

КСЕНОГРАФТЫ *Danio rerio* В ОНКОЛОГИИ И ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЕ

© 2024 г. Н. А. Лунина^а, *, Д. Р. Сафина^а, С. В. Костров^а

^аНациональный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

*e-mail: lunina-na.img@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.11.2023 г.

После доработки 11.12.2023 г.

Принята к публикации 15.12.2023 г.

Костистая рыба *Danio rerio* (полосатый данио) стала одним из важных модельных организмов, используемых в биомедицинских исследованиях опухолей, в том числе и для разработки противоопухолевых препаратов с применением ксенотрансплантационных подходов. Внеутробное развитие данио, прозрачные ткани в первый месяц роста, а также незрелая адаптивная иммунная система в этот период значительно облегчают манипуляции с эмбрионами. В случае высокоагрессивных опухолей, когда прогнозируемая выживаемость пациента может составлять всего несколько месяцев, анализ ксенотрансплантата в данио может стать единственным подходящим методом, поскольку он требует всего 4–7 дней. Тысячи эмбрионов данио могут быть имплантированы биопсийной тканью пациента для получения ксенографтов и проведения с их помощью автоматизированного скрининга большого количества лекарственных препаратов и соединений для выработки эффективной схемы лечения конкретного больного. В представленном обзоре рассмотрены преимущества и недостатки *D. rerio* в качестве модели для онкологических исследований. Основное внимание уделено использованию ксенографтов *D. rerio* для изучения метастазирования и создания аватаров в персонализированной медицине.

Ключевые слова: злокачественные опухоли человека, *Danio rerio*, ксенографты, метастазирование, аватар, персонализированная медицина

DOI: 10.31857/S0026898424030032, EDN: JDCUGG

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания остаются одной из главных проблем мирового здравоохранения, занимая второе место по смертности в развитых странах [1]. Трудность эффективного лечения этих заболеваний в значительной степени обусловлена гетерогенностью опухолей. Опухоли одного и того же гистологического типа могут иметь отличия у разных пациентов (межиндивидуальная гетерогенность), обусловленные главным образом особенностями генетического ландшафта и мутациями в раковых клетках [2]. Эта общая гетерогенность усиливается внутриопухолевой гетерогенностью, вызванной изменчивостью клеток внутри опухоли и характерной для большинства типов опухолей. Причиной таких различий могут быть вариации генома, транскриптома, протеома и эпигенома [3]. В целом разнообразие опухолей проявляется в активации разных сигнальных путей, в разной способности к миграции, инвазии, метастазированию и, что особенно важно, в чувствительности или резистентности к терапевтическим воздействиям [4]. Поэтому за последние десятилетия проведены как *in vitro*, так и *in vivo* исследования различных типов опухолей, направленные на стимуляцию разработки новых более эффективных

терапевтических средств. Основное преимущество использования живых организмов перед моделями *in vitro* заключается в прямом взаимодействии опухолевых клеток и хозяйского организма, что позволяет изучать как опухоль, так и ее микроокружение, а также такие свойства, как метастатический потенциал, ангиогенез или лекарственную устойчивость [5, 6]. Более того, моделям *in vitro* не хватает клинической прогностической способности [7]. Модели *in vivo* позволяют точнее моделировать сложность опухоли, поскольку клетки имплантируются в живой организм, где могут подвергаться различным динамическим взаимодействиям. Это представляет собой явный контраст с моделями *in vitro*, где взаимодействия ограничены клетками, уже присутствующими в опухоли, или искусственно реконструируются и поддерживаются путем добавления больших количеств (часто не физиологических) цитокинов, факторов роста, сыворотки, питательных веществ и т.д.

В живом организме, в котором работают сердце, кровеносная и лимфатическая системы, печень, костный мозг, почки, ЦНС и другие органы, опухоли могут вступать как в локальные, так и в системные межклеточные взаимодействия, обеспечивающие их прогрессирование. Эти взаимодействия между опухолью и хозяином могут происходить на

больших расстояниях, что позволяет воспроизвести такие свойства опухолевых клеток, как миграция, инвазия, метастазирование, ангиогенез, угнетение иммунной системы, которые невозможно наблюдать *in vitro* [8]. Наиболее часто в качестве различных доступных *in vivo* моделей выбирают мышей [9]. Однако в последние годы все чаще с этой целью используют аквариумную рыбку *Danio rerio* (полосатый данио, или данио) [10], в том числе для ксенотрансплантации опухолевых клеток человека и разработки лекарственных средств [11]. Большой вклад *D. rerio* в исследования рака и поиск методов борьбы с ним подтверждается сообщениями более чем о 300 проектах, направленных на получение противоопухолевых средств с использованием этого организма [12]. Особенно система *D. rerio* привлекает своими возможностями в персонализированной медицине для создания аватаров пациентов. Ксенографты пациента (patient-derived xenograft – PDX), также называемые раковыми аватарами [13], генерируются путем имплантации первичных опухолевых клеток или фрагментов тканей человека, полученных в результате хирургического вмешательства или биопсии.

Анализ аватаров идеально подходит для персонализированной медицины. Хотя прецизионную онкологию и персонализированную медицину часто считают синонимами, они сосредоточены на разных аспектах одной и той же проблемы. Прецизионная онкология фокусируется главным образом на поиске продуктов специфических генов-биомаркеров для эффективных методов лечения [14]. Однако каждый отдельный пациент при этом не учитывается. В персонализированной медицине, напротив, на живые клетки, полученные от пациента, воздействуют лекарственными препаратами, ответ на которые может быть оценен в режиме реального времени, а результаты непосредственно перенесены в клинику. В связи с этим необходимо использовать преимущества обоих подходов: прецизионная онкология сократит набор возможных вариантов лечения, а затем персонализированные тесты на аватарах определят наилучший вариант [7].

Наиболее часто в онкологических исследованиях используется моделирование на грызунах, в том числе и создание аватаров. Однако они обременены рядом ограничений, которые включают длительное время ожидания потомства и его ограниченное количество, длительное время получения аватаров опухолей человека (несколько месяцев и даже до года), а также высокую стоимость исследований. Учитывая все это, очевидными становятся многие преимущества маленькой пресноводной рыбки *D. rerio*, которые позволяют включать ее в исследования злокачественных новообразований [15].

В клинических условиях использование модели данио-аватара (zPDX) может происходить по

следующей схеме: пациенту с диагностированной злокачественной опухолью проводят биопсию с последующим получением суспензии единичных опухолевых клеток и вводят эти клетки в большое количество эмбрионов данио. Далее анализируют влияние различных комбинаций химиотерапевтических соединений на рост ксенотрансплантированных клеток с целью выработки оптимальной схемы терапии [16].

В настоящем обзоре рассмотрены преимущества и недостатки модели *D. rerio* в онкологических исследованиях. Основное внимание уделено ксенотрансплантации опухолей человека в *D. rerio* и использованию этой модели для изучения метастазирования и создания аватаров для персонализированной медицины.

ОСОБЕННОСТИ МОДЕЛИ *Danio rerio* В ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Популярные аквариумные рыбки *D. rerio* широко используются в научных исследованиях, причем более 800 лабораторий в мире применяют их в качестве модельных объектов для изучения различных заболеваний [5]. С 1960-х годов *D. rerio* традиционно служили модельными организмами в биологии развития и генетике позвоночных [17]. Затем их использование распространилось и на другие области, включая моделирование заболеваний человека [16].

D. rerio имеют высокую генетическую гомологию с человеком. Секвенированный геном этой рыбки (25 пар хромосом) содержит 26206 генов, кодирующих белки, среди которых много ортологов генов человека: 71,4% генов человека имеют по крайней мере один ортолог у данио. Установлено, что 82% генов человека, связанных с заболеваниями, имеют по крайней мере один ортолог в *D. rerio*, что делает этот организм подходящим для моделирования болезней человека [18, 19]. Кроме того, множественные эпигенетические маркеры, регулирующие экспрессию генов, консервативны у позвоночных, включая рыб и человека [20]. Основные органы и ткани данио и человека (мозг, сердце, почки, мышцы, печень) обладают сходством как на анатомическом и физиологическом, так и на молекулярном уровне [21–24].

Рыбки *D. rerio* имеют небольшой размер, их можно разводить в больших количествах при относительно низких затратах. Лабораторные данио, как правило, содержатся в специальных аквариумных системах, где поддерживается температура 26–28°C с контролируемым циклом свет–темнота. Они очень плодовиты, беременная самка может откладывать сотни икринок 1 раз в 1–2 недели в результате естественного нереста. Эмбриональное развитие проходит быстро, в течение 24 ч одноклеточная зигота превращается в подвижный

прозрачный эмбрион с классическим строением тела позвоночных [25]. При температуре около 28°C большая часть морфогенеза завершается через 3 дня после оплодотворения, и эмбрион вылупляется из защитного хориона. Это знаменует переход от эмбриональной стадии к личиночной. Личинки продолжают расти, между 5 и 6 днями после оплодотворения пищеварительная система и рот начинают функционировать. Желточный мешок, который поддерживал животное на эмбриональной и ранней личиночной стадиях, к этому времени истощается и полностью исчезает к 7 дню после оплодотворения [25]. *D. rerio* считаются молодыми, когда они приобрели большинство характеристик взрослых особей, и взрослыми, когда они могут производить жизнеспособные гаметы и воспроизводиться [26]. В оптимальных условиях они достигают половой зрелости на третьем месяце своего развития.

Несколько характеристик *D. rerio* делают их хорошей моделью для исследования биологии и метастазирования опухолей человека. Многие из факторов, участвующих в прогрессии опухолей, очень консервативны у данио и у человека. Консервативность генов клеточного цикла, опухолевых супрессоров и онкогенов позволяет изучать эти опухолевые пути у рыб, однако следует отметить, что у данио не экспрессируются ортологи нескольких генов человека, которые, как известно, участвуют в развитии рака, такие как фактор ингибирования лейкемии (LIF), онкостатин М (OSM) и белок 1, связанный с ранним развитием рака молочной железы (BRCA1) [18]. Однако поскольку гены рецепторов этих белков присутствуют в геноме *D. rerio*, можно предположить, что существуют и белки с функциями, подобными LIF и OSM, но разнообразие их последовательностей слишком велико, чтобы распознавать их как ортологи.

Важно отметить дупликацию генома костистых рыб после расхождения рыб и млекопитающих [27], которая привела к тому, что геном *D. rerio* содержит две копии многих генов (известных как *ohnologues*), а геном млекопитающих только одну.

С *D. rerio* можно проводить различные генетические манипуляции, включая нокдаун, нокаут, сверхэкспрессию генов и трансгенез, что позволяет создавать и изучать модели опухолей. Важно отметить сходство гистопатологии опухолей человека и данио [28]. Быстрое внеутробное развитие оплодотворенной яйцеклетки делает возможной прямую визуализацию и манипуляции на протяжении эмбриогенеза и развития личинок, а прозрачность животного на этих стадиях в сочетании с генерацией трансгенных флуоресцентных линий позволяет проводить визуализацию *in vivo*, контролировать опухоль и ее микросреду в режиме реального времени. Это одно из самых значимых преимуществ

в использовании *D. rerio* для изучения биологии рака [15].

Созревание врожденной и адаптивной иммунных систем у данио разделено во времени. Врожденная иммунная система начинает функционировать на второй день после оплодотворения, однако адаптивная иммунная система созревает только на 28 день [29]. Отсутствие адаптивного иммунитета у личинок делает их идеальной *in vivo* моделью для ксенотрансплантации раковых клеток. Таким образом можно исследовать пролиферацию, инвазию и метастазирование введенных клеток, взаимодействие между донорскими и хозяинскими клетками, а также с внеклеточной средой.

Хотя многие характеристики делают *D. rerio* подходящей животной моделью для исследования рака, существуют и некоторые особенности, такие как температура инкубации, отсутствие некоторых органов или их компонентов.

Поскольку клетки человека культивируют при 37°C, а оптимальная температура для данио составляет 28°C, необходимо использовать температуру 28–37°C. Однако при этом могут произойти метаболические изменения, которые следует принимать во внимание [30].

Ортотопическая ксенотрансплантация заключается в инъекции опухолевых клеток человека в область, гомологичную месту их происхождения (например, клетки опухоли мозга человека, трансплантированные в мозг *D. rerio*). Ортотопические инъекции более надежно имитируют заболевание человека, поскольку клетки развиваются в сходном анатомическом участке. Многие исследователи успешно использовали этот метод в случае клеток ретинобластомы и глиобластомы [31, 32]. Однако данный подход не может быть применен к каждому типу клеток и к каждой ткани из-за отсутствия у рыб определенных органов, например молочной железы или легкого.

Наконец, микроокружение опухоли (tumor microenvironment, TME) следует учитывать при анализе ксенотрансплантата, независимо от используемого хозяина. TME включает клеточные и неклеточные компоненты, окружающие опухоль и содержащиеся внутри нее, которые, как правило, представлены раковыми клетками, нераковыми клетками (например, фибробластами, эндотелиальными клетками или иммунными клетками) и белками внеклеточного матрикса. TME представляет собой участок или среду, где взаимодействие клеток хозяина и опухоли играет ключевую роль в росте и прогрессировании опухоли [33]. Эти взаимодействия важно учитывать, чтобы максимально имитировать TME человека и максимально использовать весь потенциал введенных клеток, что позволит изучать их поведение в условиях, приближенных к реальным.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ОПУХОЛЕЙ ПУТЕМ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ В *D. rerio*

Ксенотрансплантационная модель *D. rerio* zPDX

Ксенотрансплантационные модели опухолей в *D. rerio* получают путем введения меченых злокачественных клеток человека в различные области эмбрионов, личинок или взрослых рыб для отслеживания их прогрессирования, поведения и взаимодействия с микросредой хозяина [34, 35]. В 2005 году впервые недифференцированные клетки меланомы человека ксенотрансплантировали в *D. rerio* и проанализировали их “поведение”. Клетки меланомы вводили эмбрионам на стадии бластулы и контролировали во времени. Опухолевые клетки человека выживали, делились и специфически мигрировали внутри эмбрионов подобно тому, как клетки меланомы распределяются в их оптимальной среде — коже. Организм данио поддерживал трансплантированные клетки необходимыми сигналами для специфической интеграции в органы, демонстрируя непосредственное взаимодействие клеток человека с микроокружением [36]. Таким образом, впервые была показана совместимость клеток человека и клеток эмбрионов рыбы и подчеркнута потенциальная ценность *D. rerio* как инструмента для исследования рака. В дальнейшем эти выводы были подтверждены, и был разработан первый стандартизированный протокол ксенотрансплантации в *D. rerio* [35, 37]. Наилучшей для трансплантации оказалась стадия развития эмбриона 48 ч после оплодотворения, поскольку к этому сроку завершается миграция развивающихся клеток эмбриона, и распространение раковых клеток после инъекции, вероятно, будет активным процессом [37]. К тому же, второй день после оплодотворения считается наиболее подходящим для ксенотрансплантации из-за следующих особенностей модели:

- адаптивная иммунная система данио становится зрелой через 4–6 недель после оплодотворения и в течение первых 12–14 дней развития представлена только врожденными иммунными клетками. Таким образом, для приживания опухолевых клеток человека в первые 2 недели после оплодотворения *D. rerio* не требуется иммуносупрессия; опухолевые клетки могут эффективно пролиферировать и метастазировать в неизменном хозяине и даже взаимодействовать и поляризовать врожденные иммунные клетки данио, такие как макрофаги [29, 38];

- прозрачность эмбрионов позволяет визуализировать опухолевые клетки как флуоресцентно меченные посредством конститутивной экспрессии флуоресцентного белка (RFP или GFP), так и окрашенные липофильными красителями (DiI, DiD, DiO) [39, 40];

- раковые клетки человека могут взаимодействовать с эмбриональными клетками *D. rerio* благодаря межклеточной коммуникации, общей у этих двух видов. Об активности взаимодействий клетка–хозяин, таких как взаимодействие между раковыми клетками и иммунной системой, можно судить по привлечению нейтрофилов и макрофагов в область опухоли [41].

