

Селективное ингибирование *KRAS*-сигнального каскада при комбинированном воздействии низких доз рапамицина и паклитаксела *in vivo*

М. Н. Юрова¹, Д. Р. Сафина², И. В. Мизгирев¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

²ФГБУН Институт молекулярной генетики Российской академии наук; Россия, 123182 Москва, площадь акад. И. В. Курчатова, 2

Контакты: Мария Николаевна Юрова yutarni@gmail.com

Введение. Применение соединений, потенциально способных блокировать функционирование сигнального каскада онкогена *KRAS*, является одним из перспективных направлений современной онкофармакологии.

Цель исследования — изучить эффекты комбинированного действия рапамицина (*RAP*) и паклитаксела (*PAC*) на трансгенной линии зебрафиш (*Danio rerio*), характеризующейся постоянной экспрессией в клетках эпидермиса онкогена *KRASV12*, конъюгированного с зеленым флуоресцентным белком (green fluorescent protein, *GFP*). Эта линия имеет измененный фенотип, обусловленный гиперплазией кератиноцитов и флуоресценцией в них *GFP*-репортера.

Материалы и методы. Эмбрионы рыб в возрасте 6 ч помещали в среду с добавлением 0,1 % раствора диметилсульфоксида (контроль) и различных доз исследуемых препаратов или их комбинаций. Время инкубации составило 72 ч, после чего проводили количественную оценку интенсивности флуоресценции *GFP*-репортера в клетках эпидермиса с помощью компьютерной морфометрии.

Результаты. При воздействии *RAP* выраженность фенотипических изменений уменьшалась вплоть до полной нормализации фенотипа в дозе 50–400 нмоль. *PAC* в дозе 50–250 нмоль не оказывал токсического влияния на развитие эмбрионов, однако дозозависимо повышал уровень флуоресценции репортера, что свидетельствует об усилении экспрессии онкогена *KRAS*. Воздействие низких доз *RAP* (10–25 нмоль), а также *PAC* (10 нмоль) по отдельности не оказывало статистически значимого влияния на выраженность трансформированного фенотипа. В то же время использование различных комбинаций низких доз этих препаратов (*RAP* в дозе 10–25 нмоль в сочетании с *PAC* в дозе 10–50 нмоль) существенно снижало регистрируемый уровень флуоресценции, полностью нормализуя фенотип трансгенных рыб.

Заключение. Выявлено взаимное потенцирующее действие низких доз *RAP* и *PAC*, приводящее к избирательному ингибированию сигнального каскада онкогена *KRAS*, что свидетельствует о перспективности дальнейших исследований комбинации этих препаратов для таргетной терапии опухолей.

Ключевые слова: *KRAS*, зебрафиш, *Danio rerio*, рапамицин, паклитаксел, таргетная терапия, *mTOR*

Для цитирования: Юрова М. Н., Сафина Д. Р., Мизгирев И. В. Селективное ингибирование *KRAS*-сигнального каскада при комбинированном воздействии низких доз рапамицина и паклитаксела *in vivo*. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(2):42–9.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-2-42-49

Selective inhibition of *KRAS* signaling by combination of low dose rapamycin and paclitaxel *in vivo*

M. N. Yurova¹, D. R. Safina², I. V. Mizgirev¹

¹N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 68 Leningradskaya St., Pesochnyy Settlement, Saint Petersburg 197758, Russia;

²Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences; 2 Acad. I. V. Kurchatova Sq., Moscow 123182, Russia

Background. Therapy with compounds potentially capable to block *KRAS* oncogene signaling pathway is perspective direction in modern oncopharmacology.

The aim of current study was to investigate effects of the combined treatment with rapamycin (*RAP*) and paclitaxel (*PAC*) in transgenic zebrafish (*Danio rerio*) with constant expression of mutant *KRASV12* oncogene conjugated to green fluorescent protein (*GFP*) in epidermal cells. This strain has a modified phenotype due to epidermal hyperplasia and expression of *GFP* reporter at skin of embryos and adult fish.

Materials and methods. Fish embryos 6 hpf were exposed to 0.1 % DMSO solution (control) and various doses of the drugs or combinations thereof. *GFP* expression in epidermal cells was morphometrically measured at 72 hpf.

Results. Dose-related decrease in phenotypic changes up to complete epidermal normalization under *RAP* 50–400 nM treatment was observed. Treatment with nontoxic for embryos doses of *PAC* 50–250 nM increased fluorescence level in a dose-dependent manner, indicating an activation of *KRAS* signaling. Using of lower doses of *RAP* (10 and 25 nM) or *PAC* (10 nM) had no statistically significant effect on expression of transformed phenotype. Whereas combined treatment (*RAP* 10–25 nM and *PAC* 10–50 nM) dramatically decreased level of epidermal fluorescence and completely normalized phenotype of transgenic fish.

Conclusions. Thus, mutual potentiating effect of RAP and PAC in low doses which leads to selective inhibition of the KRAS signaling pathway was revealed, indicating the prospect of further studies of these drugs combination for targeted cancer therapy.

Key words: KRAS, zebrafish, *Danio rerio*, rapamycin, paclitaxel, targeted therapy, mTOR

For citation: Yurova M.N., Safina D.R., Mizgirev I.V. Selective inhibition of KRAS signaling by combination of low dose rapamycin and paclitaxel in vivo. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(2):42–9.

