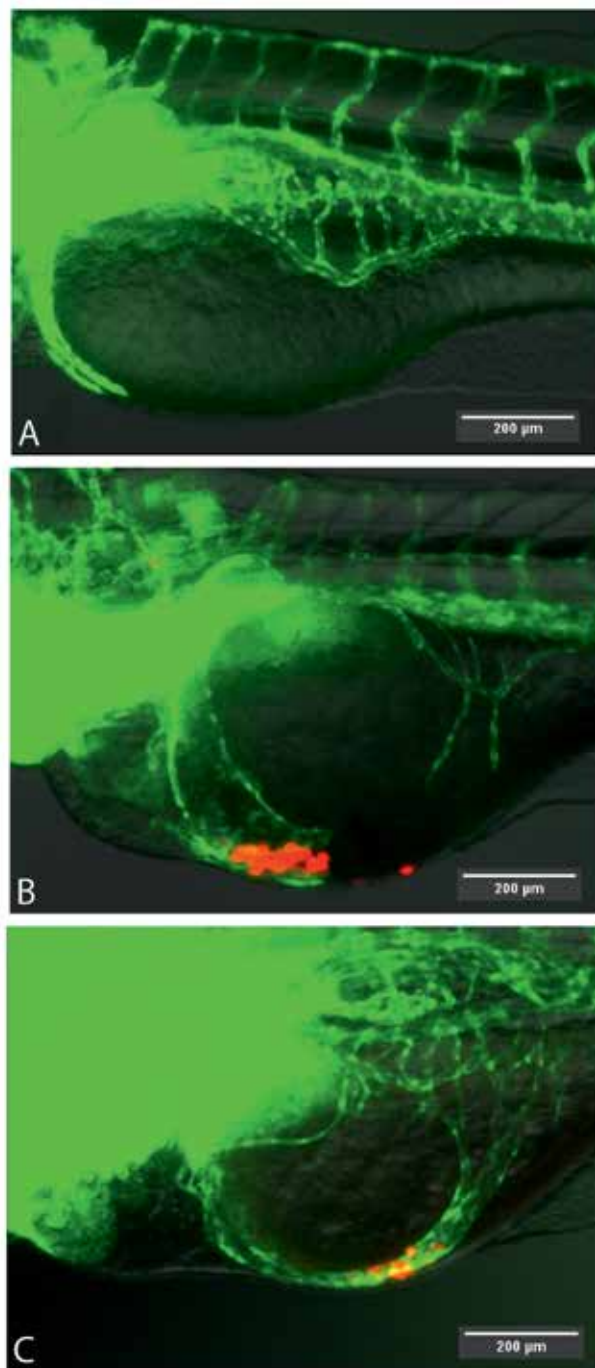


Ryc. 1 Ksenotransplantacje komórek nowotworowych do danio pręgowanego. Na wszystkich panelach kolor zielony pokazuje komórki śródbłónka, a kolor czerwony wstrzyknięte komórki nowotworowe. (A) Trzydniowy embrión danio pręgowanego, 24 godziny po wstrzyknięciu komórek nowotworowych. Miejsce wstrzyknięcia zaznaczone czerwoną strzałką. (B) Czterodniowy embrión rybi, 48 godzin po wstrzyknięciu komórek. Widoczne są komórki wewnątrz naczyń krwionośnych (czerwone strzałki) i komórki opuszczające te naczynia (zielone strzałki) (C) Ośmioldniowy embrión rybi, 6 dni po wstrzyknięciu komórek nowotworowych. Obszar otoczony ramką na panelu C prezentowany w powiększeniu poniżej. Wyraźnie widoczna lokalna infiltracja tkanek przez komórki nowotworowe, które wydostały się z naczyń krwionośnych.

traktowanie komórek lekami przed wstrzyknięciem do ryby, podawanie leków do wody, w której żyją ryby czy też modyfikacje genetyczne rybiego gospodarza, prowadzące do braku pewnych chemokin lub komórek układu odpornościowego (jak makrofagi czy neutrofile) i obserwowanie wpływu tych manipulacji na przeżywalność i inwazyjność komórek nowotworowych. Z użyciem podobnych technik nasi współpracownicy z Holandii pokazali, że ludzkie komórki nowotworowe z nowotworu piersi umieszczone w organizmie danio pręgowanego wchodzi w interakcje z rybimi neutrofilami i reagują na chemokiny wydzielane przez komórki rybie, zmieniając swoją inwazyjność [6].