В соответствии с разработанным стандартным протоколом предпочтительным местом инъекции является желточный мешок, при этом анализ альтернативных областей трансплантации показал, что они одинаково эффективны [42, 43]. Выбор места инъекции зависит от типа вводимых клеток, биологического фенотипа или события, которое предполагается изучить. Основные места инъекций перечислены ниже.

(А) Желточный мешок. Этот бесклеточный компартмент, состоящий из таких липидов, как холестерин, фосфатидилхолин или триглицериды, обеспечивает рыб энергией до тех пор, пока они не смогут самостоятельно питаться, что происходит на 5-й день после оплодотворения [44]. Липиды представляют собой источник питательных веществ и для введенных раковых клеток человека, способствуя их пролиферации и росту опухоли. Кроме того, желточный мешок — это ограниченное пространство, в котором меченые клетки можно легко визуализировать в течение нескольких дней. Таким образом, инъекция в желточный мешок используется при изучении выживаемости, клеточного деления, пролиферации и миграции (если клетки подвижны) [45].

(Б) Проток Кювье (общая кардинальная вена). При инъекции в проток Кювье клетки попадают непосредственно в кровоток, поэтому такие стадии онкогенного процесса, как метастазирование/миграция, инвазия и мезенхимально-эпителиальный переход, могут быть оценены *in vivo* [46]. Клетки также можно вводить в периваскулярное пространство протока для оценки эффективности интравазации. В кровотоке клетки способны выживать, делиться, экстравазировать вблизи каудальной кроветворной ткани (caudal hematopoietic tissue, СНТ), расположенной в хвосте эмбриона, и образовывать опухоли [46]. Меченые клетки можно отслеживать и количественно определять их пролиферацию и инвазию в СНТ [47]. СНТ представляет собой специфическую нишу, благоприятную для развития опухоли [48].

(В) Перивителлиновое пространство. Расположенное между перидермой и синцитиальным слоем желтка перивителлиновое пространство не содержит сосудов и не сообщается непосредственно с областью сосудистой сети. Помимо пролиферации и образования опухоли, инъекция опухолевых клеток в этот участок позволяет однозначно идентифицировать новообразованные сосуды [35, 37].

Кроме того, можно оценить также эффективность интравазации, дальнейшей миграции и метастатического поведения опухолевых клеток [47, 49].

Сравнительное исследование мест инъекции для ксенотрансплантации опухолевых клеток в *D. rerio* показало, что опухоли лучше формируются и растут при выборе перивителлинового пространства [50]. Кроме того, введенные глубоко в желток опухолевые клетки труднее распознать, чем опухолевые клетки в довольно поверхностном перивителлиновом пространстве. Однако вводить клетки в перивителлиновое пространство технически сложнее.

(Г) Внутривителлиновая полость. Как указывалось ранее, опухолевые клетки обычно инъецируют в эмбрионы *D. rerio*, у которых еще не сформировалась адаптивная иммунная система, тогда как при ксенотрансплантации взрослым рыбам требуется подавление иммунной системы; в этой ситуации инъекции выполняют непосредственно во внутривителлиновую полость.

Ксенотрансплантация во взрослых *D. rerio*. Преимущество ксенотрансплантации взрослым рыбам заключается в том, что зрелые ткани более точно соответствуют тканевой среде, в которой находятся раковые клетки. До недавнего времени использование для ксенотрансплантации взрослых особей было ограничено необходимостью подавления их иммунной системы либо γ -облучением, либо дексаметазоном [51, 52]. Но в настоящее время получены линии *D. rerio* с ослабленным иммунитетом, например оптически транспарентная линия *Casper* (*prkdc*^{-/-}, *il2rga*^{-/-}), особям которой можно прививать опухолевые клетки человека [53].

Параллельные сравнительные ксенотрансплантации рабдомиосаркомы иммунодефицитным рыбам и мышам выявили в обоих случаях сходную дозозависимость и кинетику при комбинированной терапии темозоломидом (TMZ) и олапарибом [54]. Примечательно, что гистологические и молекулярные особенности полученных ксенографтов были сопоставимыми в обеих моделях. Однако ксенографты *D. rerio* обладают заметными экспериментальными преимуществами по сравнению с мышинной системой. Рыбки меньше по размеру, их содержание обходится дешевле. Самое главное, ксенографты данио могут быть визуализированы с разрешением в одну клетку, что позволяет отслеживать в режиме реального времени поведение отдельных клеток, изменения их морфологии, миграции и динамики клеточного цикла [54]. Особенно удобно в ксенотрансплантационной модели использовать трансгенные линии рыб с флуоресцентно меченными органами и тканями, что позволяет детально исследовать взаимодействие опухолевых клеток с микроокружением. Кроме того, для более адекватной оценки таких взаимодействий создаются линии гуманизированных *D. rerio*, например,

путем введения генов цитокинов, специфичных для кроветворения человека и отсутствующих у данио [55].

Температура содержания zPDX. Одним из основных недостатков модели ксенотрансплантации клеток человека в *D. rerio* остаются температурные ограничения, связанные с хозяином. Температура инкубации эмбрионов была предметом обсуждения с момента создания этого метода в 2005–2006 годах [36, 37]. Эмбрионы данио развиваются при температуре 28°C в контролируемых условиях, а раковые клетки человека размножаются и растут при 37°C. По этой причине исследователи искали “температуру баланса” между оптимальным развитием эмбрионов рыб и клеток человека [35].

Чтобы обеспечить температуру, более оптимальную для введенных клеток человека, стандартную температуру инкубации эмбрионов после проведения ксенотрансплантации увеличили до 34°C, сократив при этом время инкубации до 3–6 дней после инъекции [56–60] из-за повышенной гибели эмбрионов [61]. В большинстве опубликованных исследований использовали стандартный протокол — 34°C и 6 дней инкубации. Однако некоторые исследователи модифицировали этот стандартный протокол, чтобы попытаться адаптировать его к различным экспериментальным условиям в зависимости от того, что требуется проанализировать или оценить [62–64]. Температуру инкубации эмбрионов после ксенотрансплантации повышали до 35–36°C, а время анализа сокращали до 3–4 дней после инъекции из-за повышения смертности [62, 64–69]. Хотя методологическое препятствие было преодолено, повышение температуры инкубации эмбрионов могло влиять на некоторые метаболические пути. Изучение регуляции генов при повышении температуры выявило увеличение экспрессии генов, связанных с катаболизмом липидов и окислительно-восстановительными процессами, а также модуляцию экспрессии генов, связанных с иммунной системой, что может влиять на введенные опухолевые клетки [30].

Взаимодействие между опухолевыми и иммунными клетками в zPDX. Несмотря на отсутствие адаптивной иммунной системы, эмбрионы данио обладают врожденной иммунной системой, состоящей из макрофагов и нейтрофилов, которые к 48 ч после оплодотворения распределяются по всему эмбриону [59, 70]. Изучение взаимодействий макрофагов и нейтрофилов данио с клетками опухоли человека показало, что эти иммунные клетки участвуют в ангиогенезе и метастазировании, в том числе за счет сопровождения раковых клеток в циркуляции и облегчения их миграции и инвазии в метастатические ниши [71, 72].

Для более глубокого изучения взаимодействий между злокачественными клетками человека и иммунными клетками хозяина получены трансгенные

линии *D. rerio*, в том числе *Tg(mpx:GFP)ⁱ¹¹⁴* [73] с маркированными нейтрофилами, *Tg(mpeg1:eGFP)^{g122}* [74] и *Tg(mpeg1:mCherry)^{UMSF001}* [75] с маркированными макрофагами, *Tg(fli1:eGFP)^{y1}* [76]; *Tg(flk1:eGFP)^{s843}* [77]; *Tg(flk1:mCherry)* с маркированным эндотелием сосудов [78]. С помощью стерео- и конфокальной микроскопии можно легко отслеживать в режиме реального времени не только отдельные клетки, но также образование и рост новых сосудов [79]. Когда опухолевые клетки вводят непосредственно в кровотоки через дистальную ветвь протока Кювье или в перивителлиновое пространство, наблюдается их пролиферация и инвазия в СНТ [47]. Затем иммунные клетки *D. rerio* рекрутируются в область опухоли в СНТ, таким образом увеличивается количество нейтрофилов и макрофагов, которые инфильтрируют и окружают участок опухоли [41]. Показано, что иммунные клетки колокализуются с опухолевыми как в месте первичного роста опухоли, так и в местах микрометастазирования. Опухолевые и иммунные клетки взаимодействовали с эндотелиальными клетками протока Кювье, образуя структуры, подобные новым сосудам, которые впоследствии формировали функциональную сосудистую сеть [80]. На моделях как *D. rerio*, так и мышей обнаружен перенос содержимого цитоплазмы макрофагов в опухолевые клетки, и этот процесс коррелировал с усилением распространения клеток меланомы [81]. На модели zPDX меланомы показано, как опухолевые клетки мигрировали из места инъекции (желточного мешка), взаимодействовали с эндотелием кровеносных сосудов и формировали вторичные опухоли из единичных клеток [48]. Использование линий с репортерными макрофагами позволило обнаружить взаимодействие между ними и кровеносными сосудами, а также положительную корреляцию между количеством иммунных клеток, рекрутируемых в очаг опухоли, и степенью ангиогенеза [82].

Таким образом, использование линий *D. rerio* с репортерными сосудистой сетью, макрофагами и нейтрофилами позволяет визуализировать в реальном времени прогрессирование опухолевых клеток и их миграцию, индуцированный опухолью ангиогенез и взаимодействие опухолевых клеток с клетками хозяина с разрешением до одной клетки [83].

Имитация тканевой ниши — ортотопическая ксенотрансплантация. Имплантация опухолевых клеток человека в гомологичный месту образования опухоли орган модельного организма для имитации исходной тканевой ниши называется ортотопической ксенотрансплантацией [84]. Важными характеристиками конкретной тканевой ниши являются строение внеклеточного матрикса, а также такие параметры, как pH и межклеточное давление [33]. Показано, что изменения внеклеточного матрикса влияют на клеточную пролиферацию, миграцию, ангиогенез и метастазирование [85, 86].

В одной из первых ортотопических ксенотрансплантаций в *D. rerio* клетки глиобластомы человека ввели в головной мозг данио и обнаружили важные различия в поведении опухолевых клеток. При ортотопической ксенотрансплантации клетки глиобластомы проникали в мозг, а также рассеивались по поверхности его кровеносных сосудов, но те же клетки, введенные в желточный мешок, не могли пролиферировать и проникать в окружающие ткани [87]. Эти результаты согласуются с тем фактом, что в желточном мешке *D. rerio* отсутствуют миелинизированные участки аксональной поверхности, которые вместе с кровеносными сосудами представляют собой пути распространения клеток глиобластомы в головном мозге [88]. Дополнительные технические достижения, такие как покадровая конфокальная микроскопия и методы количественной оценки прогрессирования опухоли и клеточных взаимодействий в 4D, привели к лучшему пониманию поведения опухолевых клеток человека в мозге данио [89]. zPDX глиобластомы человека послужила инструментом для идентификации матриксной металлопротеиназы 9 (ММР-9) как основного фактора повышенной инвазивности этих клеток. При этом подтверждена эффективность ингибитора ММР-9 в сдерживании распространения раковых клеток [90].

Также ортотопическую ксенотрансплантационную модель *D. rerio* успешно применили для изучения ретинобластомы, наиболее распространенной злокачественной опухоли глаза у детей [91–93]. Кроме того, недавно получена новая модель ортотопической ксенотрансплантации для изучения меланомы конъюнктивы путем ретроорбитальной инъекции [83].

Все эти результаты доказывают значимость модели ортотопической ксенотрансплантации *D. rerio* для изучения прогрессирования опухоли, миграции, ангиогенеза в зависимости от тканевого микроокружения. Однако, как упоминалось выше, в *D. rerio* представлены не все органы человека (например, нет молочной железы или легкого), поэтому этот метод применим не ко всем типам опухолей.

Изучение метастазирования на модели zPDX

Метастазирование — это сложный многоступенчатый процесс, включающий инвазию и отделение клеток от первичной опухоли, проникновение в кровеносные или лимфатические сосуды, экстравазацию в заранее определенные вторичные ткани, приживание в новом микроокружении и, в конечном счете, пролиферацию опухолевых клеток [94–96]. Существование внутри- и межопухолевой гетерогенности предполагает, что механизмы метастазирования могут варьировать как у разных пациентов, так и в различных типах клеток даже в пределах одной и той же опухоли [97, 98].

Модель zPDX широко используется для изучения различных аспектов метастазирования опухолей. Предпочтительным местом скопления трансплантированных клеток в теле *D. rerio* является вентрально-каудальная сосудистая сеть, поэтому для оценки миграции (метастазирования) обычно подсчитывают количество эмбрионов с мечеными опухолевыми клетками в хвосте. Таким образом были выявлены терапевтические мишени нескольких типов рака (пути YAP–CXCR2 [99, 100] и PIT1–CXCR4 [101, 102]), а также потенциальные лекарственные средства (ингибиторы путей CXCR2 и CXCR4 [103]) и новые методы лечения [104–108].

Оценка с помощью визуализации с субклеточным разрешением [109] позволяет изучать разные стадии метастазирования, включая взаимодействие с микроокружением опухоли, секрецию внеклеточных везикул (экзосом), транспортировку по сосудам, остановку опухолевых клеток, экстравазацию, проникновение внеклеточных везикул в предметастатическую нишу и метастатическую колонизацию.

Ангиогенез, индуцированный опухолью. Модели zPDX эмбриональных и взрослых особей могут использоваться для изучения механизмов ангиогенеза, индуцированного опухолью. Неоангиогенез в местах первичных и метастатических опухолей является ключевым фактором распространения и прогрессирования рака. Считается, что неоангиогенез происходит после запуска “ангиогенного переключателя”. В этот момент колония опухолевых клеток достигает размера, при котором в ней развивается гипоксия, и для обеспечения роста опухоли необходима перфузия питательными веществами и кислородом [110].

Исследования zPDX показали, что микроопухоли сначала прорастают бескровными “эндотелиальными тяжами” в течение 6–7 дней, прежде чем в них устанавливается кровоток [111]. Интересно, что ингибирование образования эндотелиальных тяжей и их проникновения в опухоль привело к значительному уменьшению роста опухоли. Необходимость взаимодействия между раковыми и эндотелиальными клетками для инициации опухоли также может указывать на наличие потенциальных периваскулярных ниш – среды, способствующей выживанию опухолевых клеток, прогрессированию и устойчивости опухоли к терапии [112]. Индукция неоангиогенеза опухолевыми клетками человека в организме *D. rerio* зависит от количества таких клеток и окружающей микросреды [113].

Изучение двух линий рака эндометрия с разным уровнем экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) и фактора роста фибробластов (fibroblast growth factor, FGF) выявило индукцию ангиогенеза у 75% личинок *D. rerio* при ксенотрансплантации клеток только высокоангиогенной линии [114]. Причем как

гипоксия, так и сверхэкспрессия VEGF значительно увеличивали метастазирование. Авторы пришли к выводу, что неоангиогенез, индуцированный VEGF и гипоксией, является решающим событием при метастазировании. Эти исследования доказали роль передачи сигналов VEGF на начальных стадиях неоангиогенеза и метастазирования.

