

## МОДЕЛИРОВАНИЕ РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ ПУТЕМ ОРТОТОПИЧЕСКОЙ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ

Гончарова А.С.<sup>1</sup>, Егоров Г.Ю.<sup>1</sup>, Кит С.О.<sup>1</sup>, Максимов А.Ю.<sup>1</sup>, Енгибарян М.А.<sup>1</sup>, Николаева Н.В.<sup>1</sup>, Волкова А.В.<sup>1</sup>, Непомнящая Е.М.<sup>1</sup>, Заикина Е.В.<sup>1</sup>, Ходакова Д.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБГУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии», Ростов-на-Дону, e-mail: onko-sekretar@mail.ru

Несмотря на очевидный прогресс в понимании биологии возникновения и прогрессирования злокачественных опухолей толстой кишки и улучшение стратегий лечения, разработка новых терапевтических алгоритмов по-прежнему является необходимым условием для улучшения показателей выживаемости при этом заболевании. Существует важная потребность в клинически значимых моделях рака толстой кишки человека. Модели, полученные путем имплантации образцов, взятых от пациента (PDX – patient derived xenograft) в ходе хирургического этапа лечения, мышам с ослабленным иммунитетом, способны с большой точностью воспроизвести биологические характеристики человеческой опухоли и являются важным инструментом для разработки новых терапевтических мишеней. Имплантация опухолевого материала в гистологически соответствующий орган позволяет получить ортотопическую модель, что делает возможным изучение локальной опухолевой инвазии. С целью создания ортотопической PDX-модели рака толстой кишки человека фрагменты опухоли от 5 пациентов с раком толстой кишки были имплантированы мышам линии Balb/c Nude методом SOI (surgical orthotopic implantation). В результате была создана PDX-модель – 1-я, 2-я и 3-я генерация ксенографтов. Гистотип опухоли подтверждали при помощи гистологического исследования. Полученная модель демонстрировала локальный рост, устойчивые характеристики приживления, а также воспроизводила гистологию донорской опухоли, что указывает на возможность ее применения для in vivo тестирования фармакологических субстанций, обладающих потенциальным противоопухолевым эффектом в отношении рака толстой кишки человека.

Ключевые слова: PDX-модель, ксенографт, ортотопические модели, трансплантация, рак толстой кишки.

## COLON CANCER MODELING BY ORTHOTOPIC XENOTRANSPLANTATION

Goncharova A.S.<sup>1</sup>, Egorov G.Y.<sup>1</sup>, Kit S.O.<sup>1</sup>, Maksimov A.Y.<sup>1</sup>, Engibaryan M.A.<sup>1</sup>, Nikolaeva N.V.<sup>1</sup>, Volkova A.V.<sup>1</sup>, Nepomnyashchaya E.M.<sup>1</sup>, Zaikina E.V.<sup>1</sup>, Khodakova D.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: onko-sekretar@mail.ru

Despite the obvious progress in understanding the biology of colon cancer onset and progression and improving treatment strategies, the development of new therapeutic algorithms is still required for improving the survival rates. Clinically significant models of human colon cancer are of great importance. Models generated by implanting patient-derived xenografts (PDX) obtained during surgical treatment to immunocompromised mice can accurately reproduce biological characteristics of a human tumor and are an important tool for the development of new therapeutic targets. Implantation of tumor tissues into a histologically appropriate organ creates an orthotopic model allowing studying local tumor invasion. An orthotopic PDX model of human colon cancer was generated by implanting tumor tissues from five patients with colon cancer to Balb/c Nude mice using surgical orthotopic implantation. As a result, a PDX model was created – first, second and third generation xenografts. Tumor histotype was confirmed by histological examination. The model demonstrated local growth, stable engraftment characteristics, and also reproduced the histology of the donor tumor, indicating its possible application for in vivo testing of pharmacological substances with a potential antitumor effect against human colon cancer.

Keywords: PDX model, xenograft, orthotopic models, transplantation, colon cancer.

Несмотря на очевидный прогресс в понимании биологии возникновения и прогрессирования злокачественных опухолей толстой кишки, а также значительное улучшение стратегий лечения, разработка новых терапевтических алгоритмов по-прежнему

является необходимым условием для улучшения показателей выживаемости при этом заболевании [1, 2].