Danio rerio pozwala również na przeprowadzanie doświadczeń określających potencjał angiogeny transplantowanych komórek nowotworowych [7]. W warunkach naturalnych guz nowotworowy, po osiągnięciu pewnej granicznej wielkości, nie jest w stanie pozyskiwać czynników odżywczych poprzez dyfuzję. W związku z tym, ażeby przeżyć, komórki nowotworowe muszą wytworzyć zdolność indukowania wzrostu naczyń krwionośnych gospodarza, które to naczynia następnie odżywiają rosnący guz. W tym celu komórki nowotworowe wydzielają różne białka, z których najważniejsze to naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF). Komórki śródbłonka wykrywają źródło VEGF-u i rosną w jego kierunku. Modelowanie tego procesu w embrionach danio pręgowanego polega na wstrzyknięciu niewielkiej liczby komórek do przestrzeni periwitelarnej (pomiędzy dwie warstwy błony otaczającej żółtko) dwudniowych embrionów i, po 24 godzinach, porównanie morfologii naczyń krwionośnych ryb nastrzykniętych i nienastrykniętych. Obserwowane naczynia to najczęściej podjelitowy kompleks naczyniowy (ang. SIV), który u ryb dwu- i trzydniowych tworzy rodzaj „siodełka” w górnej części żółtka (Ryc. 2A). W przypadku obecności czynników angiogennych, wydzielanych przez nastrzyknięte komórki, z kompleksu tego wyrastają pierwotne naczynia krwionośne, rosnące w kierunku źródła VEGF-u (Ryc. 2B). Możliwe jest również przemieszczenie i rozrost całego kompleksu SIV (Ryc. 2C). Tego rodzaju badania pozwalają na ilościową i jakościową ocenę procesu wzrostu naczyń krwionośnych w okolicy guza nowotworowego, a także na testowanie skuteczności modyfikacji genetycznych oraz środków farmakologicznych w hamowaniu wzrostu tych naczyń i tym samym zahamowaniu wzrostu guza. Automatyzacja procesu obrazowania i analizy obrazu pozwala na przeszukiwanie dużych bibliotek związków biologicznie aktywnych z użyciem zaawansowanego

ewolucyjnie organizmu – kręgowca, jako modelu badawczego, co było wcześniej niemożliwe. Zastosowanie takiego podejścia doprowadziło już do zidentyfikowania pierwszego związku chemicznego, wstępnie wyselekcjonowanego z użyciem danio pręgowanego, a wykazującego aktywność antyangiogenną w modelu badawczym opartym na komórkach ludzkich [8].

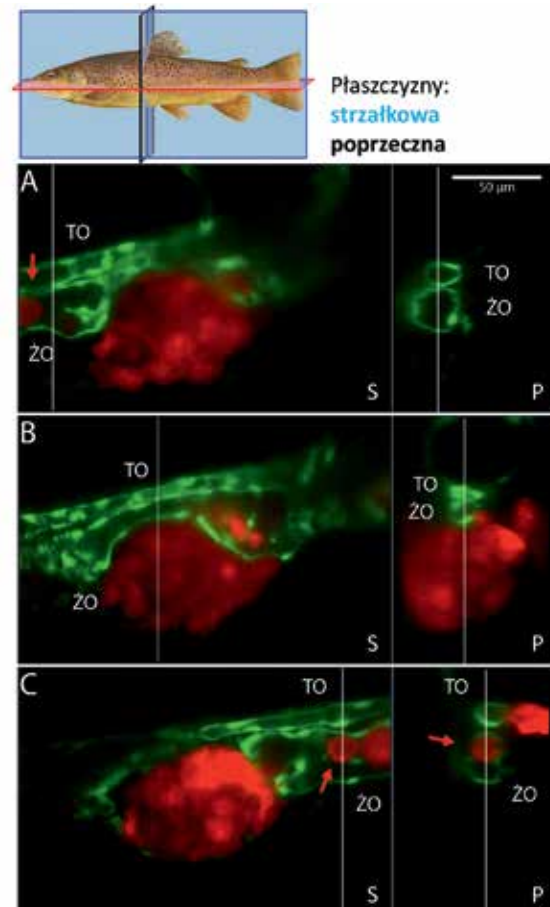


Ryc. 2 Oznaczenie aktywności angiogennej komórek nowotworowych. Na wszystkich panelach kolor zielony pokazuje komórki śródbłonka, a kolor czerwony wstrzyknięte komórki nowotworowe. Komórki nowotworowe wstrzyknięte zostały do dwudniowych embrionów rybich i pozostały w miejscu wstrzyknięcia. Ryba nienastryknięta (A) i ryby nastrzyknięte komórkami nowotworowymi wykazują różną morfologię naczyń krwionośnych.

