

МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ ОРТОТОПИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ РАКА ПИЩЕВОДА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Кит О.И.¹, Колесников Е.Н.¹, Максимов А.Ю.¹, Протасова Т.П.¹, Гончарова А.С.¹, Лукбанова Е.А.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: protasovatp@yandex.ru

Частая встречаемость рака пищевода и связанная с этим высокая смертность больных определяют актуальность изучения механизмов возникновения и течения этого заболевания, а также разработки новых подходов к профилактике и лечению. Для проведения таких исследований необходима экспериментальная платформа, в создании которой разработка и использование опухолевых животных моделей являются весьма важной составляющей. В обзоре представлены сведения, полученные из отечественных и зарубежных научных источников последнего десятилетия, которые отражают целесообразность и преимущества использования ортотопических опухолевых моделей в экспериментальной онкологии. Проанализированы методы создания этих моделей и проведено сравнение их эффективности в зависимости от поставленных исследовательских целей, показаны трудности, связанные с данным процессом, а также возможные пути их преодоления. Приведена характеристика лабораторных животных-реципиентов, наиболее подходящих для успешной ксенотрансплантации получаемого от пациентов опухолевого материала. Представлено краткое описание доклинических исследований с применением ортотопических ксенографтов аденокарциномы и плоскоклеточного рака пищевода на примерах тестирования противоопухолевых потенций препаратов, вакцин, физических факторов, а также разработок по созданию и усовершенствованию методов биомедицинской визуализации.

Ключевые слова: рак пищевода, аденокарцинома, плоскоклеточный рак, ксенографт, ортотопические опухолевые модели, иммунодефицитные мыши, сайты трансплантации, доклинические исследования

METHODS OF CREATION AND APPLICATION OF ORTHOTOPIC MODELS OF ESOPHAGEAL CANCER IN PRECLINICAL STUDIES

Kit O.I.¹, Kolesnikov Ye.N.¹, Maksimov A.Yu.¹, Protasova T.P.¹, Goncharova A.S.¹, Lukbanova E.A.¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: protasovatp@yandex.ru

High incidence and mortality of esophageal cancer determine the importance of studies on the mechanisms of the disease occurrence and course, as well as the search for new approaches to its prevention and treatment. Such studies require an experimental basis, and the development and application of animal tumor models is its essential component. This article reviews Russian and international studies of the last decade reflecting the feasibility and advantages of orthotopic tumor models in experimental oncology. We analyze methods for the model creation, compare their effectiveness depending on the research objectives and show difficulties associated with it and possible ways of their overcoming. The review summarizes characteristics of recipient laboratory animals optimal for successful xenotransplantation of tumor material received from patients. The article gives a brief description of preclinical studies using orthotopic xenografts of adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma on examples of testing the antitumor potency of drugs, vaccines, physical factors, as well as developments in the creation and improvement of biomedical imaging methods.

Keywords: esophageal cancer, adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, xenograft, orthotopic tumor models, immunodeficient mice, transplantation sites, preclinical studies

Рак пищевода считается одним из наиболее неблагоприятных по течению и прогнозам злокачественных новообразований. Данный вид опухоли является причиной высокой смертности больных и находится на 6-м месте в мире по этому показателю, невзирая на постоянно совершенствующиеся методы лечения и тенденцию к снижению уровня

заболеваемости [1, 2].

Основными формами первичных новообразований пищевода являются плоскоклеточный рак (в России 89–92% из всех случаев) и аденокарцинома (7–10% соответственно). Однако в некоторых странах Западной Европы и США наблюдается возрастание доли аденокарциномы по сравнению с плоскоклеточным раком вплоть до преобладания заболеваемости первой из них [3].

В целом успехи в лечении рака пищевода признают незначительными, а прогноз – неблагоприятным [4]. В течение последних десятилетий наблюдается стойкая тенденция к ухудшению ситуации за счет снижения дифференцировки опухолей данной локализации и роста вовлеченности в злокачественный процесс регионарных лимфоузлов [5].