Введение

Более 30 % злокачественных опухолей человека имеют мутации в генах семейства RAS. Из них чаще в опухолевых клетках выявляются активирующие мутации в кодонах 12, 13 и 61 онкогена *KRAS*. Активация этого онкогена выявлена более чем в 60 % карцином поджелудочной железы, 50 % опухолей толстой кишки и щитовидной железы, 30 % опухолей легких, а также с меньшей частотой в опухолях других локализаций [1]. Как правило, эти новообразования плохо поддаются лечению современными цитостатическими препаратами. По этой причине альтернативным направлением терапии опухолей, имеющих мутации в гене *KRAS*, становится применение таргетных препаратов, действие которых направлено на избирательное ингибирование отдельных компонентов MEK/ERK и PI3K/AKT сигнальных каскадов, участвующих в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и выживания клеток. Результаты клинических исследований, проводившихся в этом направлении, показали, что использование ингибиторов mTOR (рапамицина (RAP) и его производных – рапалогов) оказывает противоопухолевое действие на злокачественные новообразования молочной железы, печени, нейроэндокринной и лимфатической систем [2, 3]. Более того, в ряде экспериментов показана способность RAP тормозить развитие индуцированных химическими канцерогенами опухолей у грызунов и снижать частоту возникновения спонтанных опухолей у мышей различных линий [4].

Ингибиторы mTOR показали свою эффективность и в качестве агентов, способных усиливать противоопухолевое действие некоторых цитостатических препаратов, используемых при лечении различных типов злокачественных новообразований [5, 6]. Одним из таких препаратов является паклитаксел (PAC), широко применяемый для терапии рака молочной железы, яичников, легкого и пищевода. Основными механизмами действия PAC считаются стабилизация микротрубочек и блокирование митоза с последующей гибелью клеток. Кроме того, имеются данные об индуцирующем действии PAC на сигнальный каскад Raf/ERK [7], что может способствовать усилению пролиферации и предотвращению запуска программы апоптоза. С другой стороны, комбинирование PAC с ингибиторами сигнального каскада PI3K/AKT способствует резкому усилению апоптоза и остановке роста клеточных линий карциномы яичников [8].

Однако механизм, лежащий в основе синергического действия PAC и RAP на сигнальный каскад онко-

гена *KRAS*, еще не полностью понятен и требует дальнейшего изучения с использованием в том числе новых моделей. Одной из таких моделей, популярность которой растет на протяжении последних десятилетий, является рыба *Danio rerio*, или зебрафиш, удачно сочетающая возможность проведения исследований *in vivo*, т. е. на целом организме, с простотой и эффективностью использования клеточных систем *in vitro*. Более того, наличие сходства между опухолями рыб и млекопитающих на гистологическом и молекулярном уровнях позволило успешно использовать зебрафиш для моделирования различных процессов, ассоциированных с развитием злокачественных новообразований человека [9]. В данной работе была использована созданная в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова трансгенная линия зебрафиш tg(krt8:EGFP-KRAS^{V12}), несущая мутантную форму гена *KRAS* под управлением промотора цитокератина 8(krt8), активность которого у рыб проявляется главным образом в клетках покровного эпителия [10]. Эта трансгенная линия имеет выраженные фенотипические отличия от рыб дикого типа и характеризуется гиперплазией клеток эпидермиса, а также экспрессией в них зеленого флуоресцентного белка-репортера GFP (green fluorescent protein). Указанные биологические особенности позволяют позиционировать линию рыб tg(krt8:EGFP-KRAS^{V12}) в качестве перспективной тест-системы для высокопроизводительного скрининга ингибиторов сигнального каскада онкогена *KRAS*, а также для выявления новых комбинаций уже известных ингибиторов и цитостатических препаратов, способных при сочетанном применении направленно усиливать эффективность терапии опухолей, ассоциированных с онкогенами семейства RAS.

Цель работы – изучение влияния комбинированного действия различных доз RAP и PAC на выраженность гиперпластического трансформированного фенотипа (ТФ) эпидермиса трансгенной линии зебрафиш, характеризующейся постоянной экспрессией онкогена *KRAS* в кератиноцитах.

Материалы и методы

Используемые линии зебрафиш. Для улучшения визуализации ТФ в работе использованы рыбы двойной трансгенной линии tg(krt8:EGFP-KRAS^{V12});tg(krt8:EGFP) (далее – линия KRAS^{V12}), характеризующейся постоянной совместной экспрессией в клетках эпидермиса онкогена *KRAS^{V12}* (активирующая мутация в кодоне 12), конъюгированного с флуоресцентным GFP-репортером, и дополнительного GFP-репортера, предназначенного