Использование антиангиогенных соединений, применяемых у млекопитающих, уменьшало неоваскуляризацию всех личинок zPDX, не влияя на физиологическое развитие сосудов [34].

Интравазация. Одной из начальных стадий метастазирования является интравазация опухолевых клеток в сосуды. Использование модели zPDX позволило визуализировать процесс интравазации и изучить его в режиме реального времени. Инъекция флуоресцирующих опухолевых клеток человека в брюшную полость одномесечных данио, получавших дексаметазон (для индукции иммуносупрессии), привела к образованию микроопухоли в месте инъекции [51]. Один из генов, связанных с метастазированием, ген *RhoC*, кодирует малую GTPазу семейства Rho, которые контролируют актин/миозиновый цитоскелет. Оказалось, что экспрессия *RhoC* индуцирует примитивную амебоподобную клеточную инвазию, характеризующуюся образованием динамических мембранных выступов и пузырьков. Удивительно, но эти структуры проникают в стенку кровеносного сосуда исключительно в местах сосудистого ремоделирования, а не в областях уже существующих интактных сосудов. Поэтому для интравазации требуется, чтобы опухолевые клетки секретировали VEGF, индуцирующий “открытие” сосудов для доступа *RhoC*-экспрессирующих клеток в кровеносную систему [51]. Таким образом, на ранних этапах интравазации и метастазирования необходимы два независимых события: (1) динамическая регуляция актин/миозинового цитоскелета в опухолевой клетке для формирования выступающих структур и (2) проницаемость и ремоделирование сосудов.

На модели zPDX подтверждено также участие в интравазации ассоциированных с опухолью макрофагов (tumor-associated macrophages (TAM)) [115, 116]. Совместное введение TAM и раковых клеток в *D. rerio* показало, что макрофаги активно влияют на метастазирование путем прямых межклеточных взаимодействий. Причем в сосудистой сети большинство диссеминированных опухолевых клеток тесно связаны с макрофагами, активированными IL6 и TNF α , увеличивающими интравазацию [117].

Циркулирующие опухолевые клетки и их экстравазация. После интравазации опухолевые клетки составляют субпопуляцию циркулирующих опухолевых клеток (circulating tumor cell, CTC), которая фенотипически отличается от первичной опухолевой массы, что позволяет CTC выживать в кровотоке. Очевидно, что для полного понимания

поведения СТС необходимо исследование этих клеток в живом организме. Модель *D. rerio* позволяет получить изображение единичных СТС, изучить их поведение и роль в формировании микрометастазов в реальном времени. Показано, что замедление кровотока способствует адгезии СТС к эндотелию и может приводить к экстравазации и образованию метастазов [118, 119]. Было неясно, как экстравазируют опухолевые клетки. Обладают ли многоклеточные скопления опухолевых клеток способностью выходить целиком, или сначала они должны диссоциировать? Исследование, оценивающее эту трудноуловимую стадию метастазирования на модели zPDX, выявило два типа экстравазации клеток [120] — обычную экстравазацию по типу инвазии и экстравазацию по типу эндотелиального покрытия, когда клетки эндотелия покрывают СТС и обеспечивают экстравазацию. Ингибирование передачи сигналов VEGF нарушало экстравазацию инвазивного типа, подавляя поляризацию и подвижность раковых клеток. Однако при этом наблюдалась стимуляция, а не ингибирование экстравазации раковых клеток по типу эндотелиального покрытия со структурными изменениями в эндотелиальных стенках. Эти результаты могут стать ключом к лучшему пониманию метастатического процесса, в том числе ускорения метастазирования антиангиогенными реагентами, наблюдаемого в доклинических исследованиях [120].

На модели zPDX доказано, что СТС обладают способностью выходить из кровеносных сосудов как в виде одиночных клеток, так и в виде многоклеточных кластеров с помощью процесса ангиопеллеза, который заключается в перестройке сосудистой стенки вокруг циркулирующих клеток и в активном вытеснении этих клеток в окружающие ткани [121]. СТС прикрепляются посредством адгезии к эндотелию просвета кровеносного сосуда и активируют сосудистое ремоделирование, что позволяет проникать в окружающие ткани либо единичным клеткам, либо многоклеточным скоплениям [122]. Таким образом, раковые клетки могут экстравазировать как в виде кластеров, так и отдельных клеток, причем СТС, которые попадают в кровоток уже в виде кластеров, имеют более высокую способность к выживанию и больший потенциал метастазирования по сравнению с одиночными циркулирующими клетками [123]. В zPDX модели меланомы было замечено, что клетки, которые выходят из сосудов в виде кластеров, образуют большие опухолевые массы, чем те, которые существовали в виде отдельных клеток [121, 124]. В кластерах СТС усиливаются межклеточная адгезия, стволовость и пролиферация. К тому же понижаются апоптоз и пути иммунной активации, такие как презентация антигенов главного комплекса гистосовместимости типа II, активация Т-клеток и передача сигналов фактора некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF) [125].

Изучение динамики экстравазации опухолевых клеток, введенных в перикард эмбрионов *D. rerio*, выявило пассивную задержку клеток в мелких капиллярах в области головы и хвоста примерно в первые 3–5 ч с последующей активной миграцией вдоль стенки сосудов [126]. Экстравазация — это высокодинамичный процесс, который включает модуляцию адгезии опухолевых клеток к эндотелию и внутрисосудистую миграцию клеток вдоль поверхности просвета сосудистой стенки. Опухолевые клетки не повреждают сосуды в месте экстравазации, скорее они индуцируют локальное ремоделирование сосудов, характеризующееся скоплением эндотелиальных клеток и межклеточных контактов. Внутрисосудистое перемещение опухолевых клеток не зависит от направления кровотока и требует опосредованной β 1-интегрином адгезии к стенке кровеносного сосуда. Интересно, что экспрессия прометастатического гена *Twist* в опухолевых клетках увеличивает их внутрисосудистую миграцию и экстравазацию через стенку сосуда. Однако экспрессия *Twist* заставляет опухолевые клетки переключаться на β 1-интегриннезависимый режим экстравазации. Таким образом, экстравазация модулируется экспрессией прометастатических генов *Twist*, *VEGFA* и *ITGB1* (последний ген кодирует β 1-интегрин) опухолевыми клетками.

Эффективность экстравазации варьирует в разных линиях раковых клеток, что коррелирует с их метастатическим потенциалом. Кроме того, сверхэкспрессия генов *Twist* и *VEGFA*, связанных с метастазированием, приводит к увеличению экстравазации, в то время как подавление β 1-интегрина снижает этот процесс [126].

Распространение и колонизация опухолевых клеток. Некоторые солидные опухоли, например рак молочной и предстательной железы, склонны к метастазированию в костную ткань, однако механизмы этой направленной диссеминации и колонизации не установлены. Существующие модели PDX на мышах (mPDX), позволяющие анализировать ранние метастазы в костной ткани, имеют свои ограничения, особенно в крупномасштабных исследованиях и отслеживании раковых клеток *in vivo* в течение длительного периода. Модель zPDX позволяет преодолеть эти ограничения и изучать распространение клеток множественной миеломы и их скоплений в СНТ [127]. Предполагалось, что СНТ содержит нишу гемопоэтических стволовых клеток, сходную с костным мозгом, и является областью кроветворения у эмбрионов *D. rerio*, участвующей в направлении трансплантированных опухолевых клеток в костный мозг [128]. При этом обнаружена локализация флуоресцентно меченых миеломных клеток в СНТ через 30 мин. после инъекции в сердечную мышцу эмбрионов данио. Изучение экспрессии генов в образце человека и *D. rerio* показало, что клетки, локализованные

в области СНТ, экспрессируют гены компонентов пути IL6, гены адгезии и ангиогенеза на более высоком уровне, чем клетки вне СНТ.

Изучение локализации опухолевых клеток, инъецированных в проток Кювье, в области СНТ выявило участие нейтрофилов и макрофагов *D. rerio* (расположенных преимущественно в СНТ) в распространении ксенотрансплантированных раковых клеток [80]. Важно отметить, что ингибиторы VEGFR подавляют локализованный рост опухоли, однако этим они способствуют инвазии опухоли и образованию микрометастазов, усиливая миграцию нейтрофилов.

Оценка метастатического потенциала опухолевых клеток человека в zPDX. Модель zPDX позволяет проводить сравнительные исследования метастатического потенциала различных опухолей человека. Показано, что клетки увеальной меланомы человека, выделенные из метастазов, обладают большей способностью к миграции и пролиферации, чем клетки первичных опухолей [59]. Аналогичные исследования проведены на других видах рака, включая как клеточные линии, так и материал, полученный от пациента. Все клеточные линии анализировали с использованием одной и той же процедуры: опухолевые клетки инъецировали в периваскулярное пространство эмбрионов *D. rerio* с последующим количественным определением метастатических клеток. Оказалось, что степень метастатического потенциала клеток, введенных в *D. rerio*, коррелирует с их инвазивностью *in vitro* [129]. Клеточные линии, классифицированные как неметастатические (например, линия T-47D рака молочной железы и линия HT-29 колоректальной аденокарциномы человека), не дали метастазов и в организме *D. rerio*, а химическое или генетическое подавление инвазивности клеток привело к уменьшению их распространения. В дальнейшем показали, что кусочки ткани, а также суспензии клеток, полученные из опухолей желудочно-кишечного тракта человека (рак поджелудочной железы, толстой кишки и желудка), способны образовывать метастазы при пересадке в желточный мешок эмбрионов *D. rerio*, в отличие от неопухолевых тканей человека [130]. Высокую метастатическую активность раковых клеток наблюдали также при трансплантации клеток первичной опухоли поджелудочной железы в печень личинок *D. rerio*. Однако в мутантной линии *D. rerio*, в которой отсутствуют функциональная сосудистая сеть и кровообращение, опухолевые клетки, пересаженные в желточный мешок, оставались в месте инъекции. Это позволяет предположить, что для распространения клеток необходима сформированная сосудистая система.

Таким образом, модель zPDX можно успешно использовать для оценки метастатического

потенциала различных опухолей человека, что важно для персонализированной медицины.

Аватары *D. rerio*

Что такое аватар? В качестве классических ксенотрансплантатов ранее использовали полученные в лабораторных условиях стабильные линии раковых клеток, которые в большинстве случаев резко отличаются от первичных опухолевых клеток или фрагментов опухоли, полученных от пациента [48]. Возможность использования клеток, полученных от пациента, обеспечило заметный прогресс в области ксенотрансплантологии.

Клетки и первичные культуры опухолей имеют исходно гетерогенные фенотипы и особенности опухолей, из которых они были выделены, что очень важно для дальнейших исследований [131]. Кроме того, в них сохраняются фенотипы, подобные стволовым, что делает их ценным доклиническим инструментом для прогнозирования ответа пациентов на лечение, поскольку известно, что стволовые опухолевые клетки играют важную роль в механизмах лекарственной устойчивости [132]. Рост разработок, предназначенных для лечения конкретных пациентов, делает создание аватаров особенно актуальным [133, 134].

Модель аватара, в которой часть опухоли пациента пересаживается животному или выращивается в виде 3D органоидной культуры, служит функциональным суррогатом этого пациента. Аватары позволяют изучать поведение опухоли и ее чувствительность к лекарственным препаратам, одновременно избавляя пациента от нежелательных побочных эффектов и напрасной траты времени на неэффективную терапию [135]. В настоящее время используют следующие модели опухолей, выделенных от пациентов [136]: (1) культуру клеток пациента (patient-derived cell culture, PDC); (2) сфероиды, полученные от пациента (patient-derived spheroids, PDS), и органоиды, полученные от пациента (patient-derived organoids, PDO); (3) культуры срезов тканей пациента (patient-derived tissue slice cultures, PDTSC); (4) ксенографты, полученные от пациента (patient-derived xenografts, PDX).

mPDX и PDO. Из всех перечисленных моделей наиболее широкое применение получили mPDX и 3D PDO. Эти модели используются уже продолжительное время, но каждая из них имеет существенные ограничения. Известно, что не все образцы опухолей могут быть имплантированы мышам для формирования PDX, а некоторые не выживают даже как PDO. Например, показатель успеха в генерации mPDX рака молочной железы и почек составил 13 и 8.9% соответственно [137], а PDO получены только для 16% образцов рака предстательной железы [138]. Непредсказуемость приживления этих моделей ограничивает их полезность. Но критическим фактором, ограничивающим

применимость этих моделей, является время, затрачиваемое на их разработку, несовместимое с необходимостью быстрого принятия решений в онкологической практике [139]. В Соединенных Штатах среднее время между постановкой диагноза и началом терапии составляет 26 дней при раке толстой кишки и 79 дней при раке предстательной железы [140]. Сроки разработки аватаров mPDX измеряются месяцами, при этом в среднем на их получение требуется 6–8 месяцев [141]. Получение mPDX рака предстательной железы может занять до 37 месяцев, необходимых для внедрения и закрепления у мышей ксенотрансплантатов [142]. Такие сроки невозможны при особенно агрессивных видах рака, например при некоторых глиобластомах [143]. PDO культивируются *in vitro* и имеют более короткие сроки генерации, однако для их развития из образцов тканей требуется 4–6 недель. Поэтому mPDX — используют для персонализированной медицины только при рецидивирующих/метастатических опухолях. Кроме того, для создания аватара на основе мышей требуется большое количество свежего опухолевого материала, что затрудняет имплантацию микробиопсийного материала мышам. Наконец, создание mPDX — это дорогой и ресурсоемкий процесс с ограниченной статистической мощностью, не говоря уже об этических последствиях использования взрослого животного.

zPDX. PDX с использованием *D. rerio* (zPDX) являются более дешевой моделью и, что самое главное, позволяют всего за несколько дней оценить опухоль пациента [144]. Прозрачность эмбрионов и мальков не имеет аналогов среди позвоночных. Они идеально подходят для микроскопии, а новые современные методы визуализации позволяют изучать поведение раковых клеток с беспрецедентным разрешением [109]. Кроме того, уникально короткое время эксперимента (3–7 дней) и небольшие потребности в тканях пациента (100–200 клеток на животное) позволяют определять в том числе чувствительность конкретного пациента к химиотерапии. zPDX могут воспроизвести разнообразие и биологические особенности опухоли, сохранить экспрессию генов и мутационный профиль исходной опухоли, предсказать ее чувствительность к химиотерапии и потенциальный исход терапии [145].

Впервые zPDX был разработан в 2009 году, когда фрагменты ткани и суспензии клеток первичных опухолей толстой кишки, поджелудочной железы и желудка трансплантировали в желточный мешок эмбрионов *D. rerio*. В результате была создана надежная модель *in vivo* для изучения инвазивности опухолевых клеток и метастатического поведения первичных опухолей человека [130]. Аналогичные модели получены также для изучения острого лимфобластного лейкоза [68], метастазов рака молочной железы в костный мозг [46], рака поджелудочной железы [145], множественной миеломы [146].

При скрининге лекарственных средств с использованием zPDX предложено оценивать количество клеток человека по уровню экспрессии гена домашнего хозяйства человека *GADPH*, определяемого методом количественной ПЦР и капельной цифровой ПЦР, вместо визуализации клеток для более точного определения эффективности препарата и дозозависимых реакций [147].