Вышесказанное определяет неоспоримую важность разработки новых и усовершенствования существующих методов профилактики и лечения злокачественных опухолей пищевода [6], а также изучения их патогенеза и биологии, в частности факторов, определяющих рост и прогрессию [7].

Для развития онкологии на современном этапе необходимо совершенствовать экспериментальную базу, и в решении этой задачи особая роль отводится доклиническим испытаниям на лабораторных животных [8, 9, 10]. В области исследований новых противоопухолевых препаратов перспективным является создание экспериментальных моделей – ксенографтов, которые представляют собой человеческий опухолевый материал, трансплантированный в организм животного. Такие модели более адекватно отражают особенности злокачественного процесса в донорском организме, что определяет целесообразность их использования в исследованиях на этапе доклинической разработки и тестирования новых фармакологических субстанций.

Целью работы стал обзор данных, связанных с созданием эктопических и ортотопических моделей наиболее часто встречающихся гистологических типов рака пищевода, а также пищевода Барретта – потенциального предшественника аденокарциномы, на лабораторных животных, особенностями моделирования метастазов и использованием получаемых объектов в доклинических исследованиях. Проанализированы отечественные и зарубежные литературные источники. Произведен поиск тематических статей в русскоязычных базах по следующим ключевым словам: рак пищевода, ортотопическая модель рака пищевода, ксеногенная опухолевая модель пищевода, ксенографт. В англоязычных базах проведен по запросам: xenograft, orthotopic tumor models, models of esophageal cancers, animal models of cancer.

Модели опухолей пищевода человека, полученные на животных

Основная цель разработки моделей ксенотрансплантатов опухолей заключается в том,

чтобы объединить фундаментальные и клинические исследования и дополнить данные, полученные при использовании систем *in vitro* [11]. Получаемые на животных модели создают платформу для изучения процесса опухолевого генеза в условиях *in vivo*, которая позволит лучше понять участие некоторых онкогенов или опухолевых супрессоров в развитии опухоли, раскрыть их сигнальные пути и механизмы онкологических заболеваний [12]. Также использование таких моделей может предоставить исследовательский инструмент для доклинического тестирования лекарственных средств: определения противоопухолевой эффективности препарата, его фармакокинетики и фармакодинамики [13]. Кроме того, ксеногенные опухоли, полученные на различных анатомических сайтах лабораторных животных, могут служить экспериментальной базой для проверки эффективности существующих и разработки новых методов обнаружения, а также мониторинга роста и дифференцировки злокачественных новообразований.

Наиболее часто используемыми животными для получения опухолевых моделей являются лабораторные мыши из-за нескольких ключевых преимуществ, таких как: наличие сопоставимого с людьми размера генома, короткий репродуктивный цикл и многочисленное потомство, низкие затраты на содержание, простота их обслуживания и т.д. [12]. В интересующем нас исследовательском направлении используются различные линии иммунодефицитных мышей, к которым относятся **атимичные** голые мыши *nude* (дефектны по Т-клеточному звену иммунитета), мыши SCID (имеют более тяжелую форму иммунодефицита) и мыши NOD/SCID (характеризуются сочетанием дефектов иммунной системы и нарушением обмена веществ) [8, 12, 13]. Среди этих линий мыши NOD/SCID демонстрируют более выраженный иммунодефицит, связанный с отсутствием или дефектом почти во всех типах иммунных клеток (В-, Т-, дендритные клетки, макрофаги и NK-клетки) [14].

На сегодняшний день в современной экспериментальной онкологии наиболее часто исследовательские работы проводят на эктопических ксеногенных опухолях, в то время как ортотопические ксенографты используют достаточно редко. Эктопические модели получают в результате трансплантации человеческого опухолевого материала в сайты, не соответствующие донорскому органу, из которого злокачественные клетки были взяты. Наиболее распространенным вариантом эктопической ксенотрансплантации является введение опухолевого материала под кожу реципиента, что связано с его очевидными преимуществами: технической простотой процедуры и наблюдения за ростом полученной опухоли.

