

*Revijalni rad /
Review article*

ULOGA NAJZNAČAJNIJIH PRETKLINIČKIH
ANIMALNIH MODELA U ISPITIVANJU
LEKOVA SA ANTITUMORSKIM DEJSTVOM
THE ROLE OF THE MOST IMPORTANT
PRECLINICAL ANIMAL MODELS IN
TESTING DRUGS WITH ANTITUMOR
EFFECTS

Correspondence to:

Nemanja Rančić,

Vojnomedicinska akademija,
Crnotravska 17, Beograd,
nece84@hotmail.com

Dina Stojanović¹, Viktorija Dragojević Simić^{1,2},
Nemanja Rančić^{1,2}

¹ Centar za kliničku farmakologiju, Vojnomedicinska akademija,
Beograd, Srbija

² Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije, Univerzitet odbrane,
Beograd, Srbija

Ključne reči

preklinički modeli, maligne bolesti,
Mus musculus, *Drosophila*,
Caenorhabditis elegans, *Danio rerio*,
farmakoterapija.

Key words

preclinical models, malignant diseases,
Mus musculus, *Drosophila*,
Caenorhabditis elegans, *Danio rerio*,
pharmacotherapy

Sažetak

Maligne bolesti predstavljaju jedan od najvećih globalnih zdravstvenih izazova, sa kontinuiranim porastom incidence i potrebom za efikasnijom farmakoterapijom. Preklinički animalni modeli igraju ključnu ulogu u otkrivanju i razvoju novih antitumorskih lekova, omogućavajući proučavanje tumorske biologije, mehanizama širenja metastaza i odgovora na terapiju u strogo kontrolisanim uslovima. Ovaj rad analizira ulogu četiri najznačajnijih eksperimentalnih životinja: miša (*Mus musculus*), voćne mušice (*Drosophila melanogaster*), nematode (*Caenorhabditis elegans*) i zebrice (*Danio rerio*). Miševi, posebno genetički modifikovani, kao i ksenotransplantacioni modeli, pružaju visoku genetičku sličnost sa ljudima i omogućavaju proučavanje kompleksnih interakcija tumora i imunog sistema. *Drosophila* i *Caenorhabditis elegans*, zahvaljujući brzom životnom ciklusu i genetičkoj konzervaciji, idealni su za visokopropusni skrining i identifikaciju molekularnih ciljeva. *Danio rerio*, sa svojom transparentnošću i mogućnošću personalizovanih ksenograftova, nude jedinstvenu platformu za testiranje već odobrenih lekova za nove indikacije. Iako svaki model ima prednosti i ograničenja, njihova kombinacija doprinosi boljem razumevanju karcinogeneze i ubrza razvoj novih farmakoterapijskih principa. Dalji napredak u genetičkim i translacionim tehnologijama dodatno će unaprediti ulogu ovih modela u borbi protiv malignih bolesti.

UVOD

Maligne bolesti predstavljaju jedan od najvećih globalnih javnozdravstvenih izazova, sa kontinuiranim porastom incidence i smrtnosti širom sveta, uprkos napretku u postavljanju dijagnoze i lečenju (1). Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (SZO), rak je prvi ili drugi vodeći uzrok smrti kod osoba mlađih od 70 godina u 91-oj zemlji u svetu, a očekuje se da će broj novih slučajeva do 2040. godine porasti na 29,4 miliona obolelih (2). Patofiziološki, karakteristike malignih oboljenja su održavanje proliferativnih signala, izbegavanje dejstva supresora rasta, otpornost na ćeljsku smrt i sposobnost metastaziranja (3). Iako su istraživanja poslednjih decenija značajno doprinela razumevanju ovih procesa, veliki izazov ostaje razvoj novih, efikasnijih farmakoterapijskih agenasa (4). Razlog tome je što otkriće novih lekova, predstavlja veoma složen istraživački proces, koji

uključuje višefazno testiranje na različitim predkliničkim animalnim modelima pre nego što medicinski proizvod „uđe” u klinička ispitivanja (5).

Predklinički modeli, posebno oni zasnovani na eksperimentalnim životinjama, igraju ključnu ulogu kao spona između „*in vitro*” (van živog) istraživanja i kliničke primene (2). Eksperimenti na eksperimentalnim životinjama omogućavaju proučavanje tumorske biologije, mehanizama metastaziranja i odgovore na terapiju u strogo kontrolisanim uslovima (5). Iako *in vitro* modeli, poput ćeljskih linija i 3D organoida, pružaju preciznu kontrolu eksperimentalnih uslova, oni ne mogu u potpunosti oponašati složene interakcije između tumora i njegovog mikrookruženja (3). S toga su *in vivo* (u živom) modeli neophodni za razvoj personalizovanih terapija i predkliničkih istraživanja (5).

Cilj ovog rada je analiza uloge četiri vrste eksperimentalnih životinja koje se često koriste za otkrivanje nove antitumorske terapije. Razumevanje prednosti i ograničenja različitih predkliničkih modela ključno je za unapređenje istraživanja i optimizaciju budućih strategija u lečenju malignih oboljenja.

Miš (*Mus musculus*)

Miševi su među najčešće korišćenim u predkliničkim istraživanjima malignih bolesti zbog svoje genetičke sličnosti sa ljudima, kratkog životnog ciklusa, lakoće uzgajanja i mogućnosti sofisticirane genetičke manipulacije (6). Genom miša pokazuje čak 99% sličnosti sa ljudskim genomom, što omogućava simulaciju bioloških procesa poput inicijacije, progresije i metastaziranja tumora *in vivo* (5). U istraživanjima raka koriste se različite vrste mišjih modela uključujući:

- Hemijski indukovane modele;
- Ksenotransplantacione modele (CDX i PDX);
- Genetički modifikovane miševe (GEMMs) i
- Humanizovane miševe sa rekonstruisanim humanim imunim sistemom (6).

