Для цитирования: Кит С.О., Максимов Р.А., Гончарова А.С., Лукбанова Е.А., Карнауков Н.С., Непомнящая Е.М., Миндарь М.В., Ткачев С.Ю., Колесников Е.Н. Создание пациентоподобной модели рака пищевода на иммунодефицитных мышах. Сибирский онкологический журнал. 2020; 19(2): 70–75. – doi: 10.21294/1814-4861-2020-19-2-70-75.

For citation: Kit S.O., Maksimov R.A., Goncharova A.S., Lukbanova E.A., Karnaukhov N.S., Nepomnyashchaya E.M., Mindar M.V., Tkachev S.Yu., Kolesnikov E.N. Creation of a patient-like model of esophageal cancer in immunodeficient mice. Siberian Journal of Oncology. 2020; 19(2): 70–75. – doi: 10.21294/1814-4861-2020-19-2-70-75.

СОЗДАНИЕ ПАЦИЕНТОПОДОБНОЙ МОДЕЛИ РАКА ПИЩЕВОДА НА ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ МЫШАХ

С.О. Кит, Р.А. Максимов, А.С. Гончарова, Е.А. Лукбанова, Н.С. Карнауков, Е.М. Непомнящая, М.В. Миндарь, С.Ю. Ткачев, Е.Н. Колесников

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Россия

Россия, 344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63. E-mail: katya.samarskaja@yandex.ru

Аннотация

Введение. Для изучения противоопухолевого действия веществ *in vivo* требуется создание модели, отражающей основные характеристики заболевания человека. Такому требованию могут отвечать пациентоподобные ксенографты (Patient Derived Xenograft – PDX) на иммунодефицитных мышах. Пациентоподобные модели опухолей считаются наиболее прогрессивными по причине их способности сохранять после имплантации свои первоначальные свойства, характеризующиеся разнообразием на гистологическом и молекулярном уровне. **Целью исследования** явилось создание PDX-модели рака пищевода человека в шейном отделе пищевода иммунодефицитных мышей. **Материал и методы.** Для создания PDX-модели рака пищевода человека было использовано 11 самцов иммунодефицитных мышей линии Balb/c Nude массой 19–22 г. Фрагмент опухоли был взят от пациента с диагнозом инфильтративно-язвенного рака – умереннодифференцированной плоскоклеточной карциномы без ороговения. **Результаты.** В результате имплантации донорского фрагмента опухоли наблюдалось полное приживление материала у 6 (54,5 %) из 11 животных, что согласуется с литературными данными. По результатам морфологических исследований, пациентоподобный ксенографт является плоскоклеточной карциномой, что гистологически соответствует опухоли пациента.

Ключевые слова: рак пищевода, пациентоподобная модель, иммунодефицитные мыши, плоскоклеточная карцинома.

CREATION OF A PATIENT-LIKE MODEL OF ESOPHAGEAL CANCER IN IMMUNODEFICIENT MICE

S.O. Kit, R.A. Maksimov, A.S. Goncharova, E.A. Lukbanova, N.S. Karnaukhov, E.M. Nepomnyashchaya, M.V. Mindar, S.Yu. Tkachev, E.N. Kolesnikov

Rostov Research Cancer Institute of the Ministry of Health of the Russian Federation,

Rostov-on-Don, Russia

63, 14th Liniya Street, 344037, Rostov-on-Don, Russia. E-mail: katya.samarskaja@yandex.ru

Abstract

Introduction. To study the antitumor effect of substances *in vivo*, it is necessary to create a model that reflects the main characteristics of a human disease. Patient-like xenografts (Patient Derived Xenograft, PDX) on immunodeficient mice can meet this requirement. Patient-like tumor models are considered the most progressive because of their ability to maintain their initial properties, characterized by diversity at the histological and molecular level, after implantation. **The aim of the study** was to create a PDX model of human esophageal cancer in the cervical esophagus of immunodeficient mice. **Material and Methods.** To create a PDX-model of human esophageal cancer, 11 male Balb/c Nude immunodeficient mice weighing 19–22 g

were used. A tumor fragment was taken from a patient with a diagnosis of ulcerative cancer – a moderately differentiated squamous cell carcinoma without keratinization. **Results.** As a result of implantation of a donor tumor fragment, complete engraftment of the material was observed in 6 (54.5 %) out of 11 animals, which is consistent with published data. According with the results of morphological studies, a patient-like xenograft is a squamous cell carcinoma, which histologically corresponds to the patient's tumor.