Для изучения влияния микроокружения опухоли получена zPDX модель рака поджелудочной железы с фибробластами, ассоциированными с опухолью (CAF — cancer associated fibroblasts). Смесь раковых клеток и фибробластов вводили в желточный мешок эмбрионов, в воду для содержания рыбок добавляли гемцитабин и/или навитоклак. CAF стимулируют пролиферацию и миграцию клеток рака за счет опосредованного TGF- β паракринного эффекта. Ингибитор рецептора TGF- β значительно снижал пролиферацию и метастазирование клеток, что подтверждало статус рецептора TGF как потенциальной терапевтической мишени [148]. В другом эксперименте проведена совместная инъекция клеток рака молочной железы и макрофагов в желточный мешок эмбрионов *D. rerio*. Показано, что сверхэкспрессия фактора транскрипции (POU1F1) в этих клетках модулирует микроокружение опухоли, приводит к привлечению макрофагов и их дальнейшей дифференцировке в TAM. При этом взаимодействие между раковыми клетками и TAM еще больше увеличивает пролиферацию опухоли [149].

При имплантации опухолевых клеток в опухолевый очаг рекрутируется множество различных клеток организма-хозяина, таких как эндотелиальные клетки, для реконструкции кровеносной и лимфатической систем, перициты, которые покрывают эндотелиальные клетки, TAM, CAF и другие клетки из TME [150–152]. Эти рекрутируемые клетки хозяина могут быть либо ближайшими тканевыми резидентными клетками, либо клетками, системно рекрутированными из отдаленных органов, таких как костный мозг [153, 154].

Динамичное взаимодействие между клетками иллюстрируют несколько примеров: макрофаги, способствующие проникновению опухолевых клеток в кровоток, усиливают метастазирование [155, 156]; клетки костного мозга, “обученные” раковыми клетками, подготавливают предметастатические ниши [157]. Привлечение рекрутированных клеток приводит к изменениям внеклеточного матрикса, что увеличивает жесткость/плотность матрикса [158–160], повышает давление интерстициальной жидкости, модулируя формирование градиентов сигнальных молекул и диффузию/доставку лекарственных средств [161], влияя, в конечном счете, на онкогенез [162, 163]. Наконец, определение чувствительности опухолевых клеток к лекарственным средствам с использованием моделей *in*

in vivo позволяет оценить фармакокинетику, фармакодинамику и токсичность в живом организме, при этом соединения должны абсорбироваться, достигнуть целевых значений, обойти элиминацию и не быть слишком токсичными, иначе животное не выживет [164].

Технологии развиваются с высокой скоростью, и эра “омики”, больших данных и искусственного интеллекта породила огромные объемы информации, которые привели к успешной разработке многих целевых методов терапии опухолей [165]. Подходы системной биологии или математической онкологии опираются на эти массивы данных и имеют большие перспективы [166]. Однако при этом не всегда удается учитывать клеточный ответ *in vivo* на введение лекарственного средства, а также такие взаимодействия, как генетические и межбелковые, клональный отбор, внутриклеточные и метаболические механизмы перестройки, взаимодействия опухоль–иммунитет и опухоль–stroma. Эти и другие переменные ответственны за отсутствие чувствительности к лекарственным средствам или за приобретение механизмов резистентности [167].

Модель zPDX позволяет получить результаты (гибель клеток, ангиогенез и обнаружение микрометастазов) всего за 4 дня, что соответствует срокам, необходимым для принятия клинических решений. Разница во временном масштабе анализа связана не с более быстрым развитием *D. rerio*, а скорее с тем, что личинки *D. rerio* в 10000 раз меньше взрослых мышей. Это позволяет вводить меньше клеток в одно животное (мышам требуется в 2000 раз больше материала) и, следовательно, получать больше ксенографтов для статистического анализа. Кроме того, недавно была создана автоматическая установка для скрининга в 96-луночных планшетах с анализом изображений опухолевых образований в ксенографтах [50]. Модель zPDX вместе с автоматизированной визуализацией и анализом изображений обещает стать мощной системой тестирования лекарственных средств, заполняя нишу между скринингом *in vitro* и mPDX. zPDX можно использовать в персонализированной медицине при выборе лекарств и их комбинаций, адаптированных для конкретного пациента, в течение минимального промежутка времени [50].

Таким образом, zPDX обладает значительными преимуществами перед mPDX, такими как масштабируемость, низкая стоимость, визуализация, а также скорость разработки моделей и возможность высокопроизводительного скрининга.

Изучение гетерогенности опухоли с помощью zPDX. Внутриопухолевая гетерогенность, или различия в генетических и фенотипических профилях клеток внутри одной опухоли, играют значительную роль в резистентности к проводимой терапии [168–170]. Генетические, эпигеномные

и транскриптомные изменения, определяющие внутриопухолевую гетерогенность, влияют на реакцию отдельных опухолевых клеток на лечение. Гетерогенность снижает эффективность классического подхода прецизионной медицины, который опирается исключительно на мутации в ДНК, но не учитывает негенетические факторы, которые могут предсказать ответ опухоли [171].

Секвенирование ДНК выявило высокую гетерогенность опухолей молочной железы у разных пациенток [172], которая может быть обусловлена различными этиологическими факторами и факторами окружающей среды. Например, у 100 больных раком молочной железы обнаружены 73 уникальные комбинации нарушений в генах, связанных с канцерогенезом [173, 174]. Эти данные свидетельствуют о том, что клиницисты могут назначить терапию, но практически невозможно предсказать ее эффективность, опираясь только на результаты секвенирования. Более того, существует также и внутриопухолевая гетерогенность, т.е. опухоль состоит из разнообразных популяций клеток, или субклонов, с отличительными фенотипами, включая изменение генетических, эпигенетических и метаболических особенностей, а также поведение опухоли и чувствительность к лекарственным средствам [175]. Секвенирование опухолевого генома позволяет получить представление о возможных мутациях и рекомендовать способы эффективной точной медицины, тогда как аватары используются для функциональной оценки внутриопухолевой гетерогенности и анализа ответа на терапию. Если специфические методы лечения не устраняют рак в модели аватара, то можно пробовать другие препараты до тех пор, пока не отреагируют все субклоны опухоли. Использование аватаров в процессе принятия клинических решений позволит предсказать, какие комбинации лекарств могут быть успешными при гетерогенной опухоли, избавляя пациентов от побочных эффектов и напрасной траты времени на неэффективную терапию.

Современные методы генерации mPDX не идеальны для повторной оценки гетерогенности опухолей, поскольку обычно требуется не менее трех последовательных трансплантаций опухолей человека мышам [176]. mPDX, полученный после такой последовательной трансплантации, демонстрирует более агрессивные фенотипы опухоли (большую скорость пролиферации, способность к метастазированию и инвазии). С увеличением числа пассажей ксенотрансплантата у мышей усиливается рост опухоли и ее злокачественность [177]. Геномные изменения, вызванные или отобранные путем пассирования, также влияют на чувствительность опухолевых клеток к лекарственным средствам, особенно на более поздних пассажах [178, 179].

Кроме того, при последовательной трансплантации mPDX может измениться клональный состав

опухоли. Так, с использованием mPDX показано, что каждая последующая трансплантация лейкозных клеток приводила к сокращению числа субклонов на 30–90% [180]. Последовательная трансплантация клеток рака молочной железы в mPDX также влияла на кинетику роста опухоли [181]. Эти результаты свидетельствуют о влиянии избирательного давления отбора на ксенотрансплантированные клетки, приводящего к адаптации опухоли человека к окружающей среде в mPDX. Гетерогенная опухоль у пациента динамична и реагирует на стрессирующие воздействия, поэтому выживают наиболее приспособленные клоны, стимулирующие рост опухоли. Это может привести к потенциальной неверности модели [182]. Следовательно, скрининг лекарств в этих аватарах может неточно отражать ответ опухоли в организме пациента.

Личиночный zPDX может решить эту проблему, так как клетки человека ксенотрансплантируют в личинки непосредственно из первичной опухоли после диссоциации до единичных клеток и эксперименты завершаются в течение 5–10 дней [46, 145, 183–187]. Эти короткие временные рамки придают личиночной модели zPDX способность к лучшему сохранению гетерогенности опухоли пациента. Во взрослых данио с ослабленным иммунитетом ксенотрансплантаты могут сохраняться в течение более длительного времени и оцениваться в течение 60 дней после трансплантации. Подобно mPDX, взрослый zPDX может проявлять селективность в отношении специфических субклонов опухоли, способных адаптироваться к микросреде *D. rerio*. В целом для выяснения клонального поведения опухоли как в личиночном, так и во взрослом zPDX необходимы дальнейшие исследования.

Как правило, в одно животное можно инъектировать 100–800 клеток пациента, а в сотни личинок могут быть трансплантированы практически все субклоны опухоли [145]. Гетерогенная опухоль будет разделена на более мелкие части, и с помощью аватаров zPDX можно быстро тестировать терапевтические схемы и оценивать результаты лечения. Флуоресцентное маркирование опухолевых клеток позволяет отобрать резистентные клоны и путем секвенирования выявить механизмы их резистентности, которые станут основой для вторых раундов тестирования лекарств. Это может помочь оценить опухолевый ландшафт пациента за несколько дней [188], тогда как в случае mPDX для этого требуются месяцы [189]. Большое количество используемых животных обеспечивает статистическую значимость результатов, а одноклеточное разделение при визуализации личинки данио позволит идентифицировать субклоны с лекарственной устойчивостью, не обнаруженные ранее [43, 190, 191].

В качестве дополнения к личиночному zPDX используется и модель zPDX на взрослых *D. rerio*, которая дает больше времени для оценки субклонального

поведения, поскольку приживление происходит в течение 28–60 дней. Взрослым рыбкам пересаживают примерно по 100 опухолевых клеток, поэтому каждая из них будет содержать гетерогенную опухоль, имитирующую образец пациента [54]. Таким образом, эта модель может быть полезна при идентификации опухолевых клонов, которые приводят к формированию рецидива, потенциально раскрывая индивидуальную информацию о генетических и молекулярных профилях рецидивирующей опухоли, что поможет выбрать правильный алгоритм лечения.

Danio rerio в фармакологии. *D. rerio* уже много лет используют в фармацевтических исследованиях, в крупномасштабных низкомолекулярных скринингах *in vivo* [164]. В настоящее время установлено, что определенные лекарственные средства сходным образом действуют и на людей, и на данио. Например, кардиотоксичные для человека препараты вызывают отек перикарда и нарушения кровообращения у данио [192]. *D. rerio* является хорошо зарекомендовавшей себя моделью для изучения фармакокинетики, при этом многие компоненты метаболических реакций, участвующих в трансформации лекарственных средств, консервативны у данио и млекопитающих [193–195]. Консервативность метаболических процессов у данио и человека предполагает, что лекарственные средства у них метаболизируются и используются практически одинаковым образом [196]. Проведение химических скринингов на модели *D. rerio* выявило несколько препаратов, которые в настоящее время находятся на разных стадиях клинических испытаний [197, 198]. Например, был идентифицирован дорсоморфин, первый ингибитор морфогенетического белка кости. Производные этого соединения проходят клинические испытания при прогрессирующей оссифицирующей фибродисплазии [199]. Фармацевтические компании также осознают ценность *D. rerio* в качестве модели и создают собственные предприятия по их выращиванию или сотрудничают с внешними организациями по контрактным исследованиям этих организмов [200]. Личиночные zPDX позволяют оценивать фармакокинетику, фармакодинамику и токсичность лекарственных средств на уровне организма. Кроме того, ксенотрансплантированными личинками *D. rerio* легко манипулировать в 96-луночном планшете [164].

Кожа личинок данио обладает высокой проницаемостью, что позволяет проводить скрининг лекарств наружным методом и делает процесс тестирования более быстрым, чем при применении мышей, которых инъектируют [201]. Однако этот метод не подходит в случае лекарств с ограниченной растворимостью в воде. Медикаментозное лечение при температуре ниже 37°C (температура содержания рыб 28°C) также может влиять на

эффективность некоторых химиотерапевтических средств [202]. Более того, скрининг лекарственных средств и другие способы определения характеристик опухоли обычно ограничиваются 7–8 днями после получения личиночного zPDX, прежде чем иммунная система рыбы начнет отторгать трансплантат [203]. Поэтому препараты, которым требуется более длительное время, чтобы вызвать гибель клеток (например, включающие вмешательство в клеточный цикл или вызывающие эпигенетические изменения), не могут показать значительный эффект в этой краткосрочной модели [204].

Несомненно, mPDX продолжают играть важную роль в тестировании лекарств в системах млекопитающих, однако высокая стоимость и трудоемкость процедуры ограничивают их применение в крупномасштабных скринингах, направленных на проверку эффективности прецизионных лекарственных соединений. Модели zPDX могут восполнить этот пробел. Роботизированная система позволяет инъектировать до 2000 эмбрионов за 1 ч с вероятностью успеха 99% для высокопроизводительных анализов [205]. Этапы визуализации также могут быть автоматизированы с помощью нескольких подходов. Например, VAST BioImager™ (“Union Biometrica”, США) может получать изображения до 100 личинок/ч с 85%-ным успехом визуализации [206]. Для регистрации миграции раковых клеток в режиме реального времени использовали микроскопию селективного плоского освещения (SPIM). Этот метод позволил дифференцировать характер и скорость распространения опухолевых клеток разного происхождения, например рака молочной железы и лейкоза [207]. Рост, инвазию и выживаемость клеток глиобластомы при ортотопической ксенотрансплантации оценивали с использованием флуоресцентной визуализации в реальном времени и анализа изображений с помощью искусственного интеллекта [208]. В окологлазную мышцу взрослых особей *D. rerio* (иммунодефицитная линия *prkdc^{-/-}*, *il2rga^{-/-}*) прививали клетки рабдомиосаркомы человека и через 7 дней проводили медикаментозное лечение с помощью перорального зондирования. Показано, что комбинированная терапия олапарибом и темозоломидом приводила к формированию большего количества клеток с задержкой в фазе G2 по сравнению с контрольными особями [54]. В настоящее время эта комбинация проходит фазу I клинических испытаний у детей с рабдомиосаркомой (clinicaltrials.gov идентификатор: NCT01858168) [Phase I Study of Olaparib and Temozolomide for Ewings Sarcoma or Rhabdomyosarcoma. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01858168> (accessed on 15 December 2022)].

Аватары *D. rerio* для прогнозирования результатов лечения пациентов. В последнее время все больший интерес вызывают исследования, направленные

на оценку способности zPDX прогнозировать ответ пациентов на лечение. При этом параллельно используют результаты клинических испытаний и анализа аватаров *D. rerio* [66, 184, 187, 189, 209]. Показано, что эффективность химиотерапии, определенная на zPDX, в основном соответствует клинической картине [209].

Результат данной работы [209] лег в основу первого испытания XenoZ (clinicaltrials.gov идентификатор: NCT03668418): клинического исследования на пациентах с раком поджелудочной железы и желудочно-кишечного тракта и их аватарах. Эффективность прогнозирования оптимального режима лечения на модели zPDX оценивали на 120 пациентах [210]. Эквивалентную дозу химиотерапии у *D. rerio* рассчитывали с использованием коэффициента пересчета; этот коэффициент был определен путем объединения данных исследований безопасности (максимально переносимая доза) и эффективности (значительное уменьшение площади опухоли). В исследование вошли 24 пациента с раком поджелудочной железы, толстой кишки и желудка, проходящих химиотерапию; биопсийный материал этих пациентов использовали для создания аватаров. На полученных zPDX оценивали влияние химиотерапии с использованием адаптированных к *D. rerio* критериев ответа при солидных опухолях (RECIST), основанных на изменении площади опухоли в модельном организме. Чувствительность различных типов привитых опухолей к химиотерапии соответствовала чувствительности, о которой сообщалось в клиническом контексте. Например, у аватаров рака толстой кишки, как и у пациентов, комбинированное лечение FOLFIRI, FOLFOX, FOLFOXIRI было более эффективным, чем однократное применение 5-FU [66]. Аватары *D. rerio* также могут предсказывать реакцию на лечение при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы [184]. В этом исследовании считали, что пациент не отвечает на лечение, если рецидив у него происходил в течение одного года, и отвечает, если рецидивов не было. В модели zPDX ответом на лечение считали уменьшение размера опухоли более чем на 50%. Из 31 пациента, биопсийный материал которых исследовали, 16 находились под наблюдением в среднем в течение 19 мес. На модели zPDX показано, что опухоли семи из 16 пациентов отвечали на лечение, а 9 не реагировали. При этом только один пациент из семи (ошибка 14.3%), ответивших на лечение, сообщил о рецидиве рака, в то время как у шести из 9 (точность 66.7%) пациентов, аватары которых идентифицированы как не ответившие, наступил рецидив рака. Таким образом, модели zPDX могут достаточно точно предсказать реакцию пациента на химиотерапевтические средства.