Genetski modifikovani miševi (GEMMs) predstavljaju ključni alat za razumevanje karcinogeneze i testiranje novih antitumorskih lekova. Oni omogućavaju precizne promene u genomu koje oponašaju genetičke mutacije prisutne kod pacijenata (7). GEMMs se dele u nekoliko podtipova, među kojima su:

- Transgeni modeli – uključuju unošenje stranog gena (npr. TRAMP model za rak prostate; Apc-deficijentni miševi za kolorektalni karcinom; p53+/- Wnt-1 za rak dojke).
- Knockout modeli – koriste se za proučavanje uloge tumorskih supresora (npr. p53 knockout; Nkx3.1 za rak prostate; tkivno-specifični Brc1 modeli).
- Cre-indukovani i Tet-regulisani modeli – omogućavaju vremenski i tkivno specifičnu genetičku manipulaciju.
- RNAi modeli – koriste se za ispitivanje funkcije gena putem njihove „tišine”, posebno u kontekstu terapijske rezistencije (5, 8).

Pored GEMMs, u istraživanjima raka značajnu ulogu imaju i ksenotransplantacioni modeli, koji se dele na:

- Cell-Derived Xenografts (CDX) modeli podrazumevaju implantaciju humanih ćelijskih linija u imunodeficijentne miševe i
- Patient-Derived Xenografts (PDX) modeli koji koriste tumorsko tkivo pacijenata, čime zadržavaju histopatološke i genetičke karakteristike originalnog tumora (6).

Iako ksenotransplantacioni modeli omogućavaju brzu evaluaciju novih lekova, oni ne pružaju uvid u interakciju tumora i imunog sistema jer se izvode u imunodeficijentnim životinjama (5). Zbog toga su razvijeni humanizovani miševi, kod kojih je rekonstruisan ljudski imuni sistem transplantacijom ljudskih hematopoetskih ćelija. Postoje tri osnovna tipa:

- Bone marrow-Liver-Thymus (Hu-BLT)
- Hematopoietic Stem Cells (Hu-HSC)
- Peripheral Blood Lymphocytes (Hu-PBL) (6).

Ipak, i pored svojih prednosti, mišji modeli imaju određena ograničenja. Razlike u fiziologiji, metabolizmu i imunološkom sistemu između miševa i ljudi mogu uticati na preciznost predikcije terapijskog odgovora (3). Uprkos tome, savremene tehnologije genetičkog inženjeringa omogućavaju sve sofisticiranije modele koji verodostojnije odražavaju kompleksnost ljudskih tumora, što predstavlja značajan korak napred u razvoju efikasnijih antitumorskih terapija (7).

Voćna mušica (*Drosophila melanogaster*)

Drosophila melanogaster predstavlja jedan od ključnih modela u predkliničkim istraživanjima raka, zahvaljujući visokom stepenu genetičke i molekularne sličnosti sa ljudima. Oko 75% gena povezanih sa bolestima kod ljudi ima funkcionalne homologe u genomu *Drosophila*, što omogućava proučavanje i testiranje novih antitumorskih terapija (9). Dobre osobine voćne mušice su da ima brzi životni ciklus, proizvodi veliki broj potomaka, jeftina je i jednostavna za uzgajanje (10). Posедуje niz osobina koje je čine praktičnim modelom, a to su genom (sekvenciran i anotiran, sadrži približno 14.000 gena na četiri hromozoma, od kojih tri nose većinu genetičkog materijala), životni ciklus (brz razvojni ciklus od jaja do odrasle jedinke traje samo 10–12 dana na 25°C, što omogućava brzo sprovođenje eksperimenata) i razvojne faze (embriogeneza, larva, pupa i odrasla jedinka) (11). Ovaj model pruža jedinstven sistem za procenu farmakokinetike i toksičnosti lekova na nivou celog organizma, što omogućava brže prepoznavanje potencijalnih terapijskih lekova pre testiranja na složenim modelima (12). Niža genetička suvišnost (višestruko pojavljivanje ili redundancija gena) u poređenju sa sisarima, doprinela je da *Drosophila* postane korisna za otkrivanje novih lekova, jer tokom procesa razvoja novog leka potrebno je da se deluje na manji broj gena kako bi se stvorili optimalni uslovi za testiranje lekova (13). *Drosophila* nudi genetičke mogućnosti koji se koriste za ispitivanja u biomedicini i farmakologiji (transgeneza, genetički skrining i farmakogenetika) (11). Zbog toga je *Drosophila* sve prisutnija u skriningu antitumorskih lekova (12). *Drosophila* takođe pruža platformu za personalizovanu medicinu putem tzv. „*Drosophila Patient Model*” (DPM), gde se pacijent-specifične mutacije uvode u genetički modifikovane mušice kako bi se testirale kombinovane terapije. Ova strategija omogućava identifikaciju sinergističkih kombinacija lekova koje efikasno deluju na specifične genetičke profile pacijenata. Kao primer može se navesti kombinacija trametiniba i fluvastatina koja je identifikovana kao potencijalna terapija za rak pluća putem ovog modela (14). Uprkos prednostima, *Drosophila* model ima određena ograničenja. Njen hematopoetski sistem i limfna cirkulacija su rudimentarni u poređenju sa sisarima, što otežava proučavanje određenih aspekata metastaziranja (5). Takođe, zbog malog broja hromozoma, aneuploidija (nenormalan broj hromozoma) nije uobičajeni mehanizam u ovom eksperimentalnom modelu, što ograničava reprodukciju određenih tipova tumora (9). Ipak, zahvaljujući brzom životnom ciklusu, niskim troškovima uzgoja i genetičkoj konzervaciji sa ljudima,

Drosophila melanogaster ostaje moćan sistem za otkrivanje novih antitumorskih lekova i istraživanje mehanizama raka u predkliničkim studijama (9).