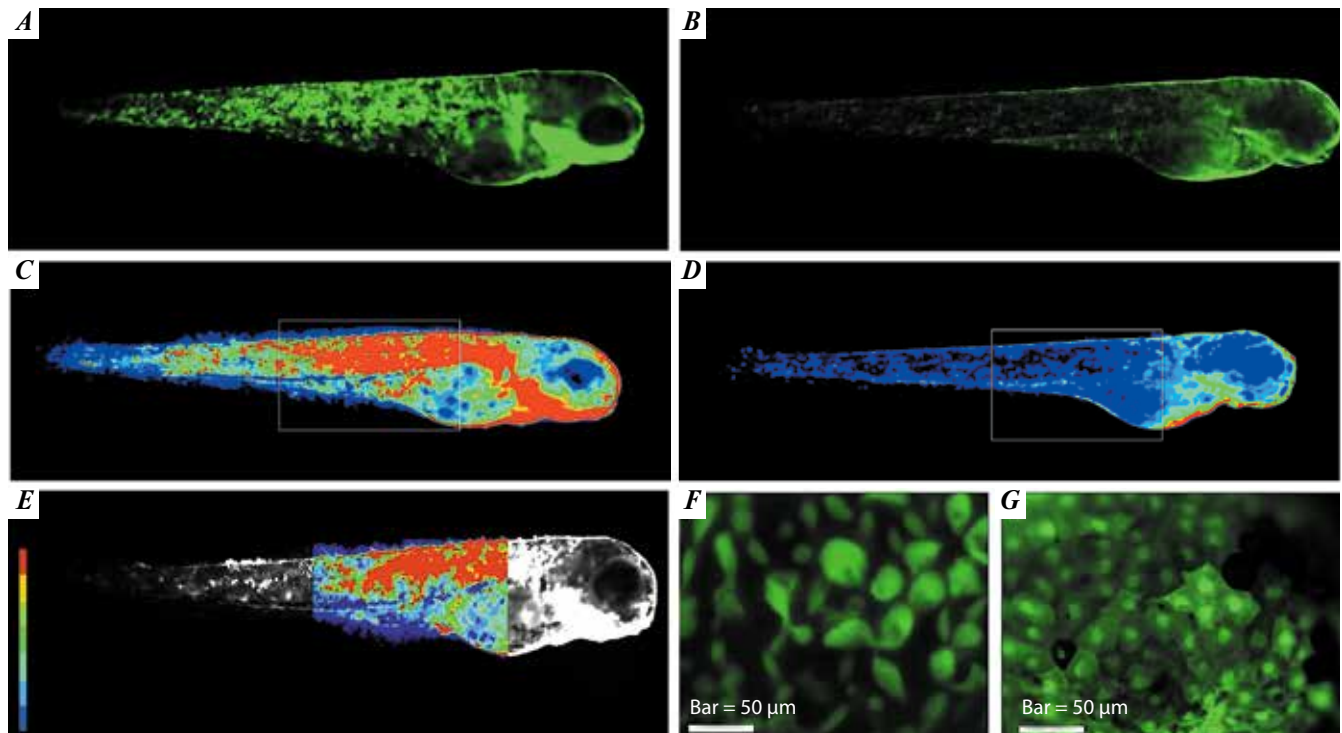


Рис. 1. Морфологические особенности эмбрионов трансгенной *tg(krt8:EGFP-KRASV12);tg(krt8:EGFP)* линии зебрафиш. Внешний вид трансгенного *KRASV12* (A) и контрольного *tg(krt8:EGFP)* (B) эмбрионов в возрасте 72 ч под флуоресцентным микроскопом. Окраска псевдоцветами флуоресцентных изображений *KRASV12* (C) и контрольного (D) эмбрионов. Рамкой выделена область, предназначенная для количественного анализа уровня выраженности трансформированного фенотипа. Красный и желтый цвета соответствуют трансформированному фенотипу и отсутствуют в выделенной области у контрольных рыб. Совмещение изображения окрашенной в псевдоцвета измеряемой области с флуоресцентным монохромным изображением *KRASV12* эмбриона (E) для визуализации геометрической формы и топографии анализируемого участка. Флуоресцентные изображения эпидермальных клеток *KRASV12* (F) и контрольного (G) эмбрионов. Эпидермис контрольных рыб состоит из полигональных клеток, расположенных в виде однослойного плоского эпителия с относительно равномерным уровнем экспрессии GFP-репортера, тогда как кератиноциты *KRASV12* эмбрионов характеризуются округлой формой, пониженной адгезией и повышенным уровнем флуоресценции GFP

Fig. 1. Morphological features of transgenic *tg(krt8:EGFP-KRASV12);tg(krt8:EGFP)* zebrafish embryos. *KRASV12* (A) and control *tg(krt8:EGFP)* (B) embryos at the age of 72 hpf under a fluorescent microscope. Fluorescent images of *KRASV12* (C) and control *tg(krt8:EGFP)* (D) embryos converted to pseudocolors. Level of transformed phenotype expression was analyzed in framed area. Transformed phenotype was characterized by red and yellow pseudocolors lacked in control fish. Pseudocolor area combined with the fluorescent monochrome image of *KRASV12* embryo (E) showing geometric shape and topography of analyzed zone. Fluorescent images of epidermal cells of *KRASV12* (F) and control (G) embryos. The epidermis of control fish consist of a monolayer of squamous polygonal cells with a relatively homogeneous level of GFP expression, whereas keratinocytes of *KRASV12* embryos are characterized by rounded shape, reduced adhesion and increased GFP fluorescence

для усиления интенсивности свечения кератиноцитов (рис. 1A). Все эксперименты выполнены на гетерозиготных эмбрионах, полученных при скрещивании рыб линии *KRASV12*, гомозиготных по обоим трансгенным локусам, с рыбами дикого типа. Трансгенная линия *tg(krt8:EGFP)*, имеющая исходную морфологию эпидермиса, была использована в качестве фенотипического контроля при оценке нормализующего действия препаратов (рис. 1B). Рыбы содержались в проточной аквариумной системе при температуре 28,5 °С. Световой режим в соответствии с международным стандартом поддерживался в соотношении 14 ч/10 ч свет/темнота. Кормление производили 1 раз в сутки науплиями *Artemia salina* и сухим кормом Tetramin (Tetra, Германия). Все исследования проводили в соответствии с правилами Европейской Конвенции о защите позвоночных животных (СДСЕ № 123) и нормами биоэтики (<https://cioms.ch/images/stories/CIOMS/IGP2012.pdf>).

Биоимиджинг и количественная оценка экспрессии трансгена. Оценку уровня экспрессии ТФ выполняли на оцифрованных изображениях трансгенных эмбрионов. Для этого эмбрионы в возрасте 72 ч были обездвижены в 0,0015 % растворе трикаина (Sigma, США) и помещены в агарозные лунки на дне чашек Петри (6 см), заполненных жидкой средой. Оцифровку проводили под флуоресцентным микроскопом Axioskop FL 40 (Carl Zeiss, Германия) с использованием набора фильтров для GFP-репортера и высокочувствительной камеры RT-3 Slider (Diagnostic Instruments, США). Для количественной оценки уровня экспрессии ТФ монохромные 8-битные (256 градаций серого) изображения были окрашены в псевдоцвета, соответствующие 7 диапазонам яркости (рис. 1C, D). Стандартно для анализа экспрессии ТФ был выбран участок тела эмбриона, имеющий четкие анатомические границы и локализованный между серединой желточного мешка и урогенитальным отверстием (рис. 1E). Площадь