Кроме того, в рамках этого же совместного клинического исследования разработана модель zPDX

колоректального рака, для оценки которой применяли адаптивные критерии RECIST прогнозирования ответа на химиотерапию при лечении 5-FU, FOLFIRI, FOLFOX, FOLFOXIRI в течение 2 дней. Полученные аватары предсказывали ответ на химиотерапию с точностью 75% [184], поэтому планируется проведение аналогичного исследования под названием “Оценка роста опухоли и онкологического лечения у пациентов с колоректальными метастазами в печень” (CRLM) с использованием модели эмбриона *D. rerio* (CRLM-Z) (clinicaltrials.gov идентификатор: NCT05289076). Этот проект представляет собой когортное исследование, в котором примут участие 40 пациентов. Анализ ответа на разные методы лечения как у пациентов, так и у zPDX может послужить основой для дальнейших шагов [211]. Таким образом, аватары *D. rerio* теперь служат мощным инструментом точной медицины и потенциально могут помочь в принятии обоснованных решений о персонифицированной терапии [204, 212, 213].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени созданы модели zPDX для различных типов рака, включая рак желудка [145], колоректальный рак [43], рак молочной железы [183], немелкоклеточную аденокарциному легкого [214], аденокарциному протоков поджелудочной железы [184] и другие [185, 186, 215].

Сравнили модели zPDX и mPDX в качестве аватаров. Реакция zPDX на стандартное лечение очень хорошо коррелирует с реакцией mPDX и пациентов [214]. Сравнение mPDX и zPDX (в случае колоректального рака) показало, что в обеих моделях применение химиотерапии приводило к значительному увеличению апоптоза и уменьшению пролиферации опухолевых клеток. Дифференциальная чувствительность к химиотерапии некоторых раковых клеток, выявленная с помощью моделей zPDX, подтверждена на моделях mPDX [43].

Короткие сроки создания аватаров zPDX, их потенциал в проведении скрининговых исследований лекарственных средств и более низкая стоимость, чем у мышинных моделей, делают zPDX все более популярной и привлекательной моделью для прецизионной терапии опухолей. В настоящее время доказано, что личиночный zPDX является клинически значимой моделью, которая позволяет тестировать лекарства на 96-луночных планшетах, сохраняя при этом сложность всего организма с физиологическими функциями [164, 199, 201, 216–218]. Взрослые и личиночные zPDX позволяют выявлять внутриопухолевую гетерогенность и предоставлять ценную информацию о генетических, молекулярных и поведенческих профилях субклонов, вызывающих резистентность пациентов к проведению терапии.

Тем не менее каждая модель аватара рака имеет свои недостатки, и ни одна из них не может полностью воссоздать болезнь человека. Необходимо тщательно оценивать пригодность всех типов PDX, включая zPDX, для ответа на конкретные вопросы, относящиеся к опухоли пациента, включая гетерогенность и субклональный ответ на проведение терапии. В конечном счете разные модели будут играть свои собственные важные роли в конвейере прецизионной медицины. Требуется проделать определенную работу, чтобы приблизить аватары *D. rerio* к клиническим условиям. Методы получения zPDX для личинок и взрослых особей должны быть стандартизированы во всех лабораториях, чтобы результаты, полученные с их использованием, были надежными и воспроизводимыми. Дополнительное сравнение моделей zPDX и mPDX покажет, как они перекрываются и дополняют друг друга. Наконец, необходимы более обширные совместные клинические исследования, охватывающие различные типы рака, чтобы сравнить данные zPDX с ответами пациентов на лечение.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

Данная работа выполнена без привлечения людей и животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **71**(3), 209–249.
2. Özdemir B.C., Dotto G.-P. (2017) Racial differences in cancer susceptibility and survival: more than the color of the skin? *Trends Cancer.* **3**, 181–197.
3. Li S., Garrett-Bakelman F.E., Chung S.S., Sanders M.A., Hricik T., Rapaport F., Patel J., Dillon R., Vijay P., Brown A.L., Perl A.E., Cannon J., Bullinger L., Luger S., Becker M., Lewis I.D., To L.B., Delwel R., Löwenberg B., Döhner H., Döhner K., Guzman M.L., Hassane D.C., Roboz G.J., Grimwade D., Valk P.J., D’Andrea R.J., Carroll M., Park C.Y., Neuberg D., Levine R., Melnick A.M., Mason C.E. (2016) Distinct evolution and dynamics of epigenetic and genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia. *Nat. Med.* **22**(7), 792–799.
4. Almendro V., Marusyk A., Polyak K. (2013) Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **8**, 277–302.
5. Li J., Ge W. (2020) Zebrafish as a model for studying ovarian development: recent advances from targeted gene knockout studies. *Mol. Cell. Endocrinol.* **507**, 110778.
6. Cagan R.L., Zon L.I., White R.M. (2019) Modeling cancer with flies and fish. *Dev. Cell.* **49**, 317–324.
7. Costa B., Estrada M.F., Mendes R.V., Fior R. (2020) Zebrafish avatars towards personalized medicine: a comparative review between avatar models. *Cells.* **9**, 293.

8. Quail D.F., Joyce J.A. (2013) Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **19**, 1423–1437.
9. Malaney P., Nicosia S.V., Dave V. (2014) One mouse, one patient paradigm: new avatars of personalized cancer therapy. *Cancer Lett.* **344**, 1–12.
10. Hamilton F. (1822) An account of the fishes found in the river Ganges and its branches. Edinburgh: Printed for A. Constable and company.
11. Astell K.R., Sieger D. (2020) Zebrafish *in vivo* models of cancer and metastasis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **10**(8), a037077.
12. Letrado P., de Miguel I., Lamberto I., Díez-Martínez R., Oyarzabal J. (2018) Zebrafish: speeding up the cancer drug discovery process. *Cancer Res.* **78**(21), 6048–6058.
13. Matchett K.B., Lynam-Lennon N., Watson R.W., Brown J.A.L. (2017) Advances in precision medicine: tailoring individualized therapies. *Cancers.* **9**, 146.
14. Lee J.K., Liu Z., Sa J.K., Shin S., Wang J., Bordyuh M., Cho H.J., Elliott O., Chu T., Choi S.W., Rosenbloom D.I.S., Lee I.H., Shin Y.J., Kang H.J., Kim D., Kim S.Y., Sim M.H., Kim J., Lee T., Seo Y.J., Shin H., Lee M., Kim S.H., Kwon Y.J., Oh J.W., Song M., Kim M., Kong D.S., Choi J.W., Seol H.J., Lee J.I., Kim S.T., Park J.O., Kim K.M., Song S.Y., Lee J.W., Kim H.C., Lee J.E., Choi M.G., Seo S.W., Shim Y.M., Zo J.I., Jeong B.C., Yoon Y., Ryu G.H., Kim N.K.D., Bae J.S., Park W.Y., Lee J., Verhaak R.G.W., Iavarone A., Lee J., Rabadan R., Nam D.H. (2018) Pharmacogenomic landscape of patient-derived tumor cells informs precision oncology therapy. *Nat. Genet.* **50**(10), 1399–1411.
15. Мизгирев И.В., Сафина Д.Р., Демидюк И.В., Костров С.В. (2018) Опухолевые модели организменного уровня на основе *Danio rerio*. *Acta Naturae.* **10**(2), 26–31.
16. Kirchberger S., Sturtzel C., Pascoal S., Distel M. (2017) *Quo natus, Danio?* Recent progress in modeling cancer in zebrafish. *Front. Oncol.* **7**, 186.
17. Streisinger G., Walker C., Dower N., Knauber D., Singer F. (1981) Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature.* **291**, 293–296.
18. Howe K., Clark M.D., Torroja C.F., Torrance J., Berthelot C., Muffato M., Collins J.E., Humphray S., McLaren K., Matthews L., McLaren S., Sealy I., Caccamo M., Churcher C., Scott C., Barrett J.C., Koch R., Rauch G.J., White S., Chow W., Kilian B., Quintais L.T., Guerra-Assunção J.A., Zhou Y., Gu Y., Yen J., Vogel J.H., Eyre T., Redmond S., Banerjee R., Chi J., Fu B., Langley E., Maguire S.F., Laird G.K., Lloyd D., Kenyon E., Donaldson S., Sehra H., Almeida-King J., Loveland J., Trevanion S., Jones M., Quail M., Willey D., Hunt A., Burton J., Sims S., McLay K., Plumb B., Davis J., Clee C., Oliver K., Clark R., Riddle C., Elliot D., Threadgold G., Harden G., Ware D., Begum S., Mortimore B., Kerry G., Heath P., Phillimore B., Tracey A., Corby N., Dunn M., Johnson C., Wood J., Clark S., Pelan S., Griffiths G., Smith M., Glithero R., Howden P., Barker N., Lloyd C., Stevens C., Harley J., Holt K., Panagiotidis G., Lovell J., Beasley H., Henderson C., Gordon D., Auger K., Wright D., Collins J., Raisen C., Dyer L., Leung K., Robertson L., Ambridge K., Leongamornlert D., McGuire S., Gilderthorp R., Griffiths C., Manthavadi D., Nichol S., Barker G., Whitehead S., Kay M., Brown J., Murnane C., Gray E., Humphries M., Sycamore N., Barker D., Saunders D., Wallis J., Babbage A., Hammond S., Mashreghi-Mohammadi M., Barr L., Martin S., Wray P., Ellington A., Matthews N., Ellwood M., Woodmansey R., Clark G., Cooper J., Tromans A., Grafham D., Skuce C., Pandian R., Andrews R., Harrison E., Kimberley A., Garnett J., Fosker N., Hall R., Garner P., Kelly D., Bird C., Palmer S., Gehring I., Berger A., Dooley C.M., Ersan-Ürün Z., Eser C., Geiger H., Geisler M., Karotki L., Kirn A., Konantz J., Konantz M., Oberländer M., Rudolph-Geiger S., Teucke M., Lanz C., Raddatz G., Osoegawa K., Zhu B., Rapp A., Widaa S., Langford C., Yang F., Schuster S.C., Carter N.P., Harrow J., Ning Z., Herrero J., Searle S.M., Enright A., Geisler R., Plasterk R.H., Lee C., Westerfield M., de Jong P.J., Zon L.I., Postlethwait J.H., Nüsslein-Volhard C., Hubbard T.J., Roest Crolius H., Rogers J., Stemple D.L. (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature.* **496**(7446), 498–503.
19. Shin J.T. (2005) Human-zebrafish non-coding conserved elements act *in vivo* to regulate transcription. *Nucl. Acids Res.* **33**, 5437–5445.
20. Long H.K., Sims D., Heger A., Blackledge N.P., Kutter C., Wright M.L., Grützner F., Odom D.T., Patient R., Ponting C.P., Klose R.J. (2013) Epigenetic conservation at gene regulatory elements revealed by non-methylated DNA profiling in seven vertebrates. *Elife.* **2**, e00348.
21. Giardoglou P., Beis D. (2019) On zebrafish disease models and matters of the heart. *Biomedicines.* **7**, 15.
22. Outtandy P., Russell C., Kleta R., Bockenbauer D. (2019) Zebrafish as a model for kidney function and disease. *Pediatr. Nephrol.* **34**, 751–762.
23. Dubińska-Magiera M., Daczewska M., Lewicka A., Migocka-Patrzałek M., Niedbalska-Tarnowska J., Jagla K. (2016) Zebrafish: a model for the study of toxicants affecting muscle development and function. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1941.
24. Cox A.G., Goessling W. (2015) The lure of zebrafish in liver research: regulation of hepatic growth in development and regeneration. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **32**, 153–161.
25. Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**, 253–310.
26. Parichy D.M., Elizondo M.R., Mills M.G., Gordon T.N., Engeszer R.E. (2009) Normal table of post embryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Dev. Dyn.* **238**, 2975–3015.
27. Meyer A., Scharf M. (1999) Gene and genome duplications invertebrates: the one-to-four (–to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 699–704.
28. Amatruda J.F., Shepard J.L., Stern H.M., Zon L.I. (2002) Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell.* **1**, 229–231.
29. Lam S.H., Chua H.L., Gong Z., Lam T.J., Sin Y.M. (2004) Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, *in situ* hybridization and immunological study. *Dev. Comp. Immunol.* **28**, 9–28.
30. Long Y., Li L., Li Q., He X., Cui Z. (2012) Transcriptomic characterization of temperature stress responses in larval zebrafish. *PLoS One.* **7**, e37209.
31. Chen X., Wang J., Cao Z., Hosaka K., Jensen L., Yang H., Sun Y., Zhuang R., Liu Y., Cao Y. (2015) Invasiveness and metastasis of retinoblastoma in an orthotopic zebrafish tumor model. *Sci. Rep.* **5**, 10351.