Несмотря на это, подкожная опухолевая модель имеет существенные недостатки, поскольку далеко не полностью отражает клиническую ситуацию. Например, она не

обладает гетерогенностью донорской опухоли, так как в большинстве случаев в качестве исходного материала используются линейные злокачественные клетки. Кроме того, подкожные ксенографты, полученные из опухолевого материала эктопических сайтов, находятся в нетипичном для них микроокружении, что делает их непригодными для изучения опухоли-стромальных взаимодействий, а также практически не способными к инвазии и метастазированию. При таких сильных и слабых сторонах эти модели в основном пригодны для изучения ранних этапов злокачественного процесса, механизмов канцерогенеза и биологии опухоли [15].

К эктопическим вариантам ксенотрансплантации также можно отнести введение клеточной суспензии человеческой плоскоклеточной карциномы пищевода мышам Balb/c Nude внутривенно и в левый желудочек сердца (как вариант внутриартериального введения). В отличие от подкожного и даже ортотопического вариантов трансплантации опухолевого материала, в данном исследовании эти модели дали активное метастазирование в органы-мишени, характерные для этой формы рака [16].

Методы создания ортотопических моделей рака пищевода

Ортотопические ксенотрансплантаты представляют собой альтернативу эктопическим моделям, используемым для исследований рака пищевода. Их получают путем имплантации клеточной суспензии или фрагмента опухоли в пищевод животных-реципиентов.

В результате анализа литературных данных, посвященных методам создания ортотопических моделей основных форм злокачественных опухолей пищевода, были выявлены некоторые трудности и особенности, связанные с достижением поставленных задач.

Процедуры их создания технически сложны, поскольку для этого требуются хирургическое вмешательство и анестезия животных. Отмечают особую трудность выполнения манипуляций по ортотопической ксенотрансплантации опухолей пищевода, которая связана с особенностями расположения и малыми размерами этого органа [17]. Тем не менее достигнуты определенные успехи в создании ортотопических моделей рака пищевода, в том числе путем моделирования пищевода Барретта [7, 18].

В работе Melsens H. et al. описано пять вариантов хирургического эзофагеального доступа: средняя лапаротомия, средняя лапаротомия с трансжелудочным подходом, подреберная лапаротомия, трансоральный и шейный доступ [17]. Несмотря на относительно большое количество доступов к пищеводу и способов установки ортотопического ксенографта, наиболее часто применяются две основные методики, отличающиеся местом имплантации опухолевого материала: 1) в верхней части пищевода, тансорально [19]; 2) в нижней его части – вблизи гастроэзофагеального перехода, через желудок [16]. Оценка

выживаемости мышей с ортотопическими опухолями в верхней и нижней частях пищевода показала, что последние жили дольше [10]. Также Ip J.C.Y. et al. на мышах Balb/cAnN-nu была разработана модель, полученная путем инъекции суспензии клеточной культуры в стенку среднего отдела пищевода, вблизи диафрагмы. Авторы заявляют о ее преимуществе по сравнению с ранее разработанными ортотопическими моделями плоскоклеточного рака пищевода [20].

Инокуляции суспензией опухолевых клеток со средой, по мнению ряда авторов [8, 17], дают лучшие результаты, чем SOI (surgery orthotopic implantation) – хирургическая имплантация фрагментов опухолевого материала в стенку пищевода [16]. Показано также, что улучшает приживаемость трансплантатов применение различного рода подложек и гидрогелей, например Matrigel [17, 21]. Последний представляет собой сложную смесь белков, протеогликанов и факторов роста межклеточного матрикса, которая обеспечивает клетки питанием и стимулирует их рост.

Существенными недостатками ортотопической модели рака пищевода являются медленный рост ксенотрансплантата [8, 17, 21], а также необходимость применения специализированных методов визуализации *in vivo* для мониторинга роста опухоли [22, 23].