Традиционно доклиническую оценку противоопухолевой эффективности фармакологических субстанций выполняют с использованием хорошо зарекомендовавших себя клеточных линий, ксенотрансплантированных мышам с ослабленным иммунитетом (например, мышам Nude, SCID, NOG) [3]. Ксенографты клеточных линий (CDX – cell-line derived xenograft) фенотипически и генетически достаточно однородны и не воспроизводят гетерогенность реальных опухолей; кроме того, раковые клетки вследствие отбора в условиях *in vitro* обычно имеют тенденцию к слабовыраженной дифференцировке и более агрессивные характеристики по сравнению с человеческими злокачественными новообразованиями. Хотя однородность клеточной культуры может быть весьма полезным фактором для решения ряда проблем фундаментальной науки, например для изучения сигнальных путей, CDX имеют ограниченный трансляционный потенциал [4]. Обнадёживающие результаты доклинических исследований противоопухолевой активности новых фармакологических субстанций, протестированных на ксенографтах культурального происхождения, в подавляющем большинстве случаев не воспроизводятся в ходе клинических испытаний, и вероятность того, что лекарственное средство будет одобрено и зарегистрировано среди онкологических препаратов, ниже, чем в других медицинских областях [5].

Потребность в более эффективных инструментах для проведения трансляционных исследований в области онкологии привела к разработке ксенографтов, полученных путем имплантации опухолевых образцов, взятых от пациента (PDX – patient derived xenograft) в ходе биопсии или хирургического этапа лечения, мышам с ослабленным иммунитетом. Этот подход позволяет учитывать исходные параметры злокачественных новообразований, генетическую и молекулярную гетерогенность, что является ключевыми чертами человеческих опухолей. Уникальный характер таких моделей позволяет с большой точностью воспроизвести морфологический и биологический спектр заболевания [6, 7].

Наиболее часто используемой процедурой для создания PDX является подкожная (гетеротопическая) имплантация опухолевого материала. Преимущества этого метода очевидны: не требуется наличие навыков экспериментальной хирургии у персонала, возможна оценка роста ксенографта без использования специальных приборов для визуализации. Однако подкожные ксенографты имеют и ряд недостатков, такие как низкая метастатическая способность, а также отсутствие взаимодействия опухоли с соответствующей микросредой, что, как известно, является важным элементом, влияющим на степень подвижности и инвазивности злокачественных клеток [4].

Ор토평ическис модели, полученнис путем имплантациис опухолевого материала в гистологическис соответствующий орган, делают возможным изучение локальной опухолевой инвазии, а также метастатического распространения, тем самым исключаются недостатки подкожных ксенографтов.

#### Цель исследования

Целью работы явилось создание ортотопической PDX-модели рака толстой кишки путем имплантациис опухолевых образцов, взятых от пациента, иммунодефицитным мышам линии Balb/c Nude.

#### **Материал и методы исследования**

##### *Лабораторные животные и их содержание*

Работу выполняли на 21 самке иммунодефицитных мышей линии Balb/c Nude, полученной из «SPF-вивария» Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск). Мыши содержались в SPF-блоке вивария федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» в индивидуально вентилируемых клетках в помещении с контролируемыми параметрами микроклимата (температура 18–26°C, влажность воздуха 30–60%, световой режим «день – ночь» по 12 ч). Все манипуляции выполняли, соблюдая «Правила проведения работ с использованием лабораторных животных».

##### *Опухолевый материал*

Для создания ортотопических PDX-моделей рака толстой кишки использовали образцы опухолей больных раком слепой кишки, полученные в результате хирургических резекций. От всех пациентов было взято письменное согласие на передачу биологического материала. Пациенты обратились в отделение абдоминальной онкологии № 1 «НМИЦ онкологии» в период с февраля 2020 г. по апрель 2020 г.

##### *Создание ортотопической PDX-модели рака толстой кишки*

Для создания 1-й генерации ортотопической PDX-модели рака толстой кишки применяли хирургический метод ортотопической имплантациис – SOI (surgical orthotopic implantation). В ходе SOI выполняли имплантациис фрагмента опухоли пациента размером 2×2×2 мм в слепую кишку мышей линии Balb/c Nude. Последующие генерации ортотопической PDX-модели рака толстой кишки (2-ю и 3-ю генерации ксенографтов) получили путем последовательной серийной ортотопической трансплантациис опухолевого материала методом SOI. Оценку приживления и роста ксенографта осуществляли, выполняя контрольную лапаротомию через 20, 50 и 70 дней после имплантациис. Хирургические манипуляции выполняли с применением инъекционной анестезии для лабораторных

животных, используя ветеринарные препараты «Ксила» и «Золелил-100» в дозах 20 мг/кг и 50 мг/кг соответственно. Эвтаназию производили методом дислокации шейных позвонков.

