

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **241022**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **435984**

(51) Int.Cl.
A01K 61/10 (2017.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **16.11.2020**

(54) **Sposób depigmentacji modelu badawczego ryby z gatunku Danio rerio
z użyciem izoetaryny oraz zastosowanie izoetaryny do depigmentacji modelu
badawczego ryby z gatunku Danio rerio**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
22.11.2021 BUP 34/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
18.07.2022 WUP 29/22

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

ANITA PŁAZIŃSKA, Lublin, PL
MONIKA MACIĄG, Tarnobrzeg, PL
ARTUR WNOROWSKI, Lublin, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Bełz

PL 241022 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób depigmentacji modelu badawczego ryby z gatunku *Danio rerio*, stosowanego do celów diagnostycznych, z użyciem izoetaryny oraz zastosowanie izoetaryny jako nowego narzędzia do wygenerowania modelu *in vivo* transparentnej ryby z gatunku *Danio rerio*.

Danio přęgowany (łac. *Danio rerio*) jest organizmem modelowym stosowanym w badaniach *in vivo* podczas analiz biomedycznych. Rozwój embrionalny i larwalny danio přęgowanego został szczegółowo opisany w literaturze [Kimmel C.B., Ballard W.W., Kim-mel S.R., Ullmann B., Schilling T.F., 1995 – Stages of Embryonic De-velopment of the Zebrafish. *Dev. Dynam.* 203, 255–31]. Warunki chowu tego gatunku zostały zwalidowane w warunkach laboratoryjnych, dzięki czemu uzyskano powtarzalność wyników doświadczeń oraz popularyzację tego modelu na świecie. Łączy on zdolność przetwórczą bezkręgowców o dużej przepustowości i znaczne podobieństwo genetyczne do ludzi [Howe K., Clark M. D., Torroja C. F., Torrance J., Berthelot C., et al. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503. Chen YM, Su WC, Li C, Shi Y, Chen QX, Zheng J, Tang DL, Chen SM, Wang Q. Anti-melanogenesis of novel kojic acid derivatives in B16F10 cells and zebrafish. *Int J Biol Macromol.* 2019 Feb 15; 123: 723–731.]. *Danio přęgowany* znajduje szerokie zastosowanie w badaniu patogenezy chorób, testowaniu nowych leków oraz do opracowywania nowych terapii. Do najważniejszych chorób, zaliczanych do zagrożeń cywilizacyjnych, nad którymi prowadzone są badania przy zastosowaniu modelu danio přęgowanego należą: choroby neurodegeneracyjne i psychiczne, choroby nowotworowe i serca, choroby układu mięśniowo-kostnego, różnego typu zaburzenia układu i rozwoju. Ponadto, model ten stosowany jest w badaniach dotyczących farmakodynamiki, toksykologii oraz kontroli środowiska. W szczególności, danio přęgowany stanowi model *in vivo* w badaniach procesu melanogenezy [The extract of *Rhodobacter sphaeroides* inhibits melanogenesis through the MEK/ERK signaling pathway. Liu WS, Kuan YD, Chiu KH, Wang WK, Chang FH, Liu CH, Lee CH *Mar Drugs.* 2013 Jun 3; 11(6): 1899–908.].

Obecnie, komercyjnie dostępne są transparentne larwy oraz osobniki dorosłe danio přęgowanego, otrzymane na drodze mutacji genowej, regulującej formowanie pigmentu (*nacrew2/w2* and *roya9/a9*) lub syntezę melaniny (*albb4/b4*) [Antinucci, P., & Hindges, R. (2016). A crystal-clear zebrafish for *in vivo* imaging. *Sci Rep*, 6, 29490. doi: 10.1038/srep29490, Michael A Pickart 1, Sridhar Sivasubbu, Aubrey L Nielsen, Sabitha Shriram, Richard A King, Stephen C Ekker. Functional genomics tools for the analysis of zebrafish pigment. *Pigment Cell Res.* 2004 Oct; 17(5): 461–70]. Transparentność indukować można również działając na larwy danio přęgowanego związkiem chemicznym o nazwie 1-fenyl-2-tiomocznik (PTU) [Choi, T. Y., Kim, J. H., Ko, D. H., Kim, C. H., Hwang, J. S., Ahn, S., Kim, S. Y., Kim, C. D., Lee, J. H., Yoon, T. J. (2007). Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res*, 20(2), 120–127. doi: 10.1111/j. 1600-0749.2007.00365. Li, Z., Ptak, D., Zhang, L., Walls, E. K., Zhong, W., & Leung, Y. F. (2012). Phenylthiourea specifically reduces zebrafish eye size. *PLoS One*, 7(6), e40132. doi: 10.1371/journal.pone.0040132.]. Dane literaturowe wskazują, że optymalne stężenie PTU potrzebne do wywołania transparentności to zaledwie 75 μM . Dla stężeń już 2.7 razy wyższych obserwowane były zmiany teratogenne, np. deformacje szczęki, dlatego w jego stosowaniu zalecana jest ostrożność [Karlsson, J., von Hofsten, J., & Olsson, P. E. (2001). Generating transparent zebrafish: a refined method to improve detection of gene expression during embryonic development. *Mar Biotechnol (NY)*, 3(6), 522–527. doi:10.1007/s1012601-0053-4].