Хотя создание ортотопических моделей требует больше времени, материальных и трудовых затрат, они позволяют осуществлять исследование роста опухоли в адекватном гистологическом и молекулярном микроокружении, приближенном к клинической ситуации, и учитывать опухоле-стромальные взаимодействия [15]. Ксенотрансплантаты на основе полученного от пациентов опухолевого материала наиболее полно отражают иммуногистохимические и биохимические аспекты опухолевой болезни организма-донора по сравнению с подкожными ксенографтами, полученными в результате перевивки культуры клеток рака пищевода [21]. Несмотря на существующие трудности, связанные с созданием ортотопических ксенотрансплантатов, имеющиеся преимущества в виде способности к инвазии и метастазированию делают их ценной моделью для исследований поздних стадий опухолевого роста [24].

Основные характеристики и особенности методик по созданию подкожных и ортотопических ксеногенных моделей опухолей пищевода человека с использованием иммунодефицитных животных представлены в таблице.

Основные характеристики методов создания ксеногенных моделей опухоли пищевода человека с использованием иммунодефицитных

животных

№	Автор, год, ссылка	Вид и линия животных	Опухолевый материал	Сайт перевивки, способ введения	Среда для введения	Кол-во клеток
1	Nishikawa T. et al., 2013 [25]	мыши nude	клетки линии TE8	п/к – инъекция клеток; о/т – инъекция клеток в просвет пищевода	Matrigel	п/к 3×10^6 о/т 5×10^6
2	Kuroda S. et al., 2014 [22]	мыши Balb/c nu/nu	клетки линии TE8, TE8-Luc	п/к – инъекция клеток; о/т – инъекция клеток в стенку пищевода через желудок	Matrigel	п/к 2×10^6 о/т 2×10^6
3	Hu T. et al., 2015 [16]	мыши Balb/c nude	клетки линии EC1, EC1-GFP	п/к – инъекция клеток; в/в – инъекция клеток; в/кард – инъекция клеток; о/т – SOI – стенка нижней части пищевода	нет информации	п/к 5×10^6 , в/в. 2×10^6 в/кард. 2×10^6 о/т фрагмент опухоли 1 мм^3
4	Ip J.C.Y. et al., 2015 [20]	мыши Balb/cAnN-nu	клетки линии 81-T, SLMT-1, KYSE30, KYSE150	п/к – инъекция клеток; о/т – инъекция клеток в стенку средней части пищевода	культуральная среда без добавок	п/к 1×10^6 о/т 5×10^4 5×10^5
5	Chiu W-Ch. et al., 2016 [26]	мыши Balb/cAn.Cg-Foxn1 ^{nu} /CrINarl	клетки линии TE8, KYSE70	п/к – инъекция клеток; о/т – инъекция клеток в стенку нижней части пищевода	нет информации	п/к 5×10^6 ; о/т 1×10^6
6	Melsens E. et al., 2017 [17]	мыши Foxn1nu	клетки линии OE33, OACM5 1.C	п/к – инъекция клеток; о/т – инъекция клеток в стенку нижней части пищевода	Matrigel	п/к 1×10^6 5×10^6 ; о/т 1×10^6
7	Shi Y. et al., 2017 [9]	мыши nu/nu; крысы nude	клетки плоскоклеточного рака пищевода человека (линия не уточняется)	п/к – инъекция клеток (мыши); о/т – инъекция клеток в стенку шейного отдела пищевода (крысы)	Matrigel	п/к 5×10^6 1×10^7 о/т 5×10^6 1×10^7
9	Tung L.N. et al., 2018 [10]	мыши nude	клетки линии KYSE-150, KYSE-180, KYSE-270, KYSE-410, KYSE-450	о/т – крысы, в стенку шейного или абдоминального отдела пищевода	Matrigel	о/т 1×10^6

Примечания: п/к – подкожная имплантация; о/т – ортотопическая имплантация

Использование ортотопических моделей рака пищевода в доклинических исследованиях (ДКИ)

В результате анализа доступных литературных источников были получены сведения о различных направлениях доклинических испытаний новых противоопухолевых препаратов и воздействий на моделях животных с пациентоподобными опухолями пищевода.