Key words: esophageal cancer, patient-like model, immunodeficient mice, squamous cell carcinoma.

Введение

Среди всех онкологических заболеваний рак пищевода (РП) занимает 9-е место в мире и 7-е – в России, при этом смертность достигает 80 % [1, 2]. Причиной служат скрытое течение заболевания на ранних этапах, высокая вероятность развития отделенных метастазов, распространение в структуры средостения [3]. Рак пищевода выявляется зачастую уже на поздних стадиях, в результате чего хирургическое лечение может быть противопоказанным. Частота операционных осложнений может достигать 60 %, из них наиболее грозными являются кровотечения, повреждения внутренних органов и кровеносных сосудов, медиастинит, несостоятельность швов, эмпиема плевры [4]. Наиболее сложно поддается лечению шейный отдел пищевода ввиду близкого расположения жизненно важных органов и калечащего характера операций, поэтому при этой локализации РП наиболее предпочтительным методом является химиолучевая терапия [5].

В клинической практике применяется большое количество химиопрепаратов. Однако современные противоопухолевые препараты имеют ряд недостатков, в том числе узкий диапазон терапевтических доз. Химиопрепараты зачастую обладают тяжелыми побочными эффектами и вместе с этим чрезвычайно дороги. Подсчитано, что расходы на лечение одного пациента могут составлять до нескольких десятков тысяч долларов в месяц [6]. В связи с вышеперечисленным актуальным является поиск новых лекарственных средств, обладающих улучшенными свойствами по сравнению с уже используемыми в онкологии.

В мире проводятся доклинические исследования миллионов веществ с вероятным противоопухолевым действием, и лишь единицы из них внедряются в клиническую практику, пройдя все фазы испытаний в течение более 10 лет. Доклинические исследования каждой новой фармакологической субстанции включают этапы *in vitro* и *in vivo*. Для изучения противоопухолевого действия веществ *in vivo* требуется создание модели, максимально приближенной по своим характеристикам к человеческому заболеванию. Такому требованию могут отвечать ксенографты человеческих опухолей на иммунодефицитных мышах.

Наиболее распространенными моделями для испытания новых веществ являются подкожные ксенографты культур опухолевых клеток. Несмотря

на ряд их неоспоримых преимуществ, выявляются и существенные недостатки, такие как отсутствие естественного микроокружения, влияющего на онкогенез, а также однородный состав культуры клеток, что не соответствует реальной клинической картине. В итоге результаты исследований веществ на подкожных ксенографтах культуры клеток рака человека будут в определенной степени искаженными и могут различаться с результатами клинических исследований [7].

Более адекватной считается пациентоподобная модель (Patient Derived Xenograft – PDX), получаемая в результате ксенотрансплантации фрагмента опухоли человека иммунодефицитным мышам. Доклинические исследования на подобных тест-системах проводятся перед началом клинических испытаний фармакологических субстанций. Помимо этого PDX используются для реализации концепции персонализированной медицины, когда терапевтические подходы подбираются с учетом индивидуальных особенностей конкретного пациента, основываясь на результатах предварительных испытаний на PDX-моделях [8].

Целью исследования явилось создание PDX-модели РП человека в шейном отделе пищевода иммунодефицитных мышей как наиболее проблемной зоне для лечения.

Материал и методы

Для создания PDX-модели рака пищевода человека было использовано 11 самцов иммунодефицитных мышей линии Balb/c Nude. Масса животных колебалась в пределах 19–22 г. Животные были получены из «SPF-вивария» ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск). Мыши содержались в SPF-виварии при температуре 22–24 °С и относительной влажности воздуха 60 % в искусственно вентилируемых клетках, по одному животному в клетке. Животных содержали в условиях свободного доступа к корму и воде, предварительно стерилизованных автоклавированием. Фрагмент опухоли был взят от пациента с диагнозом инфильтративно-язвенного рака (умереннодифференцированная плоскоклеточная карцинома без ороговения) в нижней трети пищевода с переходом на кардиальный отдел желудка.