Na przeciwnym krańcu spektrum metod mikroskopowych używanych w badaniach nad danio pręgowanym lokuje się metoda mikroskopii świetlnopłaszczyznowej (ang. *lightsheet microscopy*). Metoda ta pozwala na niezwykle dokładne obserwacje procesów zachodzących w organizmie żywej ryby, z jednoczesną minimalizacją fototoksyczności wywołanej przez używane powszechnie w mikroskopii fluorescencyjnej światło laserowe, za to o mniejszej przepustowości, jeśli chodzi o liczbę obrazowanych zwierząt. Artykuł szerzej omawiający tę technikę można znaleźć w bieżącym numerze *Wszczęświata* na stronach 263–269. W naszych badaniach nad nowotworami metoda ta znajduje zastosowanie w obrazowaniu komórek nowotworowych wstrzykniętych do układu naczyniowego danio. Zdjęcia wykonane w technice stereoskopowej (Ryc. 1 i 2) pozwalają wstępnie ocenić fenotyp kolonii komórek nowotworowych, ale w celu jednoznacznego ustalenia, czy komórki te przywarły do śródbłonna, bądź opuściły naczynia krwionośne – obydwa te etapy są konieczne do powstania przerzutu nowotworu – konieczne jest użycie metody pozwalającej osiągnąć wyższą rozdzielczość i zanalizować badany obiekt w trzech wymiarach. Na Ryc. 3 przedstawiony jest ten sam obszar ryby, co na zbliżeniach na Ryc. 1C, ale zobrazowany techniką mikroskopii świetlnopłaszczyznowej, co pozwala na wykonanie przekrojów w dowolnej płaszczyźnie. Porównanie przekrojów w płaszczyznach strzałkowej (S) i poprzecznej (P) pozwala stwierdzić, że cała kolonia komórek nowotworowych znajduje się na zewnątrz układu naczyniowego. Jednocześnie widać, że w żyłę ogonową (ŻO) znajdują się jeszcze poszczególne komórki nowotworowe (Ryc. 3A i 3C, czerwone strzałki). Z kolei na obszarze największej swojej ekspansji poza naczynia komórki nowotworowe uciskają zarówno żyłę, jak i tętnicę ogonową (TO), powodując znaczące zmniejszenie ich światła, co widać wyraźnie na Ryc. 3B na przekroju poprzecznym.

Podsumowując, wydaje się, że po dekadzie tworzenia modeli chorób, również nowotworowych, i po stworzeniu bogatego zestawu narzędzi do manipulacji genetycznych, *Danio rerio* zaczyna być akceptowany przez środowisko naukowe jako pełnoprawny model badawczy. Ma oczywiście swoje ograniczenia w stosunku do modeli mysich, ale z drugiej strony odpowiada na współczesne wyzwania natury etycznej, związane z prowadzeniem doświadczeń z użyciem zwierząt laboratoryjnych. Co więcej, niektóre z tych doświadczeń, jak np. wysokoprzepustowe przeszukiwanie bibliotek związków chemicznych, na przykład w poszukiwaniu leków przeciwnowotworowych, są

po prostu niewykonalne z użyciem gryzoni, a mogą być zautomatyzowane z użyciem tej ryby. Stąd też uważamy, że danio pręgowany ma duże szanse spełnić pokładane w nim nadzieje i cieszymy się, że również w Polsce powstają kolejne ośrodki naukowe używające tego organizmu modelowego.



Ryc. 3 Obrazowanie ksenotransplantów metodą mikroskopii świetlnopłaszczyznowej. Ośmioldniowe embriony rybie, sześć dni po nastrzyknięciu, obrazowane za pomocą mikroskopii świetlnopłaszczyznowej. Na wszystkich panelach kolor zielony pokazuje komórki śródbłonna, a kolor czerwony wstrzyknięte komórki nowotworowe. Oznaczone przekroje w płaszczyznach strzałkowej (S) i poprzecznej (P); oznaczona tętnica ogonowa (TO) i żyła ogonowa (ZO). Czerwone strzałki wskazują komórki nowotworowe wewnątrz naczyń krwionośnych.