32. Cam M., Charan M., Welker A.M., Dravid P., Studebaker A.W., Leonard J.R., Pierson C.R., Nakano I., Beatrice C.E., Hwang E.I., Kambhampati M., Nazarian J., Finlay J.L., Cam H. (2020) Δ Np73/ETS2 complex drives glioblastoma pathogenesis—targeting downstream mediators by rebastinib prolongs survival in preclinical models of glioblastoma. *Neuro Oncol.* **22**(3), 345–356.
33. Sounni N.E., Noel A. (2013) Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy. *Clin. Chem.* **59**, 85–93.
34. Nicoli S., Ribatti D., Cotelli F., Presta M. (2007) Mamalian tumor xenografts induce neovascularization in zebrafish embryos. *Cancer Res.* **67**, 2927–2931.
35. Nicoli S., Presta M. (2007) The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. *Nat. Protoc.* **2**, 2918.
36. Lee L.M., Seftor E.A., Bonde G., Cornell R.A., Hendrix M.J. (2005) The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Dev. Dyn. O. Publ. Am. Assoc. Anat.* **233**, 1560–1570.
37. Haldi M., Ton C., Seng W.L., McGrath P. (2006) Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. *Angiogenesis.* **9**, 139–151.
38. Renshaw S.A., Trede N.S. (2012) A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity. *Dis. Models Mech.* **5**, 38–47.
39. Sullivan C., Kim C.H. (2008) Innate immune system of the zebrafish, *Danio rerio*. In: *Innate Immunity of Plants, Animals, and Humans*. Ed. Heine H. Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 113–133.
40. White R., Rose K., Zon L. (2013) Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward. *Nat. Rev. Cancer.* **13**, 624–636.
41. Tulotta C., He S., Chen L., Groenewoud A., van der Ent W., Meijer A.H., Spaik H.P., Snaar-Jagalska B.E. (2016) Imaging of human cancer cell proliferation, invasion, and micrometastasis in a zebrafish xenogeneic engraftment model. In: *Zebrafish*. Eds Kawakami K., Pattons E.E., Orger M. New York: Springer, pp. 155–169.
42. Ikonopoulou M.P., Fernandez-Rojo M.A., Pineda S.S., Cabezas-Sainz P., Winnen B., Morales R.A., Brust A., Sánchez L., Alewood P.F., Ramm G.A. (2018) Gimesin inhibits melanoma growth by manipulating key signaling cascades that control cell death and proliferation. *Sci. Rep.* **8**, 1–14.
43. Fior R., Póvoa V., Mendes R.V., Carvalho T., Gomes A., Figueiredo N., Ferreira M.G. (2017) Single-cell functional and chemosensitive profiling of combinatorial colorectal therapy in zebrafish xenografts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, E8234–E8243.
44. Fraher D., Sanigorski A., Mellett N.A., Meikle P.J., Sinclair A.J., Gibert Y. (2016) Zebrafish embryonic lipidomic analysis reveals that the yolk cell is metabolically active in processing lipid. *Cell Rep.* **14**, 1317–1329.
45. Veinotte C.J., Delliare G., Berman J.N. (2014) Hooking the big one: the potential of zebrafish xenotransplantation to reform cancer drug screening in the genomic era. *Dis. Models Mech.* **7**, 745–754.
46. Mercatali L., La Manna F., Groenewoud A., Casadei R., Recine F., Miserocchi G., Pieri F., Liverani C., Bongiovanni A., Spadazzi C. (2016) Development of a patient-derived xenograft (PDX) of breast cancer bone metastasis in a zebrafish model. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1375.
47. Drabsch Y., Snaar-Jagalska B.E., Ten Dijke P. (2017) Fish tales: the use of zebrafish xenograft human cancer cell models. *Histol. Histopathol.* **32**, 673–686.
48. Hill D., Chen L., Snaar-Jagalska E., Chaudhry B. (2018) Embryonic zebrafish xenograft assay of human cancer metastasis. *F1000Res.* **7**, 1682.
49. Brown H.K., Schiavone K., Tazzyman S., Heymann D., Chico T.J. (2017) Zebrafish xenograft models of cancer and metastasis for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **12**, 379–389.
50. Sturtzel C., Grissenberger S., Bozatz P., Scheuringer E., Wenninger-Weinzierl A., Zajec Z., Dernovšek J., Pascoal S., Gehl V., Kutsch A., Granig A., Rifatbegovic F., Carre M., Lang A., Valtinogier I., Moll J., Lötsch D., Erhart F., Widhalm G., Surdez D., Delattre O., André N., Stampfl J., Tomašič T., Taschner-Mandl S., Distel M. (2023) Refined high-content imaging-based phenotypic drug screening in zebrafish xenografts. *NPJ Precis Oncol.* **7**(1), 44.
51. Stoletov K., Montel V., Lester R.D., Gonias S.L., Klemke R. (2007) High-resolution imaging of the dynamic tumor cell–vascular interface in transparent zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 17406–17411.
52. Khan N., Mahajan N.K., Sinha P., Jayandharan G.R. (2019) An efficient method to generate xenograft tumor models of acute myeloid leukemia and hepatocellular carcinoma in adult zebrafish. *Blood Cells Mol. Dis.* **75**, 48–55.
53. Moore J.C., Tang Q., Yordan N.T., Moore F.E., Garcia E.G., Lobbardi R., Ramakrishnan A., Marvin D.L., Anselmo A., Sadreyev R.I., Langenau D.M. (2016) Single-cell imaging of normal and malignant cell engraftment into optically clear prkdc-null SCID zebrafish. *J. Exp. Med.* **213**(12), 2575–2589.
54. Yan C., Brunson D.C., Tang Q., Do D., Iftimia N.A., Moore J.C., Hayes M.N., Welker A.M., Garcia E.G., Dubash T.D., Hong X., Drapkin B.J., Myers D.T., Phat S., Volorio A., Marvin D.L., Ligorio M., Dershowitz L., McCarthy K.M., Karabacak M.N., Fletcher J.A., Sgroi D.C., Iafra J.A., Maheswaran S., Dyson N.J., Haber D.A., Rawls J.F., Langenau D.M. (2019) Visualizing engrafted human cancer and therapy responses in immunodeficient zebrafish. *Cell.* **177**(7), 1903–1914.e14.
55. Rajan V., Melong N., Wong W.H., King B., Tong R.S., Mahajan N., Gaston D., Lund T., Rittenberg D., Delliare G. (2020) Humanized zebrafish enhance human hematopoietic stem cell survival and promote acute myeloid leukemia clonal diversity. *Haematologica.* **105**, 2391.
56. Eguira A., Holgado O., Belouqui I., Abalde L., Sanchez Y., Callol C., Martin A.G. (2011) Xenografts in zebrafish embryos as a rapid functional assay for breast cancer stem-like cell identification. *Cell Cycle.* **10**(21), 3751–3757.
57. Ghotra V.P., He S., De Bont H., van Der Ent W., Spaik H.P., van DeWater, B., Snaar-Jagalska B.E., Danen E.H. (2012) Automated whole animal bio-imaging assay for human cancer dissemination. *PLoS One.* **7**, e31281.
58. Ban J., Aryee D.N., Fourtouna A., Van Der Ent W., Kauer M., Niedan S., Machado I., Rodriguez-Galindo C., Tirado O.M., Schwentner R. (2014) Suppression of deacetylase SIRT1 mediates tumor-suppressive NOTCH response and offers a novel treatment option in metastatic Ewing sarcoma. *Cancer Res.* **74**, 6578–6588.
59. van der Ent W., Burrello C., de Lange M.J., van der Velden P.A., Jochemsen A.G., Jager M.J., Snaar-Jagalska B.E. (2015) Embryonic zebrafish: different phenotypes

- after injection of human uveal melanoma cells. *Ocul. Oncol. Pathol.* **1**(3), 170–181.
60. Kong L., Chen Q., Campbell F., Snaar-Jagalska E., Kros A. (2020) Light-triggered cancer cell specific targeting and liposomal drug delivery in a zebrafish xenograft model. *Adv. Healthc. Mater.* **9**, e1901489.
 61. Pype C., Verbueken E., Saad M.A., Casteleyn C.R., Van Ginneken C.J., Knapen D., Van Cruchten S.J. (2015) Incubation at 32.5°C and above causes malformations in the zebrafish embryo. *Reprod. Toxicol.* **56**, 56–63.
 62. Guo Y., Fan Y., Pei X. (2020) Fangjihuangqi decoction inhibits MDA-MB-231 cell invasion *in vitro* and decreases tumor growth and metastasis in triple-negative breast cancer xenografts tumor zebrafish model. *Cancer Med.* **9**, 2564–2578.
 63. Pascoal S., Salzer B., Scheuringer E., Wenninger-Weinzierl A., Sturtzel C., Holter W., Taschner-Mandl S., Lehner M., Distel M. (2020) A preclinical embryonic zebrafish xenograft model to investigate CAR T cells *in vivo*. *Cancers* **12**, 567.
 64. Wang Y., Ma Q., Zhang S., Liu H., Zhao B., Du B., Wang W., Lin P., Zhang Z., Zhong Y. (2020) Digoxin enhances the anticancer effect on non-small cell lung cancer while reducing the cardiotoxicity of adriamycin. *Front. Pharmacol.* **11**, 186.
 65. Zhang B., Shimada Y., Kuroyanagi J., Nishimura Y., Umemoto N., Nomoto T., Shintou T., Miyazaki T., Tanaka T. (2014) Zebrafish xenotransplantation model for cancer stem-like cell study and high-throughput screening of inhibitors. *Tumour Biol.* **35**(12), 11861–11869.
 66. Usai A., Di Franco G., Colucci P., Pollina L.E., Vasile E., Funel N., Palmeri M., Dente L., Falcone A., Morelli L. (2020) A model of a zebrafish avatar for co-clinical trials. *Cancers.* **12**, 677.
 67. Corkery D.P., Dellaire G., Berman J.N. (2011) Leukaemia xenotransplantation in zebrafish—chemotherapy response assay *in vivo*. *Br.J. Haematol.* **153**, 786–789.
 68. Bentley V.L., Veinotte C.J., Corkery D.P., Pinder J.B., LeBlanc M.A., Bedard K., Weng A.P., Berman J.N., Dellaire G. (2015) Focused chemical genomics using zebrafish xenotransplantation as a pre-clinical therapeutic platform for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* **100**, 70–76.
 69. Cabezas-Sainz P., Guerra-Varela J., Carreira M.J., Mariscal J., Roel M., Rubiolo J.A., Sciara A.A., Abal M., Botana L.M., López R. (2018) Improving zebrafish embryo xenotransplantation conditions by increasing incubation temperature and establishing a proliferation index with Zf tool. *BMC Cancer.* **18**, 3.
 70. Meijer A.H. (2016) Protection and pathology in TB: learning from the zebrafish model. *Semin. Immunopathol.* **38**, 261–273.
 71. Yang X.-J., Chen G.-L., Yu S.-C., Xu C., Xin Y.-H., Li T. T., Shi Y., Gu A., Duan J.-J., Qian C. (2013) TGF- β 1 enhances tumor-induced angiogenesis via JNK pathway and macrophage infiltration in an improved zebrafish embryo/xenograft glioma model. *Int. Immunopharmacol.* **15**, 191–198.
 72. Rodriguez G.V., Abrahamsson A., Jensen L.D.E., Dabrosin C. (2017) Estradiol promotes breast cancer cell migration via recruitment and activation of neutrophils. *Cancer Immunol. Res.* **5**, 234–247.
 73. Renshaw S., Loynes C., Trushell D., Elworthy S., Ingham P., Whyte M. (2007) A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood.* **108**, 3976–3978.
 74. Ellett F., Pase L., Hayman J.W., Andrianopoulos A., Lieschke G.J. (2011) Mpeg1 promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. *Blood.* **117**, e49–e56.
 75. Bernut A., Herrmann J.-L., Kissa K., Dubremetz J.-F., Gaillard J.-L., Lutfalla G., Kremer L. (2014) *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, E943–E952.
 76. Lawson N.D., Weinstein B.M. (2002) *In vivo* imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* **248**, 307–318.
 77. Jin S.-W., Beis D., Mitchell T., Chen J.-N., Stainier D.Y.R. (2005) Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish. *Development.* **132**, 5199.
 78. Wang Y., Kaiser M.S., Larson J.D., Nasevicius A., Clark K.J., Wadman S.A., Roberg-Perez S.E., Ekker S.C., Hackett P.B., McGrail M., Essner J.J. (2010) Moesin1 and Ve-cadherin are required in endothelial cells during *in vivo* tubulogenesis. *Development.* **137**(18), 3119–3128.
 79. Zhao S., Huang J., Ye J. (2015) A fresh look at zebrafish from the perspective of cancer research. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **34**, 80.
 80. He S., Lamers G.E., Beenakker J.W., Cui C., Ghotra V.P., Danen E.H., Meijer A.H., Spaik H.P., Snaar-Jagalska B.E. (2012) Neutrophil-mediated experimental metastasis is enhanced by VEGFR inhibition in a zebrafish xenograft model. *J. Pathol.* **227**(4), 431–445.
 81. Roh-Johnson M., Shah A.N., Stonick J.A., Poudel K.R., Kargl J., Yang G.H., di Martino J., Hernandez R.E., Gast C.E., Zarour L.R., Antoku S., Houghton A.M., Bravo-Cordero J.J., Wong M.H., Condeelis J., Moens C.B. (2017) Macrophage-dependent cytoplasmic transfer during melanoma invasion *in vivo*. *Dev. Cell.* **43**(5), 549–562.e6.
 82. Britto D.D., Wyroba B., Chen W., Lockwood R.A., Tran K.B., Shepherd P.R., Hall C.J., Crosier K.E., Crosier P.S., Astin J.W. (2018) Macrophages enhance VEGFA-driven angiogenesis in an embryonic zebrafish tumour xenograft model. *Dis. Models Mech.* **11**, dmm035998.
 83. Chen Q., Ramu V., Aydar Y., Groenewoud A., Zhou X.Q., Jager M.J., Cole H., Cameron C.G., McFarland S.A., Bonnet S., Snaar-Jagalska B.E. (2020) TLD1433 photosensitizer inhibits conjunctival melanoma cells in zebrafish ectopic and orthotopic tumour models. *Cancers (Basel).* **12**(3), 587.
 84. Williams J.A. (2018) Using PDX for preclinical cancer drug discovery: the evolving field. *J. Clin. Med.* **7**, 41.
 85. Noël A., Gutiérrez-Fernández A., Sounni N.E., Behrendt N., Maquoi E., Lund I.K., Cal S., Hoyer-Hansen G., López-Otin C. (2012) New and paradoxical roles of matrix metalloproteinases in the tumor microenvironment. *Front. Pharmacol.* **3**, 140.
 86. Detry B., Erpicum C., Paupert J., Blacher S., Maillard C., Bruyère F., Pendeville H., Remacle T., Lambert V., Balsat C., Ormenese S., Lamaye F., Janssens E., Moons L., Cataldo D., Kridelka F., Carmeliet P., Thiry M., Foidart J.M., Struman I., Noël A. (2012) Matrix metalloproteinase-2 governs lymphatic vessel formation as an interstitial collagenase. *Blood.* **119**(21), 5048–5056.