Наркоз мышам делали при помощи ксилазина концентрацией 20 мг/мл и золетила концентрацией 22,57 мг/мл в дозе 1,13 мг на 20 г веса животного. Доступ к шейному отделу пищевода иммуноде-

Рис. 1. Повреждение адвентициального и мышечного слоев стенки пищевода

Fig. 1. Damage to adventitial and muscular layers of the esophageal wall

фицитной мыши Balb/c Nude обеспечивали путем рассечения кожи на шее от основания правой ушной раковины вплоть до основания левой ушной раковины. Пищевод вместе с надлежащей трахеей выделяли от окружающих тканей тупым способом. При помощи скальпеля надсекали адвентициальный и мышечный слой стенки пищевода (рис. 1). Фрагмент опухоли пищевода человека подшивали к стенке шейного отдела пищевода в районе произведенного ранее повреждения (рис. 2). Кожный дефект ушивали лигатурой из неабсорбируемого полипропилена толщиной 4–0. Наблюдение за животными проводили в течение 30 сут. Эвтаназию мышей осуществляли в CO_2 -камере, после чего выполняли некропсию и отбор опухолевого материала для морфологического исследования.

Результаты

Фрагменты опухоли пищевода человека имплантировали 11 самцам мышей линии Balb/c Nude. Спустя 8 дней с момента посадки опухолевого материала у 9 из 11 животных наблюдалась четкая припухлость на вентральной стороне шеи, которая при пальпации имела плотную консистенцию. Еще через 5 дней у трех мышей стали появляться изъязвления в области имплантации опухолевого материала, из которых на следующий день наблюдался выход некротических масс, после чего объем предполагаемых опухолей визуально резко уменьшился. В дальнейшем было продолжено наблюдение за этими животными. По прошествии 7 дней после выхода некротических масс был отмечен рост опухолевой ткани, имеющей плотную консистенцию. В результате некропсии всех животных у 6 мышей были выявлены опухолевые образования беловато-розового цвета с четкими границами и плотной структурой (рис. 3). При морфологическом анализе опухоль идентифицировали как умеренно-дифференцированную плоскоклеточную карциному пищевода без ороговения, характеризующуюся

Рис. 2. Подшивание фрагмента опухоли пищевода человека к стенке шейного отдела пищевода иммунодефицитной мыши Balb/c Nude

Fig. 2. Sewing of a fragment of human esophageal tumor to the cervical esophagus wall in an immunodeficient Balb/c Nude mouse

Рис. 3. Некропсия иммунодефицитной мыши Balb/c Nude с развитой опухолью пищевода

Fig. 3. Necropsy of an immunodeficient Balb/c Nude mouse with developed esophageal tumor

Рис. 4. Микрофото. Плоскоклеточная карцинома у иммунодефицитной мыши Balb/c Nude, $\times 40$

Fig. 4. Microphoto. Esophageal adenocarcinoma in an immunodeficient Balb/c Nude mouse, $\times 40$

наличием в отдельных клетках патологических митозов (рис. 4).

Обсуждение

Ортопические пациентоподобные модели, характеризующиеся гетерогенным клеточным составом и развивающиеся в естественном микроокружении, сохраняют гистологические, генетические и физиологические свойства донорской опухоли [8]. В результате эксперимента была получена PDX-модель рака пищевода человека на иммунодефицитных мышцах Balb/c Nude, которая по результатам морфологических исследований гистологически соответствует опухоли пациента, являясь плоскоклеточной карциномой.

В результате имплантации донорского фрагмента опухоли наблюдалось полное приживание материала у 6 из 11 животных, что составило 54,5 %. Это соответствует литературным данным, согласно которым процент успешной имплантации PDX иммунодефицитным мышам может варьировать от 10 до 50 % в зависимости от типа опухоли, сайта имплантации, особенностей пациента.