Так, например, Nishikawa T. et al. продемонстрировали антипролиферативный эффект нового ингибитора mTOR – темсиролимуса на nude-мышьях. Успешность испытания выражалась в почти шестикратном торможении роста подкожных ксенографтов по сравнению с контролем и в достоверном увеличении продолжительности жизни животных-опухоленосителей с ортотопически перевитым плоскоклеточным раком пищевода [25].

Также было изучено фармакологическое действие β -нитростирола (производного CУТ-Rx20) на клетки рака пищевода в ДКИ, проведенном на мышьях Chiu W-C. et al. В данном исследовании удалось выявить цитотоксическое действие препарата, выражавшееся в стимуляции апоптоза злокачественных клеток. Доказано ингибирование миграции и инвазии раковых клеток линии KYSE70 *in vitro*, и, кроме того, было продемонстрировано значительное торможение опухолевого роста и снижение частоты метастазирования в легкие мышьях-опухоленосителей на ортотопической модели рака пищевода [26].

В опытах, проведенных на иммунодефицитных крысах с ортотопически перевитой плоскоклеточной карциномой, предварительно пассированной в подкожном сайте мышьях nude, показана возможность повышения эффективности химиотерапии за счет применения внутрипищеводной радиочастотной гипертермии [9].

Применение нового аналога куркумина SSC-5 привело к ингибированию роста и инвазии плоскоклеточного рака пищевода, ортотопически перевитого nude-мышьям [10].

Тестирование аденовирусной вакцины Ad.E7 было проведено на мышьях с ортотопической опухолью рака пищевода. Выявлено, что вакцинация способствовала снижению локального опухолевого роста и увеличению общей выживаемости животных-опухоленосителей [27].

Определение онкогенных потенциалов медицинских иммунобиологических препаратов также является одним из обязательных разделов доклинических исследований, в которых используют ксенографты опухолей пищевода [8].

Помимо вышеперечисленных направлений, модели ксенотрансплантатов опухолей пищевода применяются в разработках по созданию и усовершенствованию новых методов биомедицинской визуализации, призванных контролировать злокачественный рост и терапевтический эффект от применяемых противоопухолевых воздействий. Так, на мышьях моделях получены биолюминесцентные изображения ортотопических опухолей

пищевода, а также регионарных и отдаленных метастазов [20, 21, 22]. Параллельное использование методов флюоресценции и МРТ повышает точность дифференцировки жизнеспособных опухолевых клеток от рубцовой ткани и остатков препарата Matrigel после ксенотрансплантации аденокарциномы пищевода [28]. Эксперименты на животных показали, что использование контрастного агента в оптической когерентной томографии может повысить эффективность обнаружения опухолей даже на ранних стадиях злокачественного процесса [29]. В исследованиях плоскоклеточного рака пищевода были предприняты активные шаги к повышению разрешающей способности оптической когерентной томографии, чтобы получить возможность послойной визуализации стенки пищевода мыши [30]. Такие усилия дали положительный результат благодаря эффективному усилению контрастности изображения в экспериментальных исследованиях, связанных с применением наночастиц в качестве контрастного агента [31].

Заключение. В целом модели опухолевых ксенотрансплантатов являются универсальной экспериментальной платформой для исследований канцерогенеза, опухолевого роста и прогрессии, а также могут успешно применяться для доклинического тестирования препаратов и разработки методов биомедицинской визуализации.