#### *Анализ роста опухолевых ксенографтов*

Измерения опухолевых узлов проводили в ходе лапаротомии при помощи штангенциркуля, их размеры рассчитывали по формуле Шрека для эллипсоида –  $V=a \times b \times c \times \pi/6$ , где  $V$  – объем опухоли (мм<sup>3</sup>), а, в, с – максимальные диаметры эллипсоида в трех плоскостях (мм).

#### *Гистологическое исследование*

Опухолевые фрагменты фиксировали в 10%-ном формалине в течение 24 ч, затем заключали в парафин. После этого готовили гистологические срезы толщиной 2 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Проводили гистологическое исследование донорской и ксеногенных опухолей.

#### *Статистический анализ*

Полученные экспериментальные данные были обработаны статистически с помощью пакета программ STATISTICA 8.0. Данные об объемах ксенографтов представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Сравнение динамики роста между группами не выполнялось в связи с маленьким объемом выборки ( $n=3$ ).

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

В ходе работ по созданию ортотопической PDX-модели рака толстой кишки, максимально точно воспроизводящей особенности человеческого заболевания, была выполнена серия экспериментов, предполагающих процедуру ортотопической имплантации опухолевого материала в слепую кишку иммунодефицитным мышам линии Balb/c Nude.

Для создания 1-й генерации ксенографтов было выполнено 5 процедур. В рамках одной процедуры опухолевый материал, взятый от 1 пациента, имплантировали группе, состоящей из 3 животных. Общие характеристики пациентов и оценка результатов соответствующей процедуры ксенотрансплантации представлены в таблице 1.

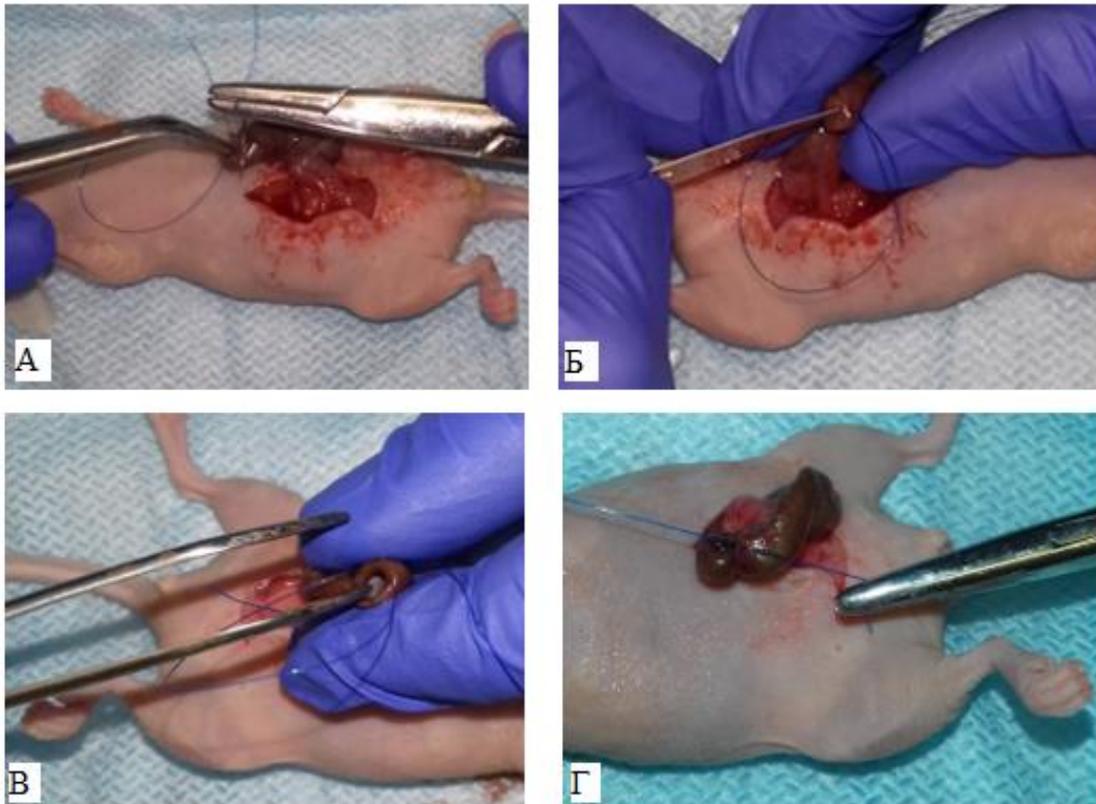
Таблица 1

Характеристики пациентов – доноров опухолевого материала и оценка результатов ксенотрансплантации иммунодефицитным мышам линии Balb/c Nude