Podczas badań nieoczekiwanie okazało się, że izoetaryna jest skutecznym narzędziem do wygenerowania transparentnego modelu ryby z gatunku *Danio rerio*.

Wynalazek rozwiązuje zagadnienie depigmentacji modelu badawczego ryby *Danio rerio* przy użyciu izoetaryny, który wykorzystywany jest przy badaniach w celach diagnostycznych w szczególności chorób neurodegeneracyjnych, nowotworowych, krążenia, układu mięśniowo-kostnego oraz różnego typu zaburzeń w rozwoju.

Izoetaryna (łac. *isoetharinum*) należy do grupy katecholamin wykazujących działanie agonistyczne wobec receptora β_2 adrenergicznego (β_2 -AR). Izoetaryna jest selektywnym agonistą β_2 -AR wykazującym krótki czas działania. Izoetaryna do roku 2015 znajdowała zastosowanie w Polsce jako lek w leczeniu astmy powodujący natychmiastowy rozkurcz mięśni gładkich oskrzeli.

Pomimo istnienia wzmianek na temat wpływu związków działających agonistycznie wobec receptora β_2 -AR i należących do grupy beta-mimetyków na hipopigmentację [Wang, Z., Nishimura, Y., Shimada, Y., Umemoto, N., Hirano, M., Zang, L., Oka, T., Sakamoto, C., Kuroyanagi, J., Tanaka, T. (2009).

Zebrafish beta-adrenergic receptor mRNA expression and control of pigmentation. *Gene*, 446(1), 18–27. doi:10.1016/j.gene.2009.06.005], nie istnieją żadne doniesienia traktujące o wpływie izoetaryny na redukcję ubarwienia u ryb zwłaszcza danio pręgowanego.

Istota sposobu depigmentacji modelu badawczego ryby z gatunku danio pręgowanego, polega na tym, że przygotowuje się najpierw medium hodowlane dla ryb, odpowiadające warunkom naturalnym, zawierające mieszaninę soli korzystnie NaCl, KCl, ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) lub MgSO_4 , po czym dodaje się izoetarynę w postaci soli kwasu mesyłowego w ilości od 1,7106 g do 5,0313 g na 1 litr wodnego roztworu medium hodowlanego, odpowiadający stężeniu izoetaryny w zakresie od 5,1 mM do 15 mM, następnie umieszcza się w nim ryby *Danio rerio* korzystnie natychmiast po zapłodnieniu na okres od 96 do 120 godzin po zapłodnieniu, następnie ryby korzystnie całkowicie odbarwione stosuje się do eksperymentów badawczych.

Korzystnie model badawczy ryby umieszczony jest w medium odżywczym o temperaturze 20–29°C.

Korzystnie medium odżywcze z mieszaniną soli posiada pH na poziomie: 6,9–7,5.

Korzystnie pH 6,9–7,5 uzyskuje się za pomocą wodnego roztworu wodorotlenku, korzystnie NaOH.

Korzystnie model badawczy ryby umieszcza się w roztworze z dodatkiem izoetaryny na 96 godzin od momentu zapłodnienia.

Przedmiotem wynalazku jest także zastosowanie izoetaryny do depigmentacji modelu badawczego ryby z gatunku danio pręgowanego wykorzystywanej do celów monitorowania rozwoju fizjologicznego/biologicznego oraz do celów diagnostycznych.