Список литературы

1. Napier K.J., Scheerer M., Misra S., Napier K.J. Esophageal cancer: A Review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities. World J. Gastrointest. Oncol. 2014. no.6. P. 112-120.
2. Siegel R., Naishadham D., Jemal A. "Cancer statistics, 2013" CA: Cancer Journal for Clinicians. 2013. vol. 63. no. 1. P. 11-30
3. Онкология: национальное руководство / под ред. В.И. Чиссова, М.И. Давыдова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. С. 621-622.
4. Арутюнян К.В., Кузнецов И.М., Ильин К.С., Тер-Ованесов М.Д., Шостка К.Г., Роман Л.Д. Хирургия рака пищевода: прошлое, настоящее, будущее (научный обзор) // Профилактик. и клин. мед. 2018. № 1. С. 70-77.
5. Кит О.И., Франциянц Е.М., Колесников Е.Н., Черярина Н.Д., Козлова Л.С., Погорелова Ю.А., Розенко Л.Я. Факторы роста в ткани рака пищевода различного гистогенеза // Современные проблемы науки и образования. 2016. №2. [Электронный ресурс] URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=24160> (дата обращения: 28.12.2018).
6. Kit O.I., Shikhlyarova A.I., Maryanovskaya G.Y., Barsukova L.P., Kuzmenko T.S., Zhukova G.V., Korobeinikova E.P., Sheiko E.A., Protasova T. P. Theory of health: successful

- translation into the real life. *General biological prerequisites // Cardiometry*. 2015. no.7. P. 11-17.
7. Matsui D., Omstead A.N., Kosovec J.E., Komatsu Y., Lloyd E.J., Raphael H., Kelly R.J., Zaidi A.H., Jobe B.A.. High yield reproducible rat model recapitulating human Barrett's carcinogenesis. *World J. Gastroenterol.* 2017. no.23(33). P. 6077-6087. DOI: 10.3748/wjg.v23.i33.6077.
 8. Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши balb/c nude и моделирование различных вариантов опухолевого роста для доклинических исследований // *Российский биотерапевтический журнал*. 2017. № 3. С. 6-13.
 9. Shi Y., Zhang F., Bai Z., Wang J., Qiu L., Li Y., Meng Y., Valji K., Yang X. Orthotopic Esophageal Cancers: Intraesophageal Hyperthermia-enhanced Direct Chemotherapy in Rats. *Radiology*. 2017. no. 282(1). P. 103-112. DOI: 10.1148/radiol.2016152281.
 10. Tung L.N., Song S., Chan K.T., Choi M.Y., Lam H.Y. Preclinical Study of Novel Curcumin Analogue SSC-5 Using Orthotopic Tumor Xenograft Model for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res. Treat.* 2018. no.50(4). P. 1362-1377. DOI: 10.4143/crt.2017.353.
 11. Cekanova M., Rathore K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug Des. Devel. Ther.* 2014. no.8. P.1911–21.
 12. Khaled W.T., Liu P. Cancer mouse models: past, present and future. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2014. no.27. P. 54–60.
 13. Kelland L.R. Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur. J. Cancer.* 2004. no.40(6). P. 827–36.
 14. Cho S.Y., Kang W., Han J.Y., Min S., Lee A. An integrative approach to precision Cancer medicine using patient-derived xenografts. *Mol. Cells.* 2016. no.39(2). P. 77–86.
 15. Ruggeri B.A., Camp F., Miknyoczki S. Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochem. Pharmacol.* 2014. no.87(1). P. 150-61.
 16. Hu T., Qi H., Li P., Zhao G., Ma Y, Hao Q. Comparison of GFP-Expressing Imageable Mouse Models of Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma Established in Various Anatomical Sites. *Anticancer Res.* 2015. no.35(9). P. 4655-63.
 17. Melsens E., De Vlieghere E., Descamps B., Vanhove C., De Wever O., Ceelen W., Pattyn P. Improved xenograft efficiency of esophageal adenocarcinoma cell lines through in vivo selection. *Oncol. Rep.* 2017. no.38(1). P.71-81. DOI: 10.3892/or.2017.5640.
 18. Omstead A.N., Kosovec J.E., Matsui D., Martin S.A. Serial Endoscopic Evaluation of Esophageal Disease in a Cancer Model: A Paradigm Shift for Esophageal Adenocarcinoma (EAC) Drug and Development. *Journal Cancer Investigation*. 2018. Vol. 36. Issue 7. P. 363-370.
 19. Ohara T., Takaoka M., Sakurama K., Nagaishi K., Takeda H., Shirakawa Y. The

establishment of a new mouse model with orthotopic esophageal cancer showing the esophageal stricture. *Cancer Lett.* 2010. no.293(2). P. 207-12.