Nematoda Caenorhabditis elegans

Caenorhabditis elegans je slobodno-živeća zemljišna nematoda, dužine približno 1 mm (15) koja se hrani različitim vrstama bakterija i lako se uzgaja na agarnoj podlozi. Predstavlja jedan od najjednostavnijih višćelijskih organizama, i spada u grupu hermafrodita (16). Životni ciklus je relativno kratak (2-3 dana) i obuhvata embrionalni, larvalni i stadijum odrasle jedinke (15). Kod *Caenorhabditis elegans* je pronađena homologija sa ljudskim genima, pri čemu su procesi poput ćelijskog ciklusa, signalizacije i apoptoze očuvani izmenju *Caenorhabditis elegans* i sisara (16). *Caenorhabditis elegans* se smatra idealnim modelom za testiranje lekova zbog tkiva koja su prozirna u svim razvojnim stadijumima, dostupnosti mutantnih sojeva, kompletno sekvenciranog genoma i efikasnog modeliranja bolesti sisara u njoj (17). Prozirno telo i stabilni marker zeleni fluorescentni protein (GFP) omogućavaju praćenje u realnom vremenu tumorske progresije i odgovora na terapiju, dok mikrofluidne platforme automatizuju skrining lekova u visokopropusnim formatima (15). Visokopropusne skrining platforme, poput COPASTM Worm Sorter-a, omogućili su testiranje na hiljade jedinjenja u kratkom vremenskom periodu. Posebno je značajna metodologija zasnovana na Drug Affinity Responsive Target Stability (DARTS) tehnici, koja je identifikovala MEK2 (mitogen-activated protein kinase kinase 2) kao cilj antitumorskih molekula bez potrebe za modifikacijom leka (17). Naime, ovi pristupi su doprineli ne samo otkrivanju novih lekova već i razumevanju njihovih molekulskih meta i mehanizama delovanja. Niski troškovi uzgoja, lako rukovanje, mala veličina i genetsko-evolutivna sličnost sa sisarima čine ovaj model-organizam izuzetno korisnim u razvoju lekova (15). Uprkos prednostima upotrebe *Caenorhabditis elegans* za skrining lekova, potrebno je uzeti u obzir i određene nedostatke. Nedostatak cirkulatornog sistema i specifičnih organa (npr. jetra) nadoknađuju se transgenim modelima koji ekspimiraju humane proteine (18). Drugi nedostatak je debela kutikula koja može smanjiti resorpciju lekova i pokazati lažno negativne rezultate testiranja. Takođe, uzgajanje kultura *Caenorhabditis elegans* zahtevaju bakterije kao izvor hrane, što može dovesti do metabolizma lekova i jedinjenja od strane samih bakterija i tako smanjiti efikasnost leka (15). Ono što je sigurno je da *Caenorhabditis elegans* predstavlja nezaobilazni model u predkliničkim istraživanjima malignih bolesti, kombinujući eksperimentalnu jednostavnost sa molekularnom relevantnošću za humana oboljenja. Njena primena u otkrivanju lekova, od skrininga do studija koje proučavaju mehanizme dejstva, potvrđuje vrednost ove nematode kao spone između *in vitro* sistema i kompleksnijih animalnih modela.

Zebrica (Danio rerio)

Zebrice (*Danio rerio*) su male slatkovodne ribe karakteristične po plavo-crnim prugama, koje su postale jedan od najznačajnijih model organizama u biomedicinskim istraživanjima. Njihova morfologija, koja uključuje providne embrione i larve, omogućava direktno posmatranje razvojnih procesa i tumorskih promena na ćelijskom nivou (19).

Ova njihova transparentnost, kombinovana sa brzim razvojem (polna zrelost za oko 90 dana) i visokom plodnošću (stotine jaja nedeljno), čini ih idealnim za visokopropusne studije (20). Pored toga, zebrice dele skoro 70% genoma sa ljudima, a čak 82% gena povezanih sa bolestima ima homologe kod ovih riba, što ih čini relevantnim modelom za proučavanje himanih bolesti, uključujući i maligna oboljenja (21).

Zebrice se koriste u različitim tipovima istraživanja maligniteta, uključujući ksenograft modele, gde se humane tumorske ćelije transplantiraju u embrione ili odrasle jedinke. Larve zebrica su posebno pogodne za brzu analizu (5-7 dana), zahvaljujući njihovoj providnosti i mogućnosti snimanja tumorskih ćelija u realnom vremenu (22). Odrasle zebrice, posebno imunodeficientne linije poput *casper*, omogućavaju dugotrajnije studije (do 28 dana) i transplantaciju većeg broja ćelija (do 2 miliona po jedinki), što je ključno za modelovanje tumorske heterogenosti (20). Pored ksenograft modela, transgene zebrice sa fluorescentno obeleženim ćelijama koriste se i za proučavanje angiogeneze, metastaziranja i otpornosti na lekove. Na primer, inhibitori RAS (RAS protein je česta mutacija kod humanih tumora i jedan je od ključnih faktora u razvoju i rastu tumora) koji su poput MEK inhibitora, testirani su na zebricama i pokazali obećavajuće rezultate u lečenju rabdomiosarkoma i melanoma. Zebrice su takođe bile ključne u identifikaciji leka leflunomid za melanom, čije ciljno mesto dejstva je neuralni greben koji se privremeno javlja tokom razvoja kičmenjaka, i ima perspektive u razvoju novih terapijskih linija za leukemiju (23).