Пациентоподобные модели рака пищевода, как и другие тест-системы, имеют как преимущества, так и ряд недостатков. Первым необходимым условием для проведения исследований с использованием PDX является доступ исследовательских

лабораторий к донорским резецированным опухолям. Существенным недостатком является техническая сложность создания подобной модели, так как это требует наличия у исследователей навыков проведения наркотизации и микрохирургии лабораторных животных. Пациентоподобная модель имеет более низкую скорость роста по сравнению с подкожными ксенографтами опухолевых культур клеток и относительно низкие показатели приживления, что вносит существенные коррективы в планирование исследований [9]. Однако, несмотря на перечисленные недостатки, PDX-модели имеют существенные преимущества, благодаря которым они считаются перспективными в доклинических исследованиях новых фармакологических субстанций, изучении механизмов онкогенеза, тестировании используемых лекарственных средств для пациентов, проявляющих резистентность к общепринятым схемам терапии.

Заключение

В результате эксперимента были получены пациентоподобные модели плоскоклеточной карциномы человека на иммунодефицитных мышцах, сохранившие свои гистологические характеристики. При этом удалось добиться 54,5 % приживляемости опухолевого материала, что вполне согласуется с литературными данными.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Арутюнян К.В., Кузнецов И.М., Фёдоров К.С., Тер-Ованесов М.Д., Шостка К.Г., Роман Л.Д., Мушников Н.А. Оценка функциональной операбельности, как предпосылка для профилактики осложнений после операций по поводу рака пищевода. Профилактическая и клиническая медицина. 2017; 1(62): 42–48. [Arutyunyan K.V., Kuznetsov I.M., Fedorov K.S., Ter-Ovanesov M.D., Shostka K.G., Roman L.D., Mushnikov N.A. Assessment of functional operability as a key factor for the prevention of complications after esophageal cancer surgery. Preventive and clinical medicine. 2017; 1(62): 42–48. (in Russian)].
2. Скворцов М.Б. Рак пищевода: хирургическое лечение. Сибирский медицинский журнал. 2011; 4: 21–30. [Skvortsov M.B. Esophageal cancer: surgical treatment. Siberian Medical Journal. 2011; 4: 2130. (in Russian)].
3. Ильин И.А., Малькевич В.Т. Отдаленные результаты хирургического лечения рака пищевода при различных типах оперативных вмешательств. Онкологический журнал. 2016; 10(1(37)): 84–92. [Ilyin I.A., Malkevich V.T. Long-term results of esophageal cancer surgical treatment in different types of surgical procedures. Journal of Oncology. 2016; 10(1(37)): 84–92. (in Russian)].
4. Урсол Г.Н. Способы хирургического лечения рака пищевода. ScienceRise. 2015; 3(4(8)): 19–26. [Ursol G.N. Methods of surgical treatment of cancer of the esophagus. ScienceRise. 2015; 3(4(8)): 19–26. (in Russian)].
5. Гарин А.М., Базин И.С. Лекарственная терапия опухолей желудочно-кишечного тракта. Эффективная фармакотерапия. 2015; 2: 16–23. [Garin A.M., Bazin I.S. Drug therapy of gastrointestinal tumors. Effective Pharmacotherapy. 2015; 2: 16–23. (in Russian)].
6. Имянитов Е.Н., Моисеенко В.М. Применение молекулярно-генетического анализа для выбора противоопухолевой цитостатической терапии. Онкогематология. 2007; 3: 4–8. [Imyanitov E.N., Moiseyenko V.M. Molecular-based choice of cytotoxic therapy for cancer. Oncohematology. 2007; 3: 4–8. (in Russian)].
7. Kelland L.R. «Of mice and men»: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. Eur J Cancer. 2004 Apr; 40(6): 827–36. doi: 10.1016/j.ejca.2003.11.028.
8. Lee N.P., Chan C.M., Tung L.N., Wang H.K., Law S. Tumor xenograft animal models for esophageal squamous cell carcinoma. J Biomed Sci. 2018 Aug 29; 25(1): 66. doi: 10.1186/s12929-018-0468-7.
9. Кут О.И., Колесников Е.Н., Максимов А.Ю., Протасова Т.П., Гончарова А.С., Лукбанова Е.А. Методы создания ортопических моделей рака пищевода и их применение в доклинических исследованиях. Современные проблемы науки и образования. 2019; 2: 96. [Kit O.I., Kolesnikov E.N., Maksimov A.Yu., Protasova T.P., Goncharova A.S., Lukbanova E.A. Methods of creation and application of orthotopic models of esophageal cancer in preclinical studies. Modern problems of science and education. 2019; 2: 96. (in Russian)].