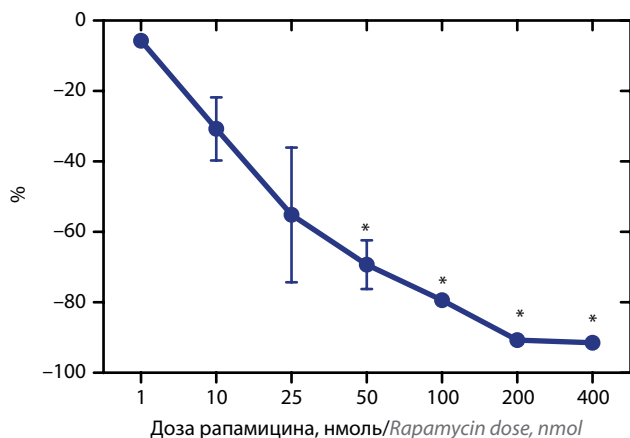


Рис. 2. Дозозависимое торможение выраженности трансформированного фенотипа под воздействием рапамицина (RAP), оцениваемое по снижению площади (в пикселях) наиболее ярких областей в процентах относительно контроля (DMCO). *Различия с контролем статистически достоверны ($p < 0,05$)

Fig. 2. Dose-dependent effect of rapamycin (RAP) treatment on transformed phenotype expression, estimated by decreasing in percentage of the most brightened areas relative to the control (DMSO). * $p < 0.05$ in comparison with control

(в пикселях) наиболее ярких областей (с интенсивностью свечения 190–255), окрашенных у эмбрионов линии KRASV12 в красный и желтый псевдоцвета, которые отсутствовали у контрольных рыб tg(krt8:EGFP), была выбрана нами для количественной оценки степени трансформированности эпидермиса.

Тестирование соединений. Эмбрионы рыб в возрасте 6 ч были помещены в 6-луночные планшеты, содержащие тестируемые соединения, по 20 эмбрионов в каждую лунку. PAC (TEVA, Израиль) и RAP (LC Laboratories, США) использовали в концентрациях 1–2000 нмоль и 1–400 нмоль соответственно. Доза растворителя диметилсульфоксида (DMCO) составляла 0,1 % в экспериментальных и контрольной группах. Инкубацию проводили в термостате при температуре 28,5 °C до достижения эмбрионами возраста 72 ч.

Статистический анализ. При статистической обработке результатов опытов использовали методы вариационной статистики с помощью пакета статистических программ GraphPad Prism 6. Достоверность различий оценивали с применением теста Фишера LSD для one-way ANOVA.

Результаты

Морфология трансформированного фенотипа. Покровный эпителий трансгенных эмбрионов KRASV12 имел ряд морфологических признаков, свойственных трансформированной ткани. В частности, эпидермис личинок рыб в возрасте 48–72 ч характеризовался гиперпластическим многослойным ростом, потерей клетками способности к контактному торможению и пониженным уровнем тканевой адгезии. На клеточном уровне морфологические изменения приводили к уменьшению размеров клеток, приобретению ими округлой формы и усилению флуоресценции GFP-

репортера (рис. 1F). Указанные признаки никогда не встречались у контрольных рыб tg(krt8:EGFP), эпидермис которых состоял из полигональных клеток, расположенных в виде однослойного плоского эпителия с относительно равномерным уровнем экспрессии флуоресцентного репортера (рис. 1G).

Влияние RAP на формирование ТФ. Воздействие RAP приводило к дозозависимому снижению выраженности ТФ эпидермиса у эмбрионов KRASV12 (рис. 2). При этом дозы RAP в диапазоне от 1 до 25 нмоль не оказывали статистически значимого влияния на ТФ эмбрионов KRASV12. Дозы от 50 до 100 нмоль приводили к уменьшению признаков пренеопластической трансформации эпидермиса, о чем наряду с морфологическими изменениями свидетельствовало сокращение на 70–80 % доли красной и желтой областей на окрашенных псевдоцветами цифровых изображениях эмбрионов KRASV12 по сравнению с контрольной группой, обработанной DMCO. Применение более высоких (200–400 нмоль) доз RAP способствовало практически полной нормализации ТФ на тканевом и клеточном уровнях, усиливая морфологическое сходство эпидермиса KRASV12 и контрольных (несущих только трансген krt8:EGFP) эмбрионов. Вместе с тем следует отметить, что воздействие высоких доз RAP (200–400 нмоль) приводило к замедлению эмбрионального развития, что выражалось в сокращении длины тела и сохранении округлой формы желточного мешка (рис. 3A).

Влияние PAC на формирование ТФ. PAC в низких дозах (1–100 нмоль) не оказывал заметного влияния на выраженность морфологических изменений, обусловленных гиперэкспрессией трансгена KRAS в коже эмбрионов при 72-часовой экспозиции. Умеренные дозы PAC (100–500 нмоль) незначительно увеличивали выраженность признаков ТФ по сравнению с контролем, но, как правило, это увеличение не имело статистической значимости. Воздействие высоких доз PAC (>500 нмоль) способствовало значительному усилению гиперпластических процессов в эпидермисе, что выражалось в увеличении на 180–300 % доли красного и желтого псевдоцветов на цифровых изображениях эмбрионов KRASV12 (рис. 4). Следует отметить, что аппликация максимально переносимой дозы PAC, равной 1000 нмоль, примерно в трети случаев приводила к появлению аномальных эмбрионов, характеризующихся искривлением осевых структур (рис. 3B). Дозы PAC, равные или превышающие 2000 нмоль, были токсичны и вызывали гибель 100 % эмбрионов в течение 24–72 ч.