Jedna od najznačajnijih primena zebrica je u personalizovanoj medicini, gde se tumorski uzorci pacijenata transplantiraju u larve kako bi se testirala osetljivost na hemioterapiju. Ova metoda, poznata kao „zebrafish avatar model”, omogućava brzu identifikaciju optimalnih terapija za pojedinačne pacijente (19). Personalizovana medicina doživela je revolucionarni napredak kroz ovaj model. Ova platforma, koja zahteva samo 100-200 tumorskih ćelija po larvi, omogućava odgovor za 5-7 dana, što je kritično za pacijente sa agresivnim tumorima (20). Nedavno je ovaj pristup korišćen za testiranje regorafeniba (inhibitora receptora 2 za vaskularni endotelni faktor rasta, VEGFR2) kod adenoidnog cističnog karcinoma, što je dovelo do kliničkog ispitivanja II faze ovog leka (NCT04119453) (21).

Farmakokinetičke studije na zebricama postale su sve važnije, posebno sa razvojem imunodeficientnih linija (prkdc-/- il2rga-/-) koje tolerišu temperaturu od 37°C. Oralna primena lekova (npr. temozolomida) kod odraslih zebrica pokazala je farmakokinetičke profile slične humanim, potvrđujući njihovu prediktivnu vrednost (20). Automatizovane platforme za snimanje i analizu larvi dodatno su povećale propustljivost, omogućavajući testiranje >1000 jedinjenja nedeljno sa preciznim kvantifikacijom efekata na tumorski rast i metastaze (19). Iako postoje izazovi (npr. razlike u metabolizmu lekova između riba i sisara), modeli na zebricama su već dokazali svoju značajnu ulogu u otkrivanju antitumorskih lekova od identifikacije novih terapijskih ciljeva do personalizovanih terapijskih pristupa, što ih je učinilo neophodnim modelom u modernoj onkologiji.

DISKUSIJA

Predklinički animalni modeli su ključni u razvoju novih farmakoterapijskih principa u lečenju malignih oboljenja, omogućavajući evaluaciju antitumorskog dejstva, posebno mehanizma delovanja i potencijalne toksičnosti pre nego što se lek uvede u kliničko ispitivanje na ljudima. Stoga je istaknuta raznovrsnost korišćenih modela kroz prikaz četiri najčešće korišćenih eksperimentalnih životinja u predkliničkim ispitivanjima.

Mišji modeli postali su nezamenljiv alat u predkliničkim istraživanjima raka, omogućavajući evaluaciju novih terapija, mehanizama dejstva i potencijalnih sinergističkih efekata ispitivanih supstanci pre nego što se pristupi kliničkim ispitivanjima. U istraživanju osteosarkoma, PDX modeli miševa korišćeni su kao ključni alat za proučavanje metastaza i testiranje novih potencijalnih lekova. Studija autora Schotta i saradnika (24) pokazala je da PDX modeli izvedeni iz tumora pacijenata zadržavaju genetičku i histološku sličnost sa originalnim tumorima, omogućavajući realno modeliranje bolesti. U ovoj studiji je testiran inhibitor ciklin-zavisnih kinaza (CDK) dinaciklib na MYC-amplificiranim osteosarkomima, gde je izlaganje leku dovodio do značajnog smanjenja metastatskog opterećenja u plućima i jetri, što potvrđuje potencijal ovog leka kao terapijske opcije. Ovi rezultati ističu prednost PDX modela u predviđanju kliničkog odgovora, posebno kod retkih i agresivnih tumora, kao što je osteosarkom, dok istovremeno naglašavaju potrebu za daljim optimizacijama, kako bi se prevazišla ograničenja poput genomske nestabilnosti tokom primene i distribucije antitumorskih lekova (24). Na modelima miša moguće je testiranje i kombinovanih terapija. Na primer, pokazalo se da nitroksolin u kombinaciji sa nishodnom regulacijom PD-L1 ima sinergistički efekat u modelu raka prostate povećavajući aktivnost CD8⁺ T ćelija i smanjujući ekspresiju PD-L1 (25). Slično, kombinacija pembrolizumaba i bevacizumaba u humanizovanom modelu nesitnoćelijskog carcinoma pluća (non-small-cell lung cancer-NSCLC) dovela je do remodeliranja tumorskog mikrookruženja i transformacije „hladnih” tumora u „vruće”, što objašnjava njenu superiornu efikasnost u odnosu na monoterapije. Pored toga, konstruisan je neoadjuvantni mišji model koji je simulirao postoperativne recidive bolesti i metastaze, gde je kombinovana terapija pokazala sposobnost da značajno uspori ponovno pojavljivanje tumora i metastaziranje. Ovi rezultati pružaju snažnu predkliničku osnovu za primenu ove kombinacije u kliničkim ispitivanjima, kako za uznapredovale, tako i za rane faze NSCLC (26). Primena miševa značajna je i u modelovanju kompleksnih tumorskih fenotipova. U radu autora Tanake i saradnika (27) miševi su korišćeni kao model organizama za razvoj novog, manje invazivnog intranazalnog (IN) modela carcinoma pluća, koji bolje oponaša prirodnu progresiju bolesti. Ključni rezultati pokazuju da IN injekcije ćelija carcinoma pluća (Lewis lung carcinoma i humani NCI-H460) dovode do dozno-zavisnog rasta tumora u oba plućna krila, uz manju smrtnost i veću kontrolu u odnosu na invazivnije metode. Terapija cisplatinom pokazala je značajno smanjenje tumorske mase i produženje preživljavanja, posebno pri češćoj primeni (npr. četiri puta mesečno). Ovi nalazi ističu prednosti IN modela u ispitivanju novih lekova, jer omogućava realniju procenu