Izoetaryna jest skutecznym narzędziem w depigmentacji ryb zwłaszcza larw danio pręgowanego, stosowanego jako model badawczy w celach diagnostycznych (m.in. badania przesiewowe substancji będących potencjalnymi lekami, testowanie leków, opracowywanie nowych terapii).

Zgodnie z wynalazkiem stwierdzono, że larwy danio pręgowanego wystawione na działanie roztworu izoetaryny w stężeniu korzystnie 7,50 mM ulegały całkowicie i trwale odbarwieniu. Ponadto, roztwór izoetaryny w użytych stężeniach nie powoduje zmian teratogennych. Dawka LC_{50} , określająca stężenie powodujące śmiertelność u 50% badanych osobników, wyniosła 20,54 mM i jest czterokrotnie wyższa od AC_{50} (stężenie powodujące depigmentację u 50% badanej populacji) równego 5,10 mM; sprawia to, że używanie izoetaryny jest bezpieczne. Ponadto, zastosowanie roztworu izoetaryny o stężeniu 15,00 mM, dwukrotnie wyższym od stężenia optymalnego (7,50 nM), nie powoduje zmian teratogennych oraz śmiertelności u larw danio pręgowanego w 96 godzinie po zapłodnieniu.

Wynalazek pozwala uzyskiwać każdorazowo do celów badawczych transparentną rybę przy użyciu izoetaryny w ilości według wynalazku w sposób kontrolowany. Ponadto sposób pozwala uniknąć rozbudowanych procedur pozwalających na użycie w obrocie zwierząt GMO. To z kolei umożliwia podejmowanie i prowadzenie w dogodnym czasie badań diagnostycznych na modelu transparentnej ryby otrzymanej według wynalazku np. przy testowaniu różnych leków.

Wynalazek jest przedstawiony w poniższych przykładach, gdzie uzyskano depigmentację na przykładzie larw danio pręgowanego.

P r z y k ł a d 1:

Izoetarynę w postaci soli kwasu mesyłowego w postaci wodnego roztworu o stężeniu 5,10 mM zastosowano w medium hodowlanym (stężenie powodujące depigmentację u 50% badanych osobników w 96-godzinie od zapłodnienia).

Roztwór stanowiący medium hodowlane sporządzony był wg. poniższych procedur:

1. Roztwór podstawowy:

Mieszaninę soli w poniższych proporcjach: 17,4 g NaCl, 0,8 g KCl, 2,9 g ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 4,89 g ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) rozpuszczono w wodzie demineralizowanej tak, aby otrzymać 1 litr roztworu. Otrzymany roztwór przechowywano w lodówce.

2. Roztwór E3 (roztwór podstawowy z dodatkiem NaOH):

16,5 ml roztworu podstawowego (przygotowanie jw.) dodajemy do 1 litra wody demineralizowanej (ultrapure water). Otrzymany roztwór miareczkujemy roztworem 0,1 M NaOH do uzyskania pH na poziomie pH: 7,0. Otrzymany roztwór utrzymywany jest w temp. pokojowej 18–25°C. Otrzymany w powyższy sposób roztwór E3 stanowi medium hodowlane dla ryb *Danio rerio* dedykowane do hodowli odpowiadającej warunkom naturalnym.

Następnie otrzymano roztwór izoetaryny:

Do 1 litra roztworu E3 dodano izoetarynę w postaci soli kwasu mesyłowego w ilości 1,7106 g.

Przykład 2:

Sposobem opisanym w przykładzie 1 sporządzono wodny roztwór izoetaryny o stężeniu 7,5 mM, w tym celu do 1 litra roztworu E3 dodano izoetarynę w postaci soli kwasu mesylowego w ilości 2,5156 g, przy czym roztwór E3 posiadał pH 7,1.

Przykład 3:

Sporządzono wodny roztwór izoetaryny o stężeniu 15,0 mM, sposobem opisanym w przykładzie 1, przy czym do 1 litra roztworu E3 dodano izoetarynę w postaci soli kwasu mesylowego w ilości 5,0313 g, przy czym roztwór E3 posiadał pH 7,1.

W tak sporządzonej serii wodnych roztworów izoetaryny opisanych w przykładzie 1–3 umieszczono embriony danio pręgowanego natychmiast po zapłodnieniu. Embriony oraz larwy danio pręgowanego umieszczone w 96-dółkowej płytce wystawiono na ekspozycję wodnego roztworu izoetaryny przez okres 96 hpf (godziny po zapłodnieniu; ang. hours post fertilization). Każdego dnia przygotowywano świeży roztwór izoetaryny i delikatnie wymieniano.