Влияние комбинации RAP и PAC на формирование ТФ. Совместное действие RAP и PAC в низких концентрациях (1–25 и 1–50 нмоль соответственно), не оказывавших по отдельности статистически значимого влияния на фенотип эмбрионов KRASV12 (рис. 3C–E), приводило к резкому уменьшению выраженности основных признаков трансформации эпидермальной

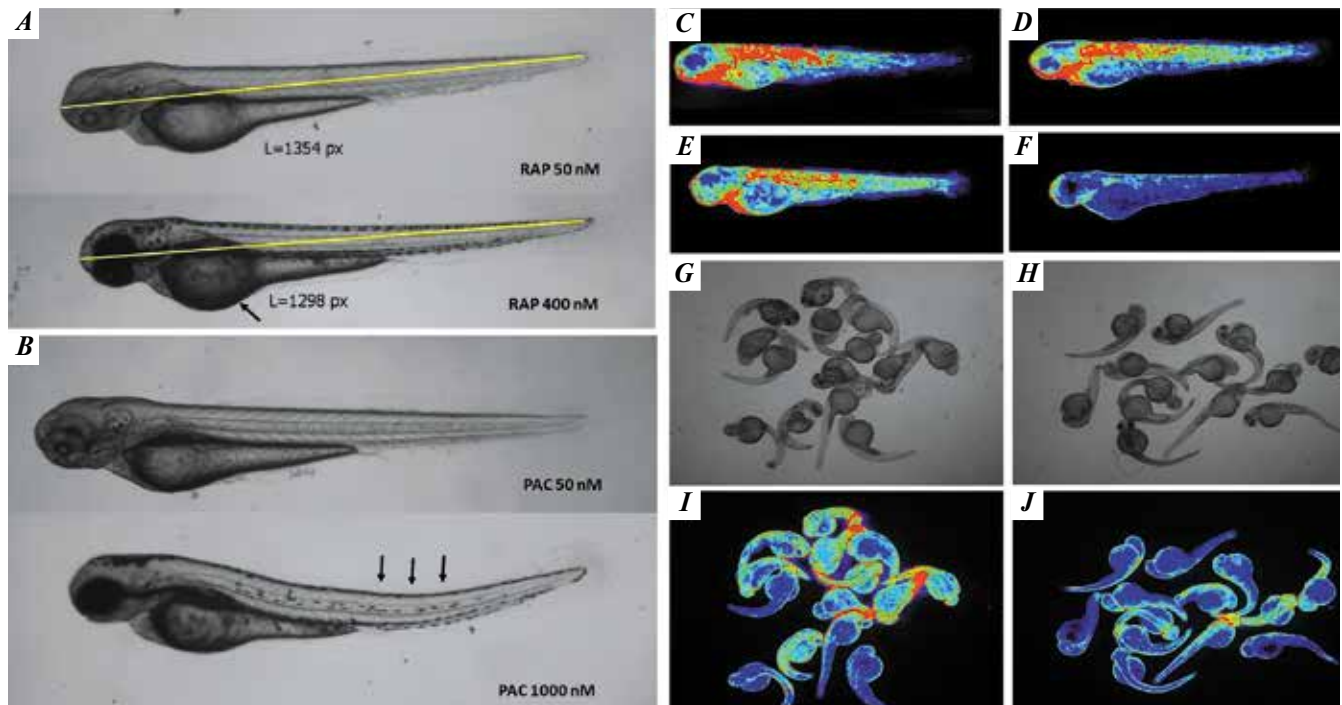


Рис. 3. Влияние паклитаксела (PAC), рапамицина (RAP) и их комбинации на эмбриональное развитие и выраженность трансформированного фенотипа (ТФ) у *KRASV12* зебрафиш. Морфология эмбрионов обработанных низкой (50 нмоль) и высокой (400 нмоль) дозами RAP (A). Наблюдались сокращение длины тела и отсутствие элонгации желточного мешка (указано стрелкой) эмбрионов, подвергнутых воздействию высокой концентрации ингибитора. Искривление осевых структур эмбрионов (указано стрелками) под влиянием высокой дозы PAC (1000 нмоль) (B). Растворитель ДМСО (C) и низкие дозы PAC (D) и RAP (E) не оказывали влияния на уровень экспрессии ТФ у *KRASV12* эмбрионов в отличие от их комбинации (F), полностью нормализующей структуру эпидермиса. PAC в дозе 2000 нмоль при индивидуальном применении (G, I) и в комбинации с RAP в дозе 50 нмоль (H, J) оказывал одинаковое токсическое действие на эмбрионы зебрафиш (G, H), но проявлял синергизм с RAP, нормализуя фенотип эмбрионов (I, J). Возраст эмбрионов на фотографиях равен 72 (A – F) и 48 (G – I) ч. Фотографии A, B, G, H получены при обычном освещении, а C – F, I, J – в свете флуоресценции и окрашены в псевдоцвета

Fig. 3. Effect of paclitaxel (PAC), rapamycin (RAP) and their combination on embryonic development and expression of transformed phenotype in *KRASV12* zebrafish. Morphology of embryos treated with low (50 nmol) and high (400 nmol) doses of RAP (A). Decreased body length and absence of yolk sac elongation (arrow) of embryos exposed to a high RAP dose were observed. Deformation of axial structures of embryos (arrows) under high dose of PAC (1000 nmol) was revealed (B). DMSO solvent (C) and low doses of PAC (D) and RAP (E) did not affect the level of transformed phenotype expression in *KRASV12* embryos, whereas their combination (F) completely normalized epidermal morphology. Despite the high toxicity of PAC (2000 nmol) causing embryo malformation (G, I), combination of it with low dose of RAP (50 nmol) displayed epidermal normalization (H, J). Embryos are aged 72 hpf (A – F) and 48 hpf (G – I). Pictures A, B, G, H – bright field microscopy; pictures C – F, I, J – fluorescence microscopy converted to pseudocolors

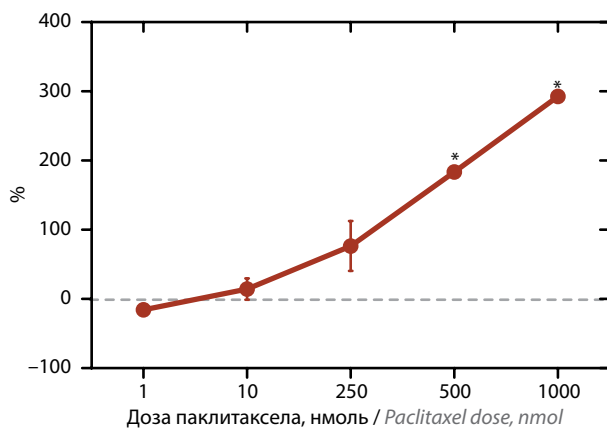


Рис. 4. Дозозависимое усиление выраженности трансформированного фенотипа под воздействием паклитаксела (PAC), оцениваемое по увеличению площади (в пикселях) наиболее ярких областей в процентах относительно контроля (ДМСО). *Различия с контролем статистически достоверны ($p < 0,05$)