antitumorskog dejstva uz manju traumu za životinje, što ga čini obećavajućim alatom za dalja istraživanja carcinoma pluća (27). Takođe humanizovani miševi soja C57BL/6-hPD1, korišćeni su kao organizmi za ispitivanje antitumorskog dejstva nivolumaba (anti-PD-1 antitela). Miševima su potkožno implantirane MC38 ćelije carcinoma debelog creva, a zatim su izlagani nivolumabu, komercijalno dobijenom nivolumabu (Opdivo®) (kontrola) ili PBS (negativna kontrola). Rezultati su pokazali da nivolumab značajno inhibira rast tumora, sa smanjenjem tumorske zapremine od 82,9% i postizanjem potpunog nestanka tumora kod 50% tretiranih miševa, dok je Opdivo® postigao 90,26% inhibicije bez potpunih remisija (28). Mišji modeli su izuzetno važni u otkrivanju novih lekova, posebno u eri personalizovane medicine i imunoterapije. Dalja unapređenja, poput poboljšanih humanizovanih modela i integracije sa 3D tumorskim organoidima, mogu dodatno povećati njihovu prediktivnu snagu i doprineti bržem transferu terapijskih opcija u kliničku praksu (26).

Drosophila melanogaster se pokazala kao izuzetno koristan eksperimentalni model za ispitivanje antitumorskih terapija, što potvrđuju brojne studije koje demonstriraju njenu prediktivnu vrednost (12, 29). *Drosophila melanogaster* je korišćena kao ključni model za ispitivanje efekata dve standardne hemioterapijske supstance - oksaliplatina i 5-fluoro-5'-deoksiuridina - na tumefakcije u modelu kolorektalnog carcinoma. Oksaliplatin i 5-fluoro-5'-deoksiuridin su pokazali selektivno delovanje, smanjujući isključivo tumorske klonove bez uticaja na normalne ćelije, što potvrđuje specifičnost njihovog antitumorskog dejstva. Ovi nalazi ne samo što potvrđuju osetljivost *Drosophila* modela na standardne hemioterapijske protokole već otvaraju i mogućnost za brzi, jeftin i efikasan skrining novih potencijalnih terapija koristeći ovaj model (12). U radu autora Gondala i saradnika (14) *Drosophila melanogaster* je korišćena za razvoj *in silico* personalizovanog modela (DPM) koji integrira Boolean mreže ćelijskih puteva srednjeg creva sa podacima o mutacijama pacijenata sa kolorektalnim karcinomom (CRC). Ključni rezultati pokazuju da kombinacije lekova kao što su paklitaksel-regorafenib i paklitaksel-bortezomib indukuju do 100% apoptoze tumorskih ćelija, dok trametinib i zoledronat potpuno inhibiraju proliferaciju. Model je uspešno korišćen da predvidi odgovor na terapiju kod šest pacijenata sa CRC, pri čemu su četiri pacijenta reagovala na ciljanu monoterapiju (npr. imatinib). Ovi nalazi potvrđuju sposobnost *Drosophila* modela da identifikuje optimalne terapijske kombinacije bazirane na individualnim genomskim profilima, što ga čini obećavajućim alatom za personalizovanu onkološku terapiju i skraćenje vremena potrebnog za prelazak iz predkliničkih u klinička ispitivanja (14). Posebno je značajan doprinos *Drosophila* modela u razvoju novih peptidnih terapija gde je oralno primenjeni TONDU peptid demonstrirao sposobnost inhibicije Yki-Sd interakcije, homologa ljudskog YAP/TEAD signalnog puta, sa značajnim antitumorskim efektima (30). Ovi nalazi svi zajedno potvrđuju vrednost *Drosophila melanogaster* kao moćnog animalnog modela u otkrivanju novih lekova i personalizovanoj onkološkoj farmakoterapiji, sa posebnim osvrtom na brzu validaciju terapijskih strategija pre njihove kliničke primene.