Każdego dnia embriony/larwy danio pręgowanego obserwowano pod mikroskopem stereoskopowym, natomiast w 96 hpf obserwowano i odnotowywano liczbę larw, u których zaszły zmiany pod wpływem badanego związku. Przez cały okres badań danio pręgowane utrzymywane był w temperaturze $28,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ w cyklu dobowym 14 h/10 h dzień/noc.

W wyniku przeprowadzenia procesu depigmentacji larwy danio pręgowanego wystawione na działanie izoetaryny w stężeniu 7,50 mM ulegały całkowicie odbarwieniu w 4 dniu po zapłodnieniu (96 hpf), co przedstawia Rys. 1, obejmujący zdjęcia 1–4. Proces ten zaszedł u 100% badanych larw.

Na zdjęciach pokazano porównanie larwy danio pręgowanego (96 hpf) wystawionej na działanie roztworu izoetaryny o stężeniu 7,5 mM przez okres 96 godzin od momentu zapłodnienia – zdjęcia z prawej strony (model odbarwiony). Zdjęcia z lewej strony przedstawiają kontrolę – larwę danio pręgowanego (96 hpf) utrzymywanego w medium hodowlanym (E3). Porównanie larw na zdjęciach uwzględnia widok z góry (widok grzbietowy) oraz boku larwy (widok boczny).

Natomiast wystawienie na działanie izoetaryny w stężeniu 5,10 mM spowodowało odbarwienie u 50% badanej grupy danio pręgowanego przez okres 96 godzin od zapłodnienia. Zaś wystawienie danio pręgowanego na działanie izoetaryny w stężeniu 15 mM spowodowało całkowite odbarwienie i nie powodowało zmian teratogennych oraz śmiertelności u ryb w 96 godzinie od zapłodnienia. Wszystkie zaobserwowane zmiany w morfologii (odbarwienie) ryb wystąpiły pod wpływem izoetaryny (izoetaryna użyta w postaci soli kwasu mesylowego, wodny roztwór).

Wyznaczona wartość AC_{50} (50% efektywnego stężenia wywołującego depigmentację) wyniosła 5,10 mM. Wyindukowana transparentność dotyczyła całego organizmu, w tym również najsilniej ubarwionego narządu u ryb, jakim jest oko. To dodatkowo czyni otrzymany model atrakcyjnym w badaniach nad rozwojem oka, testowaniem nowych, odpowiednich preparatów farmaceutycznych oraz opracowywaniem nowych terapii stosowanych w chorobach okulistycznych.

Izoetaryna jest skutecznym narzędziem w indukowaniu depigmentacji ryb zwłaszcza danio pręgowanego, stosowanego jako model badawczy do celów diagnostycznych. Zgodnie z wynalazkiem stwierdzono, że larwy danio pręgowanego wystawione na działanie wodnego roztworu izoetaryny w stężeniu korzystnie 7,50 mM ulegały całkowicie odbarwieniu po 96 godzinach od zapłodnienia. Ponadto, nie odnotowano aby wodny roztwór izoetaryny w użytych stężeniach powodował zmiany teratogenne. Dawka LC_{50} (ang. lethal concentration), określająca stężenie powodujące śmiertelność u 50% testowanych osobników, wyniosła 20,54 mM i jest czterokrotnie wyższa od AC_{50} równego 5,10 mM; sprawia to, że używanie izoetaryny jest bezpieczne.