Fig. 4. Dose-dependent effect of paclitaxel (PAC) treatment on transformed phenotype expression, estimated by increasing in percentage of the most brightened areas relative to the control (DMSO). * $p < 0.05$ in comparison with control

ткани вплоть до полной ее нормализации (рис. 3F), начиная с комбинации доз, равных или превышающих 10 нмоль, для обоих препаратов (рис. 5). Увеличение дозы PAC до токсического уровня (2000 нмоль) не влияло на способность RAP (в дозе 50 нмоль) нормализовывать трансгенный фенотип *KRASV12* у двухдневных эмбрионов (рис. 3I, J). При этом RAP не оказывал заметного тормозящего действия на формирование множественных летальных нарушений эмбрионального развития, обусловленных цитотоксической активностью PAC (рис. 3G, H).

Обсуждение

В результате проведенной работы получены данные о влиянии PAC и RAP на формирование ТФ в эпидермальной ткани новой трансгенной линии зебрафиш, способной к постоянной экспрессии онкогена *KRAS* в кератиноцитах. Следует отметить, что данная модель, обладая многими признаками, присущими опухолевому процессу (тканевая гиперплазия, снижение ад-

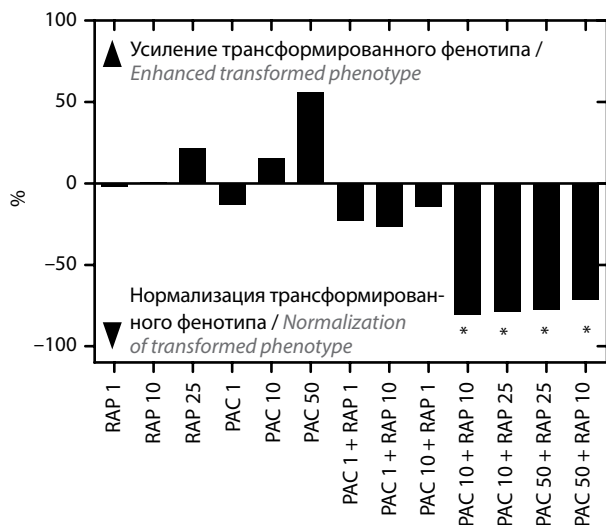


Рис. 5. Влияние монорежима и комбинаций рапамицина (RAP) и паклитаксела (PAC) на выраженность трансформированного фенотипа. По оси абсцисс: дозы препаратов, нмоль. По оси ординат: площадь (в пикселях) наиболее ярких областей в процентах относительно контроля ДМСО. *Различия с контролем ДМСО статистически достоверны ($p < 0,05$)

Fig. 5. Effect of rapamycin (RAP) and paclitaxel (PAC) on transformed phenotype expression. X-axis: drug doses, nmol. Y-axis: percentage of the most brightened areas relative to the control (DMSO). * $p < 0.05$ in comparison with control

гезивности, отсутствие контактного торможения), тем не менее, не приводит к развитию злокачественных новообразований кожи. Возможно, механизм этого феномена обусловлен непрерывным слущиванием трансформированных кератиноцитов во внешнюю среду из-за резкого ослабления межклеточных контактов. В этом случае опухоль просто не успевает сформироваться из-за быстрой элиминации потенциально онкогенных клеток. Это предположение косвенно подтверждается тем, что другие модели, основанные на экспрессии онкогена *KRAS* в тканях, которые ограничены внутренней средой организма рыб, способны приводить на определенном этапе к развитию типичных злокачественных опухолей различных локализаций [11, 12]. Тем не менее эти модели имеют ряд ограничений для практического использования, обусловленных длительным (несколько месяцев) латентным периодом и отсутствием синхронности развития новообразований. Единственным исключением, позволяющим иметь практически любое количество одновременно развивающихся опухолей, являются перевивные опухолевые штаммы, индуцированные с использованием сингенных клональных линий *D. rerio* [13]. Однако применение этого подхода требует более длительной (до 3 нед) экспозиции животных к тестируемым препаратам [14] по сравнению с моделями, основанными на редуцированном наборе признаков опухолевой трансформации, включая описанную в данной работе трансгенную линию. Поэтому, модели, основанные на нормализации ТФ, не имеют в настоящее время альтернативы в качестве тест-системы организменного уровня, предназначенной для предварительного

отбора новых комбинаций ингибиторов сигнального каскада онкогена *KRAS*.

Как и ожидалось, RAP – известный ингибитор mTOR – оказывал дозозависимый эффект на выраженность признаков опухолеподобной трансформации в эпидермисе трансгенных рыб линии KRASV12 вплоть до полной фенотипической нормализации тканевой структуры. При этом достоверные отличия от контрольной группы KRASV12, подвергнутой воздействию растворителя (ДМСО), начинались уже с дозы, равной 50 нмоль, а доза RAP, равная 400 нмоль, способствовала полной нормализации фенотипа трансгенных рыб. Вместе с тем высокие дозы RAP приводили к уменьшению размеров тела эмбрионов и задержке их развития (см. рис. 3А). Из серьезных нарушений, вызванных действием RAP в максимальной дозе 400 нмоль, следует отметить аномалию формирования желудочно-кишечного тракта, что согласуется с данными литературы [15].