Caenorhabditis elegans je dokazao svoju nezamenjivu vrednost u različitim fazama istraživanja antitumorskih lekova. Kod modelovanja tumorskih procesa, mutirani sojevi poput JK1466 (gld-1(q485)) razvijaju germinalne tumore slične humanim teratomima, omogućavajući direktno praćenje antitumorskog delovanja jedinjenja. U studiji betalaina, betaksantin-triptofan (betaksantin pripada grupi betalaina) je pokazao impresivnu efikasnost - smanjenje tumorske mase za 56,4% i produženje životnog veka za 9,3%, pri čemu je mehanizam delovanja obuhvatao aktivaciju DAF-16/FOXO transkripcionog faktora i insulinskog signalnog puta (30). Farmakogenetičke studije na 5-fluorouracilu (5-FU) otkrile su ključnu ulogu gena za dihidropirimidinsku dehidrogenazu (DPYD-1) i timidilat sintetazu u mehanizmu otpornosti, potvrđujući konzerviranost ovih puteva kod sisara (32). Slično, edelfozin je pokazao selektivno antitumorsko dejstvo putem interakcije sa lipidnim raftovima (Lipidni raftovi su specijalizovani, dinamični mikrodomeni unutar ćelijskih membrana, koji se karakterišu visokom koncentracijom holesterola i sfingolipida), mehanizmom identičnim onom kod humanih tumorskih ćelija (18). Autor Medina i saradnici (33) koristili su *Caenorhabditis elegans* mutantne sojeve sa defektima u Wnt, Notch i Ras-ERK signalnim putevima, koji dovode do sterilnosti, neplodnosti i formiranja multivulve (Muv fenotip). Ovi defekti su analogni poremećajima koji se javljaju u različitim tipovima humanih karcinoma. U njihovom istraživanju, lekovi poput etodolaka i uabajina značajno su povratili mutantne fenotipove, što ukazuje na njihov antikancerogeni potencijal. Ovi rezultati ne samo da potvrđuju primenu *Caenorhabditis elegans* u otkrivanju novih terapija već i ističu prednosti ove eksperimentalne životinje u brzom i jeftinom preliminarnom testiranju lekova pre nego što se pređe na kompleksnije *in vivo* sisteme (33). U radu autora Ye i saradnika (34) *Caenorhabditis elegans* korišćen je kao ključni model organizam za karakterizaciju antitumorskog leka CX-5461, iskorišćavajući njegove prednosti kao što su: (1) brz životni ciklus koji omogućava brze fenotipske analize, (2) providnost koja olakšava vizuelizaciju efekata, i (3) genetsku stabilnost koja garantuje pouzdane rezultate. Kroz farmakogenetičke profile 28 mutanata sa defektima u popravci DNK, autori su utvrdili da CX-5461 deluje kao multimodalni genotoksični agens, za čiju toleranciju su neophodni različiti popravni putevi, uključujući homolognu rekombinaciju i translacionu sintezu. Posebno je važno što je *Caenorhabditis elegans* omogućio detekciju fotosenzitivnosti leka - kombinacija CX-5461 sa UVA zračenjem dovela je do stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i povećane mutageneze. Ova studija jasno pokazuje kako *Caenorhabditis elegans*, zahvaljujući svojoj jednostavnosti i genetskoj prilagodljivosti, može da posluži kao moćan alat za pretkliničku procenu složenih svojstava antitumorskih lekova (34).

Danio rerio je kao model korišćena za brzu i efikasnu analizu glioblastoma, omogućavajući direktno praćenje tumorske infiltracije, angiogeneze i odgovora na terapiju zahvaljujući svojoj transparentnosti i homolognoj krvno-moždanoj barijeri. Ključni rezultati pokazuju da "zebrafish ortotopski ksenografti" (zPDOX) tačno reprodukuju patologiju glioblastoma i mogu predvideti odgovor pacijena-

ta na terapiju, poput temozolomida, već za 20 dana. Ovaj model nudi jeftinu i efikasnu platformu za personalizovanu medicinu i testiranje novih lekova protiv glioblastoma (35). Takođe, u radu Letrada i saradnika (36) zebrića je korišćena kao ključni model za razvoj standardizovanog protokola evaluacije terapije melanoma. Najznačajniji rezultati pokazuju da ovaj model omogućava brzu (za 4 dana) i pouzdanu detekciju antitumorskog efekta, sa redukcijom tumorskog rasta pri primeni selineksor za 122,46%. Ovi nalazi potvrđuju superiornost ovog modela u preliminarnim skrining studijama u odnosu na tradicionalne mišje modele, posebno za testiranje lekova sa lošom solubilnošću (36). Zebrice su posebno vredne za testiranje već odobrenih lekova za nove indikacije. Primera radi, leflunomid (antireumatski lek) je identifikovan kao potentni inhibitor melanoma kroz skrining na modelima neuralne krestice zebrića, što je dovelo do kliničkih studija u kombinaciji sa BRAF inhibitorima. Slično, fenotiazinski derivat flufenazin, originalno korišćen kao antipsihotik, pokazao je iznenadujuću aktivnost protiv T-ćelijske akutne limfoblastne leukemije (T-ALL) u modelima na zebrićama, što je rezultiralo razvojem novog derivata (iHAP1) sa poboljšanim bezbednosnim profilom (23). Zebrice su takođe korišćene za otkrivanje novih lekova, poput inhibitora CXCR4 i CXCR2 puteva, koji su sada u kliničkim ispitivanjima za lečenje metastatskih karcinoma (21).

ZAKLJUČAK

Predklinički animalni modeli predstavljaju ključnu osnovu u istraživanju i razvoju novih antitumorskih terapija, jer omogućavaju temeljno razumevanje tumorske biologije i kompleksnih interakcija unutar mikrookruženja. Prikazane eksperimentalne životinje koje su korišćene za formiranje modela u ovom preglednom radu – mišji modeli (uključujući genetski modifikovane, ksenotransplantacione i humanizovane varijante), *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* i *Danio rerio* – značajno doprinose otkrivanju novih antitumorskih lekova i razumevanju mehanizama kancerogeneze.

Iako svaki od prikazanih modela ima svoje prednosti i ograničenja, njihova komplementarnost omogućava sveobuhvatnu evaluaciju novih antitumorskih lekova. Kombinovanjem rezultata iz različitih animalnih modela moguće je steći dublji uvid u mehanizme nastanka malignih oboljenja, optimizovati strategije za prevazilaženje otpornosti na terapije i unaprediti bezbednost i efikasnost novih lekova pre prelaska iz nivoa predkliničkih ispitivanja u ona koja uključuju ljude.