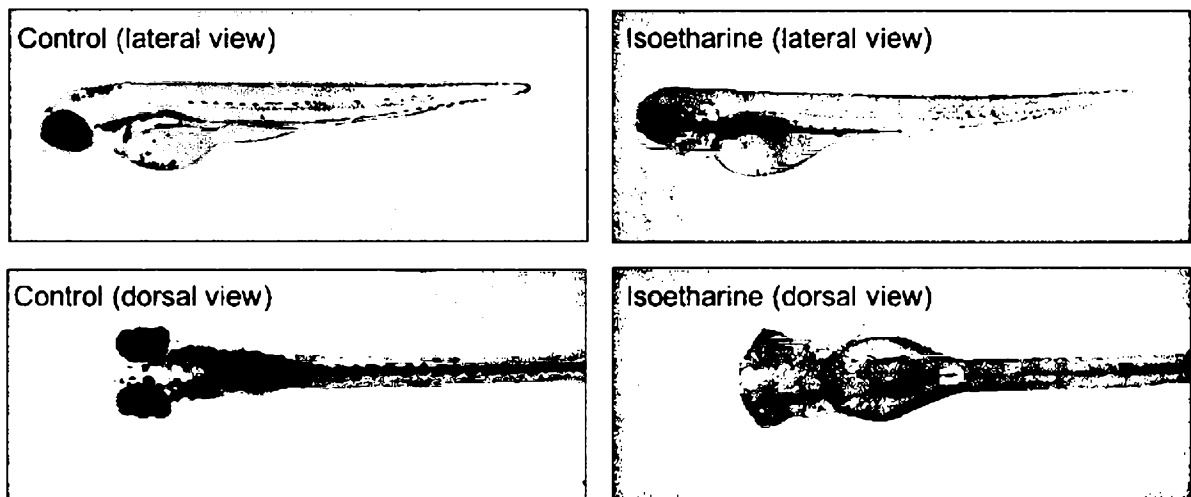
Technika otrzymywania transparentnych larw jest szybka (obserwuje się szybką i stabilną depigmentację) oraz nieskomplikowana, gdyż transparentne larwy otrzymuje się poprzez użycie tylko jednego odczynnika. Opracowany model stanowić będzie tanią i łatwą do otrzymania alternatywę dla dostępnych komercyjnie przezroczystych linii danio pręgowanego (casper zebrafish) DOI:10.1016/j.stem.2007.11.002. Ponadto, z uwagi na 4-krotną różnicę pomiędzy wartościami AC_{50} (5,10 mM) i LC_{50} (20,54 mM), stanowić będzie bezpieczniejszy model w porównaniu z modelem indukowanym 1-fenilo-2-tiomocznikiem (PTU).

Model transparentnej ryby danio pręgowanego posłużyć może w badaniach in vivo prowadzonych nad rozwojem narządów i funkcjonowaniem organizmu, patogenezą chorób, testowaniem leków mających na celu opracowanie nowych skutecznych terapii. Przykładem zastosowania związku może być trwałe odbarwienie oka modelu badawczego danio pręgowanego w celu przeprowadzania badań leków stosowanych w okulistyce docelowo na ww. narząd.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób depigmentacji modelu badawczego ryby z gatunku danio pręgowanego, polegający na przygotowaniu medium odżywczego dla ryb zawierającego mieszaninę soli w wodzie demineralizowanej z dodatkiem substancji aktywnej, a następnie umieszczeniu w nim modelu badawczego ryby i utrzymywaniu w medium odżywczym do uzyskania pożądanego stopnia odbarwienia, korzystnie całkowitego odbarwienia, **znamienny tym**, że jako substancję aktywną w medium stosuje się izoetarynę w postaci soli kwasu mesylowego, w ilości od 1,7106 g do 5,0313 g na 1 L wodnego roztworu medium hodowlanego (E3), odpowiadający stężeniu izoetaryny w zakresie od 5,1 mM do 15 mM.
2. Sposób wg zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako mieszaninę soli stosuje się sole: NaCl, KCl, (CaCl₂ · 2H₂O), (MgCl₂ · 6H₂O) lub MgSO₄.
3. Sposób wg zastrz. 1, **znamienny tym**, że w roztworze z dodatkiem izoetaryny umieszcza się ryby Danio rerio natychmiast po zapłodnieniu na okres od 96 do 120 godzin po zapłodnieniu, korzystnie 96 godzin po zapłodnieniu.
4. Sposób wg zastrz. 1, **znamienny tym**, że temperatura medium odżywczego, w którym umieszczone są ryby wynosi 20–29°C.
5. Sposób wg zastrz. 1, **znamienny tym**, że medium odżywcze z mieszaniną soli posiada pH na poziomie: 6,9–7,5.
6. Sposób wg zastrz. 4, **znamienny tym**, że pH 6,9–7,5 uzyskuje się za pomocą wodnego roztworu wodorotlenku, korzystnie NaOH.
7. Zastosowanie izoetaryny do depigmentacji modelu badawczego ryby z gatunku danio pręgowanego wykorzystywanej do celów monitorowania rozwoju fizjologicznego/biologicznego oraz do celów diagnostycznych.

Rysunek



Rys. 1