Следует отметить, что и на других трансгенных моделях, связанных с гиперэкспрессией генов семейства RAS и характеризующихся развитием гиперплазии тканей у эмбрионов рыб, действие различных ингибиторов сигнальных каскадов MEK/ERK и PI3K/AKT также приводило к нормализации измененного фенотипа. В частности, снижение скорости пролиферации гепатоцитов под влиянием ингибиторов каскадов MEK/ERK и PI3K/AKT отмечено на мифепристониндуцибельной модели LexPR опухолей печени зебрафиш, основанной на активации генной конструкции, содержащей онкоген *KRASV12*. При этом установлено, что для полного подавления процесса пролиферации гепатоцитов необходимо ингибирование обеих ветвей сигнального каскада, являющегося эффектором онкогена *KRAS* [16]. Похожие результаты получены и на трансгенной модели меланомы зебрафиш tg(mitfa:V12HRAS;mitfa:GFP), развитие которой обусловлено гиперэкспрессией мутантной формы гена *HRAS* в меланоцитах. В этом случае ингибирование каскадов MEK/ERK и PI3K/AKT приводило к торможению гиперплазии меланоцитов и снижению скорости роста опухолей [17].

В отличие от RAP, химиотерапевтический препарат таксанового ряда PAC оказывал противоположное действие на выраженность ТФ у эмбрионов линии KRASV12, начиная с дозы 500 нмоль. Имеющиеся в литературе немногочисленные данные о воздействии этого цитостатика на зебрафиш указывают на то, что помимо нейротоксического эффекта PAC оказывает повреждающее действие на клетки эпидермиса личинок и уменьшает резистентность их кожи к механическому стрессу [18]. В наших экспериментах нарушения формирования осевых структур были выявлены у 30 % животных, подвергнутых действию PAC в дозе 1000 нмоль. Увеличение дозы PAC до 2000 нмоль приводило к аномальному развитию 100 % обработанных эмбрионов через 48 ч и их гибели в возрасте 72 ч.

Мы предполагаем, что проявление токсического действия PAC на эмбрионы обусловлено его способностью блокировать клеточную пролиферацию на границе стадий митотического цикла G2 – M, что является основным механизмом его действия как цитостатического агента.

С другой стороны, совместное применение низких доз PAC (10 и 50 нмоль) и RAP (10 и 25 нмоль), которые при индивидуальном использовании не оказывали выраженного эффекта на измененный эпидермис эмбрионов линии KRASV12, приводило к полной нормализации ТФ. Эти результаты, полученные нами на модели *in vivo*, хорошо согласуются с многочисленными данными литературы, где было показано, что сочетание PAC и RAP (или его аналогов) обладает синергическим действием на опухолевые линии, снижая скорость пролиферации клеток в условиях *in vitro*. Так, применение комбинации RAP и PAC ингибировало рост клеток линий рака молочной железы MCF-7 и MDAMB-468, при этом клеточные линии, которые были изначально резистентны к ингибирующему действию RAP, оказались также не чувствительны к совместному действию RAP с химиотерапевтическими препаратами [5]. Ингибиторы mTOR (RAP и RAD001) тормозили пролиферацию клеток рака эндометрия Ishikawa, ECC-1 и HEC-1A человека и повышали их чувствительность к апоптозу, индуцированному PAC [19]. Использование комбинации PAC и ингибиторов сигнального каскада PI3K/AKT (RAP и BEZ235) более эффективно тормозило рост клеток рака толстой кишки HCT-116 и HT-29, чем каждый из препаратов в отдельности [20]. В ряде клинических испытаний также показан синергический ингибирующий эффект рапалогов и PAC на рост солидных опухолей, рака эндометрия и молочной железы [21, 22].

В целом наши наблюдения свидетельствуют о том, что усиление выраженности ТФ у эмбрионов линии KRASV12 при индивидуальном использовании PAC или, наоборот, нормализация структуры покровного

эпителия рыб при его сочетании с RAP, обусловлено способностью PAC, помимо цитотоксического действия, связанного с блокированием митотического цикла, прямо или опосредованно взаимодействовать с определенными компонентами сигнального каскада онкогена KRAS. При этом представляется вероятным, что клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе отмеченных эффектов, практически не связаны между собой. Подтверждением этого вывода может служить обнаруженный нами феномен нормализации фенотипа эмбрионов линии KRASV12, подвергнутых сочетанному воздействию летальной дозы PAC (2000 нмоль) и не оказывающей влияния на ТФ концентрации RAP (50 нмоль) в течение 48 ч. При этом токсический эффект цитостатика, оцениваемый по числу аномальных эмбрионов, оставался неизменным и соответствовал уровню контрольной группы, обработанной только высокой дозой PAC (см. рис. 3G–J). Интересно отметить, что сочетание более низких доз PAC (10 и 50 нмоль) и RAP (10 и 25 нмоль) приводило к замедлению формирования эмбрионов, что характерно для высоких доз (200 и 400 нмоль) RAP, а не усиливало токсическое действие PAC, что, как можно предположить, выразалось бы в увеличении числа рыб с серьезными аномалиями развития.