Abstract

Malignant diseases represent one of the greatest global health challenges, with a continuous increase in incidence and the need for more effective pharmacotherapy. Preclinical animal models play a key role in the discovery and development of new antitumor drugs, enabling the study of tumor biology, mechanisms of metastatic spread, and response to therapy under strictly controlled conditions. This paper analyzes the role of the four most important experimental animals: mouse (*Mus musculus*), fruit fly (*Drosophila melanogaster*), nematode (*Caenorhabditis elegans*) and zebrafish (*Danio rerio*). Mice, especially genetically modified, as well as xenotransplantation models, provide a high genetic similarity to humans and enable the study of complex interactions between tumors and the immune system. *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans*, thanks to their rapid life cycle and genetic conservation, are ideal for high-throughput screening and identification of molecular targets. *Danio rerio*, with its transparency and the possibility of personalized xenografts, offer a unique platform for testing already approved drugs for new indications. Although each model has advantages and limitations, their combination contributes to a better understanding of carcinogenesis and accelerates the development of new pharmacotherapeutic principles. Further advances in genetic and translational technologies will further advance the role of these models in the fight against malignant diseases.

REFERENCE

- Kiri, S., & Ryba, T. (2024). Cancer, metastasis, and the epigenome. *Mol Cancer*, 23(1), 154. <https://doi.org/10.1186/s12943-024-02069-w>
- Zhitao, L., Wubin, Z., Hanjin, W., Ye, C., Yijiao, F., Fan, W., Guoqiang, S., Guangshun, S., Chengyu, L., & Bingqing, H. (2021). Application of Animal Models in Cancer Research Recent Progress and Future Prospects. *Cancer Management and Research*, 13, 2455-2475. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S302565>
- Cekanova, M., & Rathore, K. (2014). Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug Design, Development and Therapy*, 8, 1911-1921. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S49584>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 74(3), 229-263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Sajjad, H., Imtiaz, S., Noor, T., Siddiqui, Y. H., Sajjad, A., & Zia, M. (2021). Cancer models in preclinical research: A chronicle review of advancement in effective cancer research. *Animal models and experimental medicine*, 4(2), 87-103. <https://doi.org/10.1002/ame2.12165>
- Guo, H., Xu, X., Zhang, J., Du, Y., Yang, X., He, Z., Zhao, L., Liang, T., & Guo, L. (2024). The Pivotal Role of Preclinical Animal Models in Anti-Cancer Drug Discovery and Personalized Cancer Therapy Strategies. *Pharmaceuticals (Basel)*, 17(8). <https://doi.org/10.3390/ph17081048>
- Clarke, R. (2009). The role of preclinical animal models in breast cancer drug development. *Breast Cancer Research*, 11. <https://doi.org/10.1186/bcr2441>
- Navale, A. (2013). ANIMAL MODELS OF CANCER: A REVIEW. *International journal of pharmaceutical science and research*, 4(1), 19-28. <http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232>
- Munnik, C., Xaba, M. P., Malindisa, S. T., Russell, B. L., & Sooklal, S. A. (2022). *Drosophila melanogaster*: A platform for anti-cancer drug discovery and personalized therapies. *Frontiers Genetics*, 13, 949241. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.949241>
- Richardson, H. E., Willoughby, L., & Humbert, P. O. (2015). Screening for anticancer drugs in drosophila. *Encyclopedia Life Sciences* 1-14. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022535>
- Mirzoyan, Z., Sollazzo, M., Allocca, M., Valenza, A. M., Grifoni, D., & Bellosta, P. (2019). *Drosophila melanogaster*: A Model Organism to Study Cancer. *Frontiers in genetics*, 10, 51. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00051>
- Adams, J., Casali, A., & Campbell, K. (2021). Sensitive High-Throughput Assays for Tumour Burden Reveal the Response of a *Drosophila melanogaster* Model of Colorectal Cancer to Standard Chemotherapies. *International journal of molecular sciences*, 22(10), Article 5101. <https://doi.org/10.3390/ijms22105101>
- Su, T. T. (2019). Drug screening in *Drosophila*; why, when, and when not?. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, 8(6), e346. <https://doi.org/doi.org/10.1002/wdev.346>
- Gondal, M. N., Butt, R. N., Shah, O. S., Sultan, M. U., Mustafa, G., Nasir, Z., Hussain, R., Khawar, H., Qazi, R., Tariq, M., Faisal, A., & Chaudhary, S. U. (2021). A Personalized Therapeutics Approach Using an In Silico *Drosophila* Patient Model Reveals Optimal Chemo- and Targeted Therapy Combinations for Colorectal Cancer. *Frontiers in oncology*, 11, 692592. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.692592>
- Giunti, S., Andersen, N., Rayes, D., & De Rosa, M. J. (2021). Drug discovery: Insights from the invertebrate *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacology research & perspectives*, 9(2), e00721. <https://doi.org/10.1002/prp2.721>
- Kyriakakis, E., Markaki, M., & Tavernarakis, N. (2014). *Caenorhabditis elegans* as a model for cancer research. *Molecular & cellular oncology*, 2(2), e975027. <https://doi.org/10.4161/23723556.2014.975027>
- Kobet, R. A., Pan, X., Zhang, B., Pak, S. C., Asch, A. S., & Lee, M. H. (2014). *Caenorhabditis elegans*: A Model System for Anti-Cancer Drug Discovery and Therapeutic Target Identification. *Biomolecules & therapeutics*, 22(5), 371-383. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.084>
- Sánchez-Blanco, A., Rodríguez-Matellán, A. G., Reis-Sobreiro, M., Sáenz-Narciso, B., Cabello, J., Mohler, W. A., & Mollinedo, F. (2014). *Caenorhabditis elegans* as a platform to study the mechanism of action of synthetic antitumor lipids. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 13(21), 3375-3389. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.952183>
- Xiao, J., Glasgow, E., & Agarwal, S. (2020). Zebrafish Xenografts for Drug Discovery and Personalized Medicine. *Trends Cancer*, 6(7), 569-579. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.03.012>
- 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(5), 263-273. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0252-3>
- Wawruszak, A., Okon, E., & Dudziak, K. (2023). Advancements in Zebrafish Models for Breast Cancer Research: Unveiling Biomarkers, Targeted Therapies, and Personalized Medicine. *Med Sci Monit*, 29, e940550. <https://doi.org/10.12659/MSM.940550>
- 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 (Basel)*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/biology10040252>