20. Ip J.C., Ko J.M., Yu V.Z., Chan K.W., Lam A.K., Law S., Hung Tong D.K., Lung M.L. A versatile orthotopic nude mouse model for study of esophageal squamous cell carcinoma. *Biomed. Res. Int.* 2015. no.2015. P. 910715. DOI: 10.1155/2015/910715.

21. Damhofer H., Ebbing E.A., Steins A., Welling L., Tol J.A., Krishnadath K.K., van Leusden T. Establishment of patient-derived xenograft models and cell lines for malignancies of the upper gastrointestinal tract. *Journal of Transl. Med.* 2015. no.13. P.115. DOI 10.1186/s12967-015-0469-1.

22. Kuroda S., Kubota T., Aoyama K., Kikuchi S., Tazawa H. Establishment of a Non-Invasive Semi-Quantitative Bioluminescent Imaging Method for Monitoring of an Orthotopic Esophageal Cancer Mouse Model. *PLoS ONE.* 2014. no.9(12). e114562. DOI:10.1371/journal.pone.0114562.

23. Song S., Chang D., Cui Y., Hu J., Gong M., Ma K. New orthotopic implantation model of human esophageal squamous cell carcinoma in athymic nude mice. *Thorac. Cancer.* 2014. no.5(5). P.417-24.

24. Lee N.P., Chan Ch.M, Tung L.N., Hector K., Wang H.K., Law S. Tumor xenograft animal models for esophageal squamous cell carcinoma. *J. of Biomed. Sci.* 2018. no.25. P. 66. DOI: 10.1186/s12929-018-0468-7.

25. Nishikawa T., Takaoka M., Ohara T., Tomono Ya., Hao H., Bao X., Fukazawa T. Antiproliferative effect of a novel mTOR inhibitor temsirolimus contributes to the prolonged survival of orthotopic esophageal cancer-bearing mice. *Cancer Biology & Therapy.* 2013. no.14:3. P. 230-236.

26. Chiu W-C., Lee Y-C., Su Y-H., Wang Y-Y., Tsai C-H., Hou Y-A., Wang C-H., Huang Y-F., Huang C-J., Chou S-H., Hsieh P-W., Yuan S-S.F.. The Synthetic β -Nitrostyrene Derivative CYT-Rx20 Inhibits Esophageal Tumor Growth and Metastasis via PI3K/AKT and STAT3 Pathways. *PLoS ONE.* 2016. no.11(11).e0166453. DOI:10.1371/journal.pone.0166453.

27. Quatromoni J.G., Predina J.D., Bhojnagarwala P., MS1, Judy R.P., Jiang J. Adenoviral Based Immunotherapy Provides Local Disease Control in an Orthotopic Murine Model of Esophageal Cancer. *J. Immunother.* 2014. no.37(5). P. 283-292. DOI:10.1097/CJI.0000000000000038.

28. Gros S.J., Dohrmann T., Peldschus K., Schurr P.G., Kaifi J.T., Kalinina T., Reichelt U., Mann O., Strate T.G. Complementary use of fluorescence and magnetic resonance imaging of metastatic esophageal cancer in a novel orthotopic mouse model. *Int. J. Cancer.* 2010. no.126. P.2671-2681.

29. Kim C.S., Wilder-Smith P., Ahn Y.C., Liaw L.H., Chen Z., Kwon Y.J. Enhanced detection of early-stage oral cancer in vivo by optical coherence tomography using multimodal delivery of gold

nanoparticles. *J. Biomed. Opt.* 2009. no.14(3). P. 034008.

30. Xu J., Yu L., Wei X., Wang X., Chui P.C., Chan K.T., Chui P.C. Simultaneous dual-band optical coherence tomography for endoscopic applications. *J. Biomed. Opt.* 2014. no.19(12). P. 126007.

31. Au K.M., Lu Z., Matcher S.J., Armes S.P. Polypyrrole nanoparticles: a potential optical coherence tomography contrast agent for cancer imaging. *Adv. Mater.* 2011. no.23(48). P. 5792-5.