Заключение

В силу высокой консервативности механизмов канцерогенеза у рыб и млекопитающих трансляционная составляющая результатов экспериментов на зебрафиш обладает предиктивным потенциалом, сопоставимым с традиционными онкологическими моделями с использованием грызунов. Поэтому дальнейшее изучение комбинированного применения низких доз (существенно меньше максимально переносимых) PAC и ингибиторов mTOR может стать основой для создания клинического протокола таргетной терапии RAS-ассоциированных опухолей, в том числе резистентных к цитотоксическому действию PAC.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bos J.L. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49(17):4682–9. PMID: 2547513.
2. Easton J.B., Houghton P.J. mTOR and cancer therapy. *Oncogene* 2006;25(48):6436–46. DOI: 10.1038/sj.onc.1209886. PMID: 17041628.
3. Conciatori F., Ciuffreda L., Bazzichetto C. et al. mTOR cross-talk in cancer and potential for combination therapy. *Cancers (Basel)* 2018;10(1):E23. DOI: 10.3390/cancers10010023. PMID: 29351204.
4. Blagosklonny M.V. Rapalogs in cancer prevention: anti-aging or anticancer? *Cancer Biol Ther* 2012;13(14):1349–54. DOI: 10.4161/cbt.22859. PMID: 23151465.
5. Mondesire W.H., Jian W., Zhang H. et al. Targeting mammalian target of rapamycin synergistically enhances chemotherapy-induced cytotoxicity in breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004;10(20):7031–42. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0361. PMID: 15501983.
6. Shafer A., Zhou C., Gehrig P.A. et al. Rapamycin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer cells through inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. *Int J Cancer* 2010;126(5):1144–54. DOI: 10.1002/ijc.24837. PMID: 19688827.
7. Okano J., Rustgi A.K. Paclitaxel induces prolonged activation of the Ras/MEK/ERK pathway independently of activating the programmed cell death machinery. *J Biol Chem* 2001;276(22):19555–64. DOI: 10.1074/jbc.M011164200. PMID: 11278851.
8. Mabuchi S., Ohmichi M., Kimura A. et al. Inhibition of phosphorylation of BAD and Raf-1 by Akt sensitizes human ovarian cancer cells to paclitaxel. *J Biol Chem* 2002;277(36):33490–500. DOI: 10.1074/jbc.M204042200. PMID: 12087097.
9. Amatruda J.F., Patton E.E. Genetic models of cancer in zebrafish. *Int Rev Cell Mol Biol* 2008;271:1–34. DOI: 10.1016/S1937-6448(08)01201-X. PMID: 19081540.

10. Gong Z., Ju B., Wang X. et al. Green fluorescent protein expression in germ-line transmitted transgenic zebrafish under a stratified epithelial promoter from keratin 8. *Dev Dyn* 2002;223(2):204–15. DOI: 10.1002/dvdy.10051. PMID: 11836785.
11. Liu S., Leach S.D. Zebrafish models for cancer. *Annu Rev Pathol* 2011;6:71–93. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130330. PMID: 21261518.
12. Astone M., Dankert E.N., Alam S.K., Hoepfner L.H. Fishing for cures: the aLURE of using zebrafish to develop precision oncology therapies. *NPJ precision oncology* 2017;1:39. DOI: 10.1038/s41698-017-0043-9. PMID: 29376139.
13. Mizgirev I.V., Revskoy S.Y. Transplantable tumor lines generated in clonal zebrafish. *Cancer Res* 2006;66(6):3120–5. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3800. PMID: 16540662.
14. Mizgirev I.V., Revskoy S. A new zebrafish model for experimental leukemia therapy. *Cancer Biol Ther* 2010;9(11):895–902. PMID: 20339318.
15. Kuscic C. Effect of rapamycin on early development of Zebrafish (*Danio rerio*). A thesis submitted to the Department of Molecular Biology and Genetics of Bilkent University, 2004. 77 p.
16. Nguyen A.T., Emelyanov A., Koh C.H. et al. An inducible KRASV12 transgenic zebrafish model for liver tumorigenesis and chemical drug screening. *Dis Model Mech* 2012;5(1):63–72. DOI: 10.1242/dmm.008367. PMID: 21903676.
17. Fernandez Del Ama L., Jones M., Walker P. et al. Reprofling using a zebrafish melanoma model reveals drugs cooperating with targeted therapeutics. *Oncotarget* 2016;7(26):40348–61. DOI: 10.18632/oncotarget.9613. PMID: 27248171.
18. Lisse T.S., Middleton L.J., Pellegrini A.D. et al. Paclitaxel-induced epithelial damage and ectopic MMP-13 expression promotes neurotoxicity in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113(15):E2189–98. DOI: 10.1073/pnas.1525096113. PMID: 27035978.
19. Wang H., Li D., Li X. et al. Mammalian target of rapamycin inhibitor RAD001 sensitizes endometrial cancer cells to paclitaxel-induced apoptosis via the induction of autophagy. *Oncol Lett* 2016;12(6):5029–35. DOI: 10.3892/ol.2016.5338. PMID: 28105210.
20. Zou H., Li L., Garcia Carcedo I. et al. Synergistic inhibition of colon cancer cell growth with nanoemulsion-loaded paclitaxel and PI3K/mTOR dual inhibitor BEZ235 through apoptosis. *Int J Nanomedicine* 2016;11:1947–58. DOI: 10.2147/IJN.S100744. PMID: 27226714.
21. Campone M., Levy V., Bourbouloux E. et al. Safety and pharmacokinetics of paclitaxel and the oral mTOR inhibitor everolimus in advanced solid tumours. *Br J Cancer* 2009;100(2):315–21. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604851. PMID: 19127256.
22. Hurvitz S.A., Dalenc F., Campone M. et al. A Phase 2 study of everolimus combined with trastuzumab and paclitaxel in patients with HER2-overexpressing advanced breast cancer that progressed during prior trastuzumab and taxane therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2013;141:437–46. DOI: 10.1007/s10549-013-2689-5. PMID: 24101324.

Вклад авторов

М.Н. Юрова: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 Д.Р. Сафина: анализ полученных данных, подготовка иллюстраций, написание текста рукописи;
 И.В. Мизгирев: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, написание текста рукописи.

Authors' contributions

M.N. Yurova: developing the research design, analysis of the obtained data, article writing;
 D.R. Safina: analysis of the obtained data, preparation of illustrations, article writing;
 I.V. Mizgirev: developing the research design, obtaining data for analysis, article writing.

ORCID авторов

М.Н. Юрова: <https://orcid.org/0000-0003-3589-5871>

ORCID of authors

M.N. Yurova: <https://orcid.org/0000-0003-3589-5871>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 17-75-10112).
Financing. The study was performed with the support of the Russian Science Foundation (grant No. 17-75-10112).

Протокол исследования одобрен Комитетом по этике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (выписка № 3/168 из протокола очередного заседания № 17 от 22.09.2017).

The study protocol was approved by the Ethics Committee of the N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (extract No. 3/168 from the protocol of a regular session No. 17 from 22.09.2017).

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 13.02.2018. **Принята к публикации:** 24.05.2018

Article received: 13.02.2018. **Accepted for publication:** 24.05.2018