23. Patton, E. E., Zon, L. I., & Langenau, D. M. (2021). Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials. *Nature reviews. Drug discovery*, 20(8), 611-628. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00210-8>
24. Schott, C. R., Koehne, A. L., Sayles, L. C., Young, E. P., Luck, C., Yu, K., Lee, A. G., Breese, M. R., Leung, S. G., Xu, H., Shah, A. T., Liu, H. Y., Spillinger, A., Behroozfard, I. H., Marini, K. D., Dinh, P. T., Pons Ventura, M. V., Vanderboon, E. N., Hazard, F. K., Cho, S. J., ... , & Sweet-Cordero, E. A. (2024). Osteosarcoma PDX-Derived Cell Line Models for Preclinical Drug Evaluation Demonstrate Metastasis Inhibition by Dinaciclib through a Genome-Targeted Approach. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 30(4), 849-864. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-23-0873>
25. Xu, N., Huang, L., Li, X., Watanabe, M., Li, C., Xu, A., Liu, C., Li, Q., Araki, M., Wada, K., Nasu, Y., & Huang, P. (2019). The Novel Combination of Nitroxoline and PD-1 Blockade, Exerts a Potent Antitumor Effect in a Mouse Model of Prostate Cancer. *International journal of biological sciences*, 15(5), 919-928. <https://doi.org/10.7150/ijbs.32259>
26. Qiao, T., Zhao, J., Xin, X., Xiong, Y., Guo, W., Meng, F., Li, H., Feng, Y., Xu, H., Shi, C., & Han, Y. (2023). Combined pembrolizumab and bevacizumab therapy effectively inhibits non-small-cell lung cancer growth and prevents postoperative recurrence and metastasis in humanized mouse model. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 72(5), 1169-1181. <https://doi.org/10.1007/s00262-022-03318-x>
27. Tanaka, R., Yoshinouchi, S., Karouji, K., Tanaka, Y., Tominari, T., Hirata, M., Matsumoto, C., Itoh, Y., Miyaura, C., & Inada, M. (2023). A mouse model of lung cancer induced via intranasal injection for anticancer drug screening and evaluation of pathology. *FEBS open bio*, 13(1), 51-59. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13486>
28. Bulaon, C. J. I., Sun, H., Malla, A., & Phoolcharoen, W. (2023). Therapeutic efficacy of plant-produced Nivolumab in transgenic C57BL/6-hPD-1 mouse implanted with MC38 colon cancer. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 38,e00794. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2023.e00794>
29. Yadav AK, Srikrishna S, Gupta SC. (2016). Cancer Drug Development Using Drosophila as an in vivo Tool: From Bedside to Bench and Back. *Trends Pharmacol Sci*. 37(9):789-806. doi: 10.1016/j.tips.2016.05.010.
30. Bajpai, A., Quazi, T. A., Tang, H. W., Manzar, N., Singh, V., Thakur, A., Ateeq, B., Perrimon, N., & Sinha, P. (2020). A Drosophila model of oral peptide therapeutics for adult intestinal stem cell tumors. *Disease models & mechanisms*, 13(7), dmm044420. <https://doi.org/10.1242/dmm.044420>
31. Henarejos-Escudero, P., Hernández-García, S., Guerrero-Rubio, M. A., García-Carmona, F., & Gandía-Herrero, F. (2020). Antitumoral Drug Potential of Tryptophan-Betaxanthin and Related Plant Betalains in the Caenorhabditis elegans Tumoral Model. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(8),646. <https://doi.org/10.3390/antiox9080646>
32. Kim, S., Park, D. H., & Shim, J. (2008). Thymidylate Synthase and Dihydropyrimidine Dehydrogenase Levels Are Associated with Response to 5-Fluorouracil in Caenorhabditis elegans. *Molecules and cells*, 26(4), 344-349. [https://doi.org/10.1016/S1016-8478\(23\)14006-4](https://doi.org/10.1016/S1016-8478(23)14006-4)
33. Medina, P. M., Ponce, J. M., & Cruz, C. A. (2021). Revealing the anticancer potential of candidate drugs in vivo using Caenorhabditis elegans mutant strains. *Translational oncology*, 14(1), 100940. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100940>
34. Ye, F. B., Hamza, A., Singh, T., Flibotte, S., Hieter, P., & O'Neil, N. J. (2020). A Multimodal Genotoxic Anticancer Drug Characterized by Pharmacogenetic Analysis in Caenorhabditis elegans. *Genetics*, 215(3), 609-621. <https://doi.org/10.1534/genetics.120.303169>
35. Ai, X., Ye, Z., Xiao, C., Zhong, J., Lancman, J. J., Chen, X., Pan, X., Yang, Y., Zhou, L., Wang, X., Shi, H., Zhang, D., Yao, Y., Cao, D., & Zhao, C. (2022). Clinically relevant orthotopic xenograft models of patient-derived glioblastoma in zebrafish. *Dis Model Mech*, 15(4). <https://doi.org/10.1242/dmm.049109>
36. Letrado, P., Mole, H., Montoya, M., Palacios, I., Barriuso, J., Hurlstone, A., Diez-Martinez, R., & Oyarzabal, J. (2021). Systematic Roadmap for Cancer Drug Screening Using Zebrafish Embryo Xenograft Cancer Models: Melanoma Cell Line as a Case Study. *Cancers (Basel)*, 13(15). <https://doi.org/10.3390/cancers13153705>