Tab. 1 Zestawienie wybranych modeli chorób nowotworowych stworzonych w *Danio rerio* i opisanych w tekście

Narząd	Transgen	Efekt biologiczny
Wątroba	KRAS (G12V)	Nowotwór wątroby z mutacją w genie KRAS i platforma do testowania leków [1]
Wątroba	HBx	Nowotwór wątroby wywołany ekspresją genu kodującego białko wirusa HBV, wymaga dodatkowo mutacji w p53 [2]
Skóra	BRAF(V600E)	Czerniak z mutacją w genie BRAF, wymaga dodatkowo mutacji w p53 [3]
Różne	KRAS (G12D)	Różne narządy [4]

Bibliografia

1. Ceol, C.J. and Y. Houvras. (2016) Uncharted Waters: Zebrafish Cancer Models Navigate a Course for Oncogene Discovery. *Adv Exp Med Biol.* 916: p. 3–19.
2. Le, X., Langenau D.M., Keefe M.D., Kutok J.L., Neuberger D.S., Zon L.I. (2007) Heat shock-inducible Cre/Lox approaches to induce diverse types of tumors and hyperplasia in transgenic zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 9410–9415.
3. Lu, J.W., Yang W.Y., Tsai S.M., Lin Y.M., Chang P.H., et al. (2013) Liver-specific expressions of HBx and src in the p53 mutant trigger hepatocarcinogenesis in zebrafish. *PLoS One.* 8, e76951.
4. Nguyen, A.T., Emelyanov A., Koh C.H., Spitsbergen J.M., et al. (2012). An inducible kras(V12) transgenic zebrafish model for liver tumorigenesis and chemical drug screening. *Dis Model Mech.* 5, 63–72.
5. Nicoli, S. and M. Presta (2007). The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. *Nat Protoc.* 2, 2918–2923.
6. Patton, E.E., Widlund H.R., Kutok J.L., Kopani K.R., et al. (2005). BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol.* 15, 249–254.
7. Tran, T.C., Sneed B., Haider J., Blavo D., White A., et al. (2007) Automated, quantitative screening assay for antiangiogenic compounds using transgenic zebrafish. *Cancer Res.* 67, 11386–11392.
8. Tulotta, C., Stefanescu C., Beletkaia E., Bussmann J., et al. (2016). Inhibition of signaling between human CXCR4 and zebrafish ligands by the small molecule IT1t impairs the formation of triple-negative breast cancer early metastases in a zebrafish xenograft model. *Dis Model Mech.* 9, 141–153.

Maciej Olszewski i Magdalena Prusko. Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, Zakład Biologii Molekularnej, Warszawa. E-mail: molszewski@iimcb.gov.pl. Badania finansowane przez Komisję Europejską i Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu FishMed, kontrakt nr 316125.

KAMPANIA EDUKACYJNA „BĄDŹ ZDRÓW JAK RYBA” JAKO PRZYKŁAD DZIAŁAŃ POPULARYZATORSKICH



Daria Goś (Warszawa)

Streszczenie

Artykuł prezentuje kampanię edukacyjną „Bądź zdrow jak ryba” realizowaną przez Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej (MIBMiK) w Warszawie oraz efekty związane z realizacją programu. Celem akcji jest edukowanie w zakresie biologii i badań naukowych prowadzonych w Instytucie. Chcąc w przyjazny sposób przybliżyć dzieciom współczesne nauki biologiczne w zakresie uzupełniającym ich wiedzę szkolną i zachęcającym do szerszego poznawania tej dziedziny nauki w przyszłości, Instytut przygotował program warsztatów edukacyjnych dla dzieci, książeczkę i materiał wideo pod wspólnym tytułem „Bądź zdrow jak ryba”.

Abstract

This article presents the “Be Healthy as a Fish” educational program organized by the International Institute of Molecular and Cell Biology (IIMCB) in Warsaw and the positive effects resulting from the campaign. The aim of the program is to educate in the field of biology and research conducted at the Institute. In order to focus on the field of biology in a way that complements the children’s classroom curriculum and encourages them to broaden their interests in biology in the future, the Institute created a workshop, a booklet and a movie each under the title “Be Healthy as a Fish”.