87. Lal S., La Du J., Tanguay R.L., Greenwood J.A. (2012) Calpain 2 is required for the invasion of glioblastoma cells in the zebrafish brain microenvironment. *J. Neurosci. Res.* **90**(4), 769–781.
88. Farin A., Suzuki S.O., Weiher M., Goldman J.E., Bruce J.N., Canoll P. (2006) Transplanted glioma cells migrate and proliferate on host brain vasculature: a dynamic analysis. *Glia*. **53**, 799–808.
89. Gamble J.T., Reed-Harris Y., Barton C.L., La Du J., Tanguay R., Greenwood J.A. (2018) Quantification of glioblastoma progression in zebrafish xenografts: adhesion to laminin alpha 5 promotes glioblastoma microtumor formation and inhibits cell invasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **506**, 833–839.
90. Yang Y., Hao E., Pan X., Tan D., Du Z., Xie J., Hou X., Deng J., Wei K. (2019) Gomisins M2 from Baizuan suppresses breast cancer stem cell proliferation in a zebrafish xenograft model. *Aging*. **11**, 8347–8361.
91. Ortiz M.V., Dunkel I.J. (2016) Retinoblastoma. *J. Child Neurol.* **31**, 227–236.
92. Asnaghi L., White D.T., Key N., Choi J., Mahale A., Alkattan H., Edward D.P., Elkhamary S.M., Al-Mesfer S., Maktabi A., Hurtado C.G., Lee G.Y., Carcaboso A.M., Mumm J.S., Safieh L.A., Eberhart C.G. (2019) ACVR1C/SMAD2 signaling promotes invasion and growth in retinoblastoma. *Oncogene*. **38**(12), 2056–2075.
93. Asnaghi L., White D.T., Yoon L., Price A., Lee G.Y., Sahoo A., Mumm J.S., Eberhart C.G. (2019) Downregulation of Nodal inhibits metastatic progression in retinoblastoma. *Acta Neuropathol. Commun.* **7**, 137.
94. Chambers A.F., Groom A.C., MacDonald I.C. (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer*. **2**(8), 563–572.
95. Kang Y. (2009) Analysis of cancer stem cell metastasis in xenograft animal models. *Methods Mol. Biol.* **568**, 7–19.
96. Nguyen D.X., Bos P.D., Massague J. (2009) Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer*. **9**(4), 274–284.
97. Marusyk A., Almendro V., Polyak K. (2012) Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat. Rev. Cancer*. **12**(5), 323–334.
98. Tellez-Gabriel M., Ory B., Lamoureux F., Heymann M.F., Heymann D. (2016) Tumour heterogeneity: the key advantages of single-cell analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **17**(12), 2142.
99. Arnandis T., Monteiro P., Adams S.D., Bridgeman V.L., Rajeev V., Gadaleta E., Marzec J., Chelala C., Malanchi I., Cutillas P.R., Godinho S.A. (2018) Oxidative stress in cells with extra centrosomes drives non-cell-autonomous invasion. *Dev. Cell*. **47**(4), 409–424.e9.
100. Sharif G.M., Schmidt M.O., Yi C., Hu Z., Haddad B.R., Glasgow E., Riegel A.T., Wellstein A. (2015) Cell growth density modulates cancer cell vascular invasion via Hippo pathway activity and CXCR2 signaling. *Oncogene*. **34**(48), 5879–5889.
101. Martinez-Ordoñez A., Seoane S., Cabezas P., Eiro N., Sendon-Lago J., Macia M., Garcia-Caballero T., Gonzalez L.O., Sanchez L., Vizoso F., Perez-Fernandez R. (2018) Breast cancer metastasis to liver and lung is facilitated by Pit-1-CXCL12-CXCR4 axis. *Oncogene*. **37**(11), 1430–1444.
102. Tulotta C., Stefanescu C., Beletkaia E., Bussmann J., Tarbashevich K., Schmidt T., Snaar-Jagalska B.E. (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.
103. Cheng Y., Ma X.L., Wei Y.Q., Wei X.W. (2019) Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*. **1871**(2), 289–312.
104. Das I., Gad H., Bräutigam L., Pudelko L., Tuominen R., Höiom V., Almlöf I., Rajagopal V., Hansson J., Helleday T., Egyházi Brage S., Warpman Berglund U. (2020) AXL and CAV-1 play a role for MTH1 inhibitor TH1579 sensitivity in cutaneous malignant melanoma. *Cell Death Differ.* **27**(7), 2081–2098.
105. Li Y., Drabsch Y., Pujuguet P., Ren J., van Laar T., Zhang L., van Dam H., Clement-Lacroix P., Ten Dijke P. (2015) Genetic depletion and pharmacological targeting of alphav integrin in breast cancer cells impairs metastasis in zebrafish and mouse xenograft models. *Breast Cancer Res.* **17**, 28.
106. Zheng M.W., Zhang C.H., Chen K., Huang M., Li Y.P., Lin W.T., Zhang R.J., Zhong L., Xiang R., Li L.L., Liu X.Y., Wei Y.Q., Yang S.Y. (2016) Preclinical evaluation of a novel orally available SRC/Raf/VEGFR2 inhibitor, SKLB646, in the treatment of triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 366–378.
107. Hsieh T.H., Hsu C.Y., Tsai C.F., Chiu C.C., Liang S.S., Wang T.N., Kuo P.L., Long C.Y., Tsai E.M. (2016) A novel cell-penetrating peptide suppresses breast tumorigenesis by inhibiting β -catenin/LEF-1 signaling. *Sci. Rep.* **6**, 19156.
108. Fenizia C., Bottino C., Corbetta S., Fittipaldi R., Floris P., Gaudenzi G., Carra S., Cotelli F., Vitale G., Caretti G. (2019) SMYD3 promotes the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Nucl. Acids Res.* **47**(3), 1278–1293.
109. Osmani N., Goetz J.G. (2019) Multiscale imaging of metastasis in zebrafish. *Trends Cancer*. **5**, 766–778.
110. Bergers G., Benjamin L.E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer*. **3**(6), 401–410.
111. Zhao C., Zhang W., Zhao Y., Yang Y., Luo H., Ji G., Dong E., Deng H., Lin S., Wei Y., Yang H. (2016) Endothelial cords promote tumor initial growth prior to vascular function through a paracrine mechanism. *Sci. Rep.* **6**, 19404.
112. Calabrese C., Poppleton H., Kocak M., Hogg T.L., Fuller C., Hamner B., Oh E.Y., Gaber M.W., Finklestein D., Allen M., Frank A., Bayazitov I.T., Zakharenko S.S., Gajjar A., Davidoff A., Gilbertson R.J. (2007) A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*. **11**(1), 69–82.
113. Zhao C., Yang H., Shi H., Wang X., Chen X., Yuan Y., Lin S., Wei Y. (2011) Distinct contributions of angiogenesis and vascular co-option during the initiation of primary microtumors and micrometastases. *Carcinogenesis*. **32**(8), 1143–1150.
114. Lee S.L., Rouhi P., Dahl Jensen L., Zhang D., Ji H., Hauptmann G., Ingham P., Cao Y. (2009) Hypoxia-induced pathological angiogenesis mediates tumor cell dissemination, invasion, and metastasis in a zebrafish tumor model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**(46), 19485–19490.
115. Joyce J.P., Pollard J.W. (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer*. **9**, 239–252.
116. Pollard J. (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer*. **4**, 71–78.

117. Aras S., Zaidi M.R. (2017) TAMEless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis. *Br.J. Cancer*. **117**(11), 1583–1591.
118. Follain G., Osmani N., Fuchs C., Allio G., Harlepp S., Goetz J.G. (2018) Using the zebrafish embryo to dissect the early steps of the metastasis cascade. In: *Cell Migration: Methods and Protocols*. Ed Gautreau A. N.Y.: Springer, pp. 195–211.
119. Follain G., Osmani N., Azevedo A.S., Allio G., Mercier L., Karreman M.A., Solecki G., Leòn M.J.G., Lefebvre O., Fekonja N., Hille C., Chabannes V., Dollé G., Metivet T., Hovsepian F., Prudhomme C., Pichot A., Paul N., Carapito R., Bahram S., Ruthensteiner B., Kemmling A., Siemonsen S., Schneider T., Fiehler J., Glatzel M., Winkler F., Schwab Y., Pantel K., Harlepp S., Goetz J.G. (2018) Hemodynamic forces tune the arrest, adhesion, and extravasation of circulating tumor cells. *Dev. Cell*. **45**(1), 33–52.e12.
120. Kanada M., Zhang J., Yan L., Sakurai T., Terakawa S. (2014) Endothelial cell-initiated extravasation of cancer cells visualized in zebrafish. *PeerJ*. **2**, e688.
121. Allen T.A., Graciele D., Talib M., Tokarz D.A., Hensley M.T., Cores J., Vandergriff A., Tang J., de Andrade J.B., Dinh P.U., Yoder J.A., Cheng K. (2017) Angiogenesis as an alternative mechanism of cell extravasation. *Stem Cells*. **35**(1), 170–180.
122. Allen T.A., Asad D., Amu E., Hensley M.T., Cores J., Vandergriff A., Tang J., Dinh P.-U., Shen D., Qiao L., Su T., Hu S., Liang H., Shive H., Harrell E., Campbell C., Peng X., Yoder J.A., Cheng K. (2019) Circulating tumor cells exit circulation while maintaining multicellularity, augmenting metastatic potential. *J. Cell Sci.* **132**(17), jcs231563.
123. Hong Y., Fang F., Zhang Q. (2016) Circulating tumor cell clusters: what we know and what we expect (review). *Int. J. Oncol.* **49**, 2206–2216.
124. Martínez-Pena I., Hurtado P., Carmona-Ule N., Abuiñ C., Dávila-Ibáñez A.B., Sánchez L., Abal M., Chaachou A., Hernández-Losa J., Cajal S.R.Y., López-López R., Piñeiro R. (2021) Dissecting breast cancer circulating tumor cells competence via modelling metastasis in zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(17), 9279.
125. Amintas S., Bedel A., Moreau-Gaudry F., Boutin J., Buscail L., Merlio J.-P., Vendrely V., Dabernat S., Buscail E. (2020) Circulating tumor cell clusters: united we stand divided we fall. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2653.
126. Stoletov K., Kato H., Zardoujian E., Kelber J., Yang J., Shattil S., Klemke R. (2010) Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. *J. Cell Sci.* **123**(13), 2332–2341.
127. Sacco A., Roccaro A.M., Ma D., Shi J., Mishima Y., Moschetta M., Chiarini M., Munshi N., Handin R.I., Ghobrial I.M. (2016) Cancer cell dissemination and homing to the bone marrow in a zebrafish model. *Cancer Res.* **76**(2), 463–471.
128. Shiozawa Y., Eber M.R., Berry J.E., Taichman R.S. (2015) Bone marrow as a metastatic niche for disseminated tumor cells from solid tumors. *Bonekey Rep.* **4**, 689.
129. Teng Y., Xie X., Walker S., White D.T., Mumm J.S., Cowell J.K. (2013) Evaluating human cancer cell metastasis in zebrafish. *BMC Cancer*. **13**, 453.
130. Marques I.J., Weiss F.U., Vlecken D.H., Nitsche C., Bakkers J., Lagendijk A.K., Partecke L.I., Heidecke C.D., Leirich M.M., Bagowski C.P. (2009) Metastatic behaviour of primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model. *BMC Cancer*. **9**, 128.
131. Miserocchi G., Mercatali L., Liverani C., De Vita A., Spadazzi C., Pieri F., Bongiovanni A., Recine F., Amadori D., Ibrahim T. (2017) Management and potentialities of primary cancer cultures in preclinical and translational studies. *J. Transl. Med.* **15**, 229.
132. Shibue T., Weinberg R.A. (2017) EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 611–629.
133. Baxendale S., van Eeden F., Wilkinson R. (2017) The power of zebrafish in personalised medicine. In: *Personalised Medicine*. Ed El-Khamisy Sh. Cham: Springer, pp. 179–197.
134. Al-Hamaly M.A., Turner L.T., Rivera-Martinez A., Rodriguez A., Blackburn J.S. (2023) Zebrafish cancer avatars: a translational platform for analyzing tumor heterogeneity and predicting patient outcomes. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 2288.
135. Xiao J., Glasgow E., Agarwal S. (2020) Zebrafish xenografts for drug discovery and personalized medicine. *Trends Cancer*. **6**(7), 569–579.
136. Idrisova K.F., Simon H.-U., Gomzikova M.O. (2023) Role of patient-derived models of cancer in translational oncology. *Cancers*. **15**, 139.
137. Jung J., Seol H.S., Chang S. (2018) The generation and application of patient-derived xenograft model for cancer research. *Cancer Res. Treat. Off. J. Korean Cancer Assoc.* **50**, 1–10.
138. Servant R., Garioni M., Vlajnic T., Blind M., Pueschel H., Müller D.C., Zellweger T., Templeton A.J., Garofoli A., Maletti S. (2021) Prostate cancer patient-derived organoids: detailed outcome from a prospective cohort of 81 clinical specimens. *J. Pathol.* **254**, 543–555.
139. Green S., Dam M.S., Svendsen M.N. (2021) Mouse avatars of human cancers: the temporality of translation in precision oncology. *Hist. Philos. Life Sci.* **43**, 1–22.
140. Cone E.B., Marchese M., Paciotti M., Nguyen D.-D., Nabi J., Cole A.P., Molina G., Molina R.L., Minami C.A., Mucci L.A. (2020) Assessment of time-to-treatment initiation and survival in a cohort of patients with common cancers. *JAMA Netw. Open*. **3**, e2030072.
141. Hidalgo M., Amant F., Biankin A.V., Budinská E., Byrne A.T., Caldas C., Clarke R.B., de Jong S., Jonkers J., Mølandsmo G.M. (2014) Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov.* **4**, 998–1013.
142. Lin D., Wyatt A.W., Xue H., Wang Y., Dong X., Haegert A., Wu R., Brahmabhatt S., Mo F., Jong L. (2014) High fidelity patient-derived xenografts for accelerating prostate cancer discovery and drug development next-generation models of prostate cancer. *Cancer Res.* **74**, 1272–1283.
143. Mathew R.K., Rutka J.T. (2018) Diffuse intrinsic pontine glioma: clinical features, molecular genetics, and novel targeted therapeutics. *J. Korean Neurosurg. Soc.* **61**, 343–351.
144. Wang L., Chen H., Fei F., He X., Sun S., Lv K., Yu B., Long J., Wang X. (2019) Patient-derived heterogeneous xenograft model of pancreatic cancer using zebrafish larvae as hosts for comparative drug assessment. *J. Vis. Exp.* **146**, 59507.
145. Wu J.-Q., Zhai J., Li C.-Y., Tan A.-M., Wei P., Shen L.-Z., He M.-F. (2017) Patient-derived xenograft in zebrafish embryos: A new platform for translational research in gastric cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **36**, 160.