Поступила/Received 31.05.2019

Принята в печать/Accepted 16.07.2019

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кит Сергей Олегович, младший научный сотрудник, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ (г. Ростов-на-Дону, Россия). ORCID: 0000-0002-1566-8906.

Максимов Роман Алексеевич, младший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный медицинский исследовательский центр онкологии» (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 7394-9243. ORCID: 0000-0003-1278-2700.

Гончарова Анна Сергеевна, кандидат биологических наук, заведующая отделением «Испытательный лабораторный центр», ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 7512-2039. ORCID: 0000-0003-0676-0871.

Лукбанова Екатерина Алексеевна, научный сотрудник, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ (г. Ростов-на-Дону, Россия). E-mail: katya.samarskaja@yandex.ru. SPIN-код: 4078-4200. ORCID: 0000-0002-3036-6199.

Карнаухов Николай Сергеевич, кандидат медицинских наук, заведующий отделением, врач-патологоанатом, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 3100-0820. Author ID (Scopus): 57193122772. ORCID: 0000-0003-0889-2720.

Непомнящая Евгения Марковна, доктор медицинских наук, профессор, врач-патологоанатом, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 8930-9580. Author ID (Scopus): 6506793316.

Миндарь Мария Вадимовна, младший научный сотрудник, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 5148-0830.

Ткачев Сергей Юрьевич, младший научный сотрудник, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 9959-4082. ORCID: 0000-0002-8436-7250.

Колесников Евгений Николаевич, кандидат медицинских наук, заведующий отделением абдоминальной онкологии № 1, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 8434-6494. ORCID: 0000-0002-8436-7250.

ВКЛАД ВТОРОВ

Кит Сергей Олегович: экспериментальное проектирование.

Максимов Роман Алексеевич: создание пациентоподобной модели рака пищевода.

Гончарова Анна Сергеевна: коррекция рукописи.

Лукбанова Екатерина Алексеевна: написание рукописи, создание пациентоподобной модели рака пищевода.

Карнаухов Николай Сергеевич: фотофиксация и макроскопический анализ опухолевого материала.

Непомнящая Евгения Марковна: морфологический анализ опухолевого материала.

Миндарь Мария Вадимовна: фотофиксация процесса имплантации опухолевого материала, обработка фотографий в графическом редакторе.

Ткачев Сергей Юрьевич: подбор литературы по теме работы.

Колесников Евгений Николаевич: подбор пациента-донора, предоставление опухолевого материала.

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Sergey O. Kit, Junior Researcher, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). ORCID: 0000-0002-1566-8906.

Roman A. Maksimov, MD, Junior Researcher, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). ORCID: 0000-0003-1278-2700.

Anna S. Goncharova, PhD, Head of the Department of Testing Laboratory Center, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). ORCID: 0000-0003-0676-0871.

Ekaterina A. Lukbanova, Researcher, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). ORCID: 0000-0002-3036-6199.

Sergey N. Karnaukhov, MD, PhD, Head of Pathology Department, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). Author ID (Scopus): 57193122772. ORCID: 0000-0003-0889-2720.

Evgenia M. Nepomnyashchaya, MD, Professor, Pathology Department, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). Author ID (Scopus): 6506793316.

Maria V. Mindar, Junior Researcher, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia).

Sergey Yu. Tkachev, Junior Researcher, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). ORCID: 0000-0002-8436-7250.

Evgeny N. Kolesnikov, MD, PhD, Head of Abdominal Oncology Department № 1, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). ORCID: 0000-0002-8436-7250.

AUTHOR CONTRIBUTION

Sergey O. Kit: experimental design.

Roman A. Maksimov: creation of a patient-like model of esophageal cancer.

Anna S. Goncharova: manuscript correction.

Ekaterina A. Lukbanova: manuscript writing, creation of a patient-like model of esophageal cancer.

Sergey N. Karnaukhov: photofixation and macroscopic analysis of tumor sample.

Evgenia M. Nepomnyashchaya: morphological analysis of tumor sample.

Maria V. Mindar: photofixation of the process of implantation of tumor sample, photo processing in a graphical editor.

Sergey Yu. Tkachev: data collection.

Evgeny N. Kolesnikov: selection of a patient donor, tumor sampling.

Funding

This study required no funding.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.