146. Lin J., Zhang W., Zhao J.J., Kwart A., Yang C., Ma D., Ren X., Tai Y.T., Anderson K., Handin R., Munshi N.C. (2016) A clinically relevant in vivo zebrafish model of human multiple myeloma (MM) to study preclinical therapeutic efficacy. *Blood*. **128**(2), 249–252.
147. Al-Samadi A., Tuomainen K., Kivimäki A., Salem A., Al-Kubati S., Hyytiäinen A., Parikka M., Mesimäki K., Wilkman T., Makitie A., Grenman R., Salo T. (2019) PCR-based zebrafish model for personalised medicine in head and neck cancer. *J. Transl. Med.* **17**(1), 235.
148. Sun D.Y., Wu J.Q., He Z.H., He M.F., Sun H.B. (2019) Cancer-associated fibroblast regulate proliferation and migration of prostate cancer cells through TGF- β signaling pathway. *Life Sci.* **235**, 116791.
149. Seoane S., Martinez-Ordoñez A., Eiro N., Cabezas-Sainz P., Garcia-Caballero L., Gonzalez L.O., Macia M., Sanchez L., Vizoso F., Perez-Fernandez R. (2019) POU1F1 transcription factor promotes breast cancer metastasis via recruitment and polarization of macrophages. *J. Pathol.* **249**, 381–394.
150. Bissell M.J., Hines W.C. (2011) Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat. Med.* **17**(3), 320–329.
151. Hanahan D., Weinberg R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. **144**, 646–674.
152. Koller D., Yu P., Pollock R.E. (2016) Patient-derived xenografts use in cancer: a review. *Clin. Surg.* **1**, 1277.
153. Bradford J.R., Wappett M., Beran G., Logie A., Delpuech O., Brown H., Boros J., Camp N.J., McEwen R., Mazzone A.M., D'Cruz C., Barry S.T. (2016) Whole transcriptome profiling of patient-derived xenograft models as a tool to identify both tumor and stromal specific biomarkers. *Oncotarget*. **7**(15), 20773–20787.
154. Chao C., Widen S.G., Wood T.G., Zatarain J.R., Johnson P., Gajjar A., Gomez G., Qiu S., Thompson J., Spratt H., Hellmich M.R. (2017) Patient-derived xenografts from colorectal carcinoma: a temporal and hierarchical study of murine stromal cell replacement. *Anticancer Res.* **37**(7), 3405–3412.
155. Sidani M., Wycko J., Xue C., Segall J.E., Condeelis J. (2006) Probing the microenvironment of mammary tumors using multiphoton microscopy. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. **11**, 151–163.
156. Linde N., Casanova-Acebes M., Sosa M.S., Mortha A., Rahman A., Farias E., Harper K., Tardio E., Reyes Torres I., Jones J., Condeelis J., Merad M., Aguirre-Ghiso J.A. (2018) Macrophages orchestrate breast cancer early dissemination and metastasis. *Nat. Commun.* **9**(1), 21.
157. Psaila B., Lyden D. (2009) The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat. Rev. Cancer*. **9**, 285–293.
158. Kalluri R. (2016) The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. **16**, 582–598.
159. Velez D.O., Tsui B., Goshia T., Chute C.L., Han A., Carter H., Fraley S.I. (2017) 3D collagen architecture induces a conserved migratory and transcriptional response linked to vasculogenic mimicry. *Nat. Commun.* **8**, 1651.
160. Chaudhuri O., Koshy S.T., Branco da Cunha C., Shin J.W., Verbeke C.S., Allison K.H. (2014) Extracellular matrix stiffness and composition jointly regulate the induction of malignant phenotypes in mammary epithelium. *Nat. Mater.* **13**, 970–978.
161. Munson J.M., Shieh A.C. (2014) Interstitial fluid flow in cancer: implications for disease progression and treatment. *Cancer Manag. Res.* **6**, 317–328.
162. Cox T.R., Erler J.T. (2011) Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis. Model Mech.* **4**, 165–178.
163. Padera T.P., Meijer E.F., Munn L.L. (2016) The lymphatic system in disease processes and cancer progression. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **18**, 125–158.
164. Rennekamp A.J., Peterson R.T. (2015) 15 years of zebrafish chemical screening. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **24**, 58–70.
165. Chiu Y.-C., Chen H.-I.H., Zhang T., Zhang S., Gorthi A., Wang L.-J., Huang Y., Chen Y. (2019) Predicting drug response of tumors from integrated genomic profiles by deep neural networks. *BMC Med. Genom.* **12**, 18.
166. Rockne R.C., Hawkins-Daarud A., Swanson K.R., Sluka J.P., Glazier J.A., Macklin P., Hormuth D.A., Jarrett A.M., Lima E.A.B.F., Tinsley Oden J., Biros G., Yankeelov T.E., Curtius K., Al Bakir I., Wodarz D., Komarova N., Aparicio L., Bordyuh M., Rabadan R., Finley S.D., Enderling H., Caudell J., Moros E.G., Anderson A.R.A., Gatenby R.A., Kaznatcheev A., Jeavons P., Krishnan N., Pelesko J., Wadhwa R.R., Yoon N., Nichol D., Marusyk A., Hinczewski M., Scott J.G. (2019) The 2019 mathematical oncology roadmap. *Phys. Biol.* **16**(4), 041005.
167. Montero J., Sarosiek K.A., DeAngelo J.D., Maertens O., Ryan J., Ercan D., Piao H., Horowitz N.S., Berkowitz R.S., Matulonis U., Jänne P.A., Amrein P.C., Cichowski K., Drapkin R., Letai A. (2015) Drug-induced death signaling strategy rapidly predicts cancer response to chemotherapy. *Cell*. **160**(5), 977–989.
168. Jamal-Hanjani M., Quezada S.A., Larkin J., Swanton C. (2015) Translational implications of tumor heterogeneity. *Clin. Cancer Res.* **21**(6), 1258–1266.
169. Stanta G., Bonin S. (2018) Overview on clinical relevance of intra-tumor heterogeneity. *Front. Med.* **5**, 85.
170. Zellmer V.R., Zhang S. (2014) Evolving concepts of tumor heterogeneity. *Cell Biosci.* **4**, 69.
171. Dienstmann R., Vermeulen L., Guinney J., Kopetz S., Tejpar S., Tabernero J. (2017) Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer*. **17**, 79–92.
172. Zardavas D., Irrthum A., Swanton C., Piccart M. (2015) Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **12**, 381–394.
173. Stephens P.J., Tarpey P.S., Davies H., Van Loo P., Greenman C., Wedge D.C., Nik-Zainal S., Martin S., Varela I., Bignell G.R. (2012) The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*. **486**, 400–404.
174. Perou C.M., Sørlie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akslen L.A. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. **406**, 747–752.
175. Turajlic S., Sottoriva A., Graham T., Swanton C. (2019) Resolving genetic heterogeneity in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **20**, 404–416.
176. Dobroletcki L.E., Airhart S.D., Alferez D.G., Aparicio S., Behbod F., Bentires-Alj M., Briskin C., Bult C.J., Cai S., Clarke R.B. (2016) Patient-derived xenograft (PDX) models in basic and translational breast cancer research. *Cancer Metastasis Rev.* **35**, 547–573.

177. Pearson A.T., Finkel K.A., Warner K.A., Nör F., Tice D., Martins M.D., Jackson T.L., Nör J.E. (2016) Patient-derived xenograft (PDX) tumors increase growth rate with time. *Oncotarget*. **7**, 7793.
178. Perez D.R., Nickl C.K., Waller A., Delgado-Martin C., Woods T., Sharma N.D., Hermiston M.L., Loh M.L., Hunger S.P., Winter S.S. (2018) High-throughput flow cytometry identifies small-molecule inhibitors for drug repurposing in T-ALL. *SLAS Discov*. **23**(7), 732–741.
179. Ben-David U., Ha G., Tseng Y.-Y., Greenwald N.F., Oh C., Shih J., McFarland J.M., Wong B., Boehm J.S., Beroukhim R. (2017) Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution. *Nat. Genet*. **49**, 1567–1575.
180. Belderbos M.E., Koster T., Ausema B., Jacobs S., Sowdagar S., Zwart E., de Bont E., de Haan G., Bystrykh L.V. (2017) Clonal selection and asymmetric distribution of human leukemia in murine xenografts revealed by cellular barcoding. *Blood J. Am. Soc. Hematol*. **129**, 3210–3220.
181. Nguyen L.V., Cox C.L., Eirew P., Knapp D.J., Pellacani D., Kannan N., Carles A., Moksa M., Balani S., Shah S. (2014) DNA barcoding reveals diverse growth kinetics of human breast tumour subclones in serially passaged xenografts. *Nat. Commun*. **5**, 5871.
182. Shi J., Li Y., Jia R., Fan X. (2020) The fidelity of cancer cells in PDX models: characteristics, mechanism and clinical significance. *Int. J. Cancer*. **146**, 2078–2088.
183. Yin J., Zhao G., Kalirai H., Coupland S.E., Jochemsen A.G., Forn-Cuní G., Wierenga A.P.A., Jager M.J., Snaar-Jagalska B.E., Groenewoud A. (2023) Zebrafish patient-derived xenograft model as a preclinical platform for uveal melanoma drug discovery. *Pharmaceuticals*. **16**, 598.
184. Usai A., Di Franco G., Piccardi M., Cateni P., Pollina L.E., Vivaldi C., Vasile E., Funel N., Palmeri M., Dente L. (2021) Zebrafish patient-derived xenografts identify chemo-response in pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *Cancers*. **13**, 4131.
185. Gamble J.T., Elson D.J., Greenwood J.A., Tanguay R.L., Kolluri S.K. (2021) The zebrafish xenograft models for investigating cancer and cancer therapeutics. *Biology*. **10**, 252.
186. Ai X., Ye Z., Xiao C., Zhong J., Lancman J.J., Chen X., Pan X., Yang Y., Zhou L., Wang X. (2022) Clinically relevant orthotopic xenograft models of patient-derived glioblastoma in zebrafish. *Dis. Model. Mech*. **15**, dmm049109.
187. Di Franco G., Usai A., Piccardi M., Cateni P., Palmeri M., Pollina L.E., Gaeta R., Marmorino F., Cremolini C., Dente L. (2022) Zebrafish patient-derived xenograft model to predict treatment outcomes of colorectal cancer patients. *Biomedicines*. **10**, 1474.
188. Martinez-Lopez M., Póvoa V., Fior R. (2021) Generation of zebrafish larval xenografts and tumor behavior analysis. *JoVE J. Vis. Exp*. **172**, e62373.
189. Clohessy J.G., Pandolfi P.P. (2015) Mouse hospital and co-clinical trial project – from bench to bedside. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. **12**, 491–498.
190. Yan C., Do D., Yang Q., Brunson D.C., Rawls J.F., Langenau D.M. (2020) Single-cell imaging of human cancer xenografts using adult immunodeficient zebrafish. *Nat. Protoc*. **15**, 3105–3128.
191. Blackburn J.S., Langenau D.M. (2014) Zebrafish as a model to assess cancer heterogeneity, progression and relapse. *Dis. Model. Mech*. **7**, 755–762.
192. Zhu J.J., Xu Y.Q., He J.H., Yu H.P., Huang C.J., Gao J.M., Dong Q.X., Xuan Y.X., Li C.Q. (2014) Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish. *J. Appl. Toxicol*. **34**(2), 139–148.
193. Ruchika, Sharma A., Saneja A. (2022) Zebrafish as a powerful alternative model organism for preclinical investigation of nanomedicines. *Drug Discov. Today*. **27**(5), 1513–1522.
194. de Souza Anselmo C., Sardela V.F., de Sousa V.P., Pereira H.M.G. (2018) Zebrafish (*Danio rerio*): a valuable tool for predicting the metabolism of xenobiotics in humans? *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol*. **212**, 34–46.
195. Guarín M., Faelens R., Giusti A., De Croze N., Léonard M., Cabooter D., Annaert P., de Witte P., Ny A. (2021) Spatiotemporal imaging and pharmacokinetics of fluorescent compounds in zebrafish eleuthero-embryos after different routes of administration. *Sci. Rep*. **11**, 12229.
196. Goldstone J.V., McArthur A.G., Kubota A., Zanette J., Parente T., Jönsson M.E., Nelson D.R., Stegeman J.J. (2010) Identification and developmental expression of the full complement of cytochrome P450 genes in zebrafish. *BMC Genom*. **11**, 643.
197. Patton E.E., Zon L.I., Langenau D.M. (2021) Zebrafish disease models in drug discovery: from pre-clinical modelling to clinical trials. *Nat. Rev. Drug Discov*. **20**, 611–628.
198. Cully M. (2019) Zebrafish earn their drug discovery stripes. *Nat. Rev. Drug Discov*. **18**, 811–814.
199. MacRae C.A., Peterson R.T. (2015) Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov*. **14**, 721–731.
200. Fleming A., Alderton W. (2013) Zebrafish in pharmaceutical industry research: finding the best fit. *Drug Discov. Today Dis. Model*. **10**, e43–e50.
201. Zon L.I., Peterson R.T. (2005) *In vivo* drug discovery in the zebrafish. *Nat. Rev. Drug Discov*. **4**(1), 35–44.
202. Cabezas-Sáinz P., Pensado-López A., Sáinz B.Jr., Sánchez L. (2020) Modeling cancer using zebrafish xenografts: drawbacks for mimicking the human microenvironment. *Cells*. **9**(9), 1978.
203. Fazio M., Ablain J., Chuan Y., Langenau D.M., Zon L.I. (2020) Zebrafish patient avatars in cancer biology and precision cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*. **20**, 263–273.
204. Gatzweiler C., Ridinger J., Herter S., Gerloff X.F., El-Harouni D., Berker Y., Imle R., Schmitt L., Kreth S., Stainczyk S. (2022) Functional therapeutic target validation using pediatric zebrafish xenograft models. *Cancers*. **14**, 849.
205. Spaink H.P., Cui C., Wiweger M.I., Jansen H.J., Veneman W.J., Marín-Juez R., de Sonnevile J., Ordas A., Torraca V., van der Ent W. (2013) Robotic injection of zebrafish embryos for high-throughput screening in disease models. *Methods*. **62**, 246–254.
206. Pulak R. (2016) Tools for automating the imaging of zebrafish larvae. *Methods*. **96**, 118–126.
207. Asokan N., Daetwyler S., Bernas S.N., Schmied C., Vogler S., Lambert K., Wobus M., Wermke M., Kempermann G., Huysken J. (2020) Long-term *in vivo* imaging reveals tumor-specific dissemination and captures host tumor interaction in zebrafish xenografts. *Sci. Rep*. **10**, 13254.
208. Almstedt E., Rosén E., Gloger M., Stockgard R., Hekmati N., Koltowska K., Krona C., Nelander S. (2022) Real-time evaluation of glioblastoma growth in patient-specific zebrafish xenografts. *Neuro-Oncology*. **24**, 726–738.

209. Di Franco G., Usai A., Funel N., Palmeri M., Montesanti I.E.R., Bianchini M., Gianardi D., Furbetta N., Guadagni S., Vasile E. (2020) Use of zebrafish embryos as avatar of patients with pancreatic cancer: a new xenotransplantation model towards personalized medicine. *World J. Gastroenterol.* **26**, 2792.
210. Sachs N., de Ligt J., Kopper O., Gogola E., Bounova G., Weeber F., Balgobind A.V., Wind K., Gracanin A., Begthel H. (2018) A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity. *Cell.* **172**, 373–386.e310.
211. Bose S., Clevers H., Shen X. (2021) Promises and challenges of organoid-guided precision medicine. *Med.* **2**(9), 1011–1026.
212. Raynaud F., Mina M., Tavernari D., Ciriello G. (2018) Pan-cancer inference of intra-tumor heterogeneity reveals associations with different forms of genomic instability. *PLoS Genet.* **14**, e1007669.
213. Worst B.C., van Tilburg C.M., Balasubramanian G.P., Fiesel P., Witt R., Freitag A., Boudalil M., Previti C., Wolf S., Schmidt S. (2016) Next-generation personalised medicine for high-risk paediatric cancer patients – The INFORM pilot study. *Eur. J. Cancer.* **65**, 91–101.
214. Ali Z., Vildevall M., Rodriguez G.V., Tandiono D., Vamvakaris I., Evangelou G., Lolas G., Syrigos K.N., Villanueva A., Wick M. (2022) Zebrafish patient-derived xenograft models predict lymph node involvement and treatment outcome in non-small cell lung cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **41**, 58.
215. Costa B., Estrada M.F., Barroso M.T., Fior R. (2022) Zebrafish patient-derived avatars from digestive cancers for anti-cancer therapy screening. *Curr. Protoc.* **2**, e415.
216. Taylor K.L., Grant N.J., Temperley N.D., Patton E.E. (2010) Small molecule screening in zebrafish: an *in vivo* approach to identifying new chemical tools and drug leads. *Cell Commun. Signal.* **8**, 11.
217. Phillips J.B., Westerfield M. (2014) Zebrafish models in translational research: tipping the scales toward advancements in human health. *Dis. Model. Mech.* **7**, 739–743.
218. Yoganantharajah P., Gibert Y. (2017) The use of the zebrafish model to aid in drug discovery and target validation. *Curr. Top. Med. Chem.* **17**, 2041–2055.

ZEBRAFISH XENOGRAPHS IN ONCOLOGY AND PERSONALIZED MEDICINE

N. A. Lunina^{1, *}, D. R. Safina¹, S. V. Kostrov¹

¹*National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia*

**e-mail: lunina-na.img@yandex.ru*

The bony fish *Danio rerio* (zebrafish) has become one of the important vertebrate model organisms in biomedical cancer research and is used, among other things, for the development of anticancer drugs using xenotransplantation approaches. The *ex utero* development of zebrafish, optically transparent tissues in the first month of growth, as well as the immature adaptive immune system during this period greatly facilitate the manipulation of embryos. For highly aggressive cancers where patient survival may be expected to be only a few months, the zebrafish xenograft assay may be the only appropriate method as it requires only 4 to 7 days. Thousands of embryos can be implanted with biopsy tissue from a patient to produce zebrafish xenografts and use them to automatically screen a large number of drugs and compounds to develop an effective treatment regimen for a specific patient. The review examines the advantages and disadvantages of the zebrafish model in oncology research. The main focus is on the use of zebrafish xenografts to study metastasis and create avatars in personalized medicine.

Keywords: human malignancies, zebrafish, *Danio rerio*, xenografts, metastasis, avatar, personalized medicine