Общие характеристики ортотопической ксенотрансплантации опухолевого материала от пациентов иммунодефицитным мышам							
Характеристики пациентов – доноров опухолевого материала						Оценка результатов имплантации (1-я генерация)	
Порядковый номер процедуры	Пол пациента	Способ получения образца	Стадия TNM	Гистология	Предшествующее специализированное лечение	Результаты имплантации общ. кол-во/кол-во приживления	Объем ксенографтов через 50 дней после имплантации (мм <sup>3</sup> сутки, среднее значение)
1	Ж	Удаление опухоли	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Высокодифференцированная аденокарцинома	–	3/0	–
2	Ж	Удаление опухоли	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	Умеренно дифференцированная аденокарцинома	–	3/2	65
3	Ж	Удаление опухоли	T <sub>4</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	Умеренно дифференцированная аденокарцинома	–	3/3	104
4	Ж	Удаление опухоли	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	Умеренно дифференцированная аденокарцинома	–	3/0	–
5	Ж	Удаление опухоли	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	Высокодифференцированная аденокарцинома	–	3/0	–

Для достижения положительного результата ксенотрансплантации крайне важно избегать участков некроза и ориентироваться на зоны роста опухоли при выборе фрагмента донорского биоматериала. В связи с этим было принято решение не использовать биопсийные образцы. Все образцы, используемые для создания PDX, были выделены из макропрепаратов удаленных опухолей, полученных в результате выполнения хирургического этапа лечения. Опухолевый материал тщательно промывали питательной средой RPMI1640 с содержанием гентамицина 10%, удаляли некротические ткани, затем делили на фрагменты размером около

2×2×2 мм для имплантации в купол слепой кишки животных-реципиентов разработанным нами способом (рис. 1) [8].



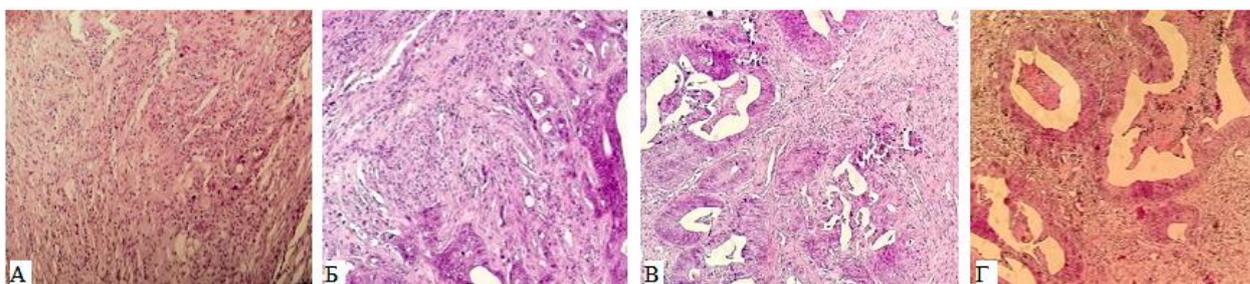
*Рис. 1. Создание ортотопической PDX-модели имплантацией фрагмента опухоли толстой кишки человека в слепую кишку иммунодефицитных мышей. А – наложение кисетного серозно-мышечного шва в концевой части слепой кишки мыши; Б – рассечение серозно-мышечного слоя в концевой части слепой кишки; В – инвагинация концевой части слепой кишки и имплантация фрагмента опухоли толстой кишки человека в образовавшийся «карман»; Г – фиксация фрагмента опухоли путем затягивания кисетного шва на слепой кишке мыши*

Две из пяти выполненных процедур привели к положительному результату в виде формирования ортотопических ксенографтов (рис. 2).



*Рис. 2. Мышь линии Balb/c Nude с ортотопическим ксенографтом рака толстой кишки человека*

Биоматериал пациента (фрагмент донорской опухоли) и ортотопические ксенографты последовательных трех генераций были охарактеризованы как умеренно дифференцированные аденокарциномы с очагами десмопластической реакции (рис. 3). Степень дифференцировки оставалась стабильной и не менялась от предыдущей генерации ксенографта к последующим. Эти наблюдения подтверждают наличие выраженного сходства между донорской и ксенотрансплантированными опухолями ранних генераций (1-я, 2-я и 3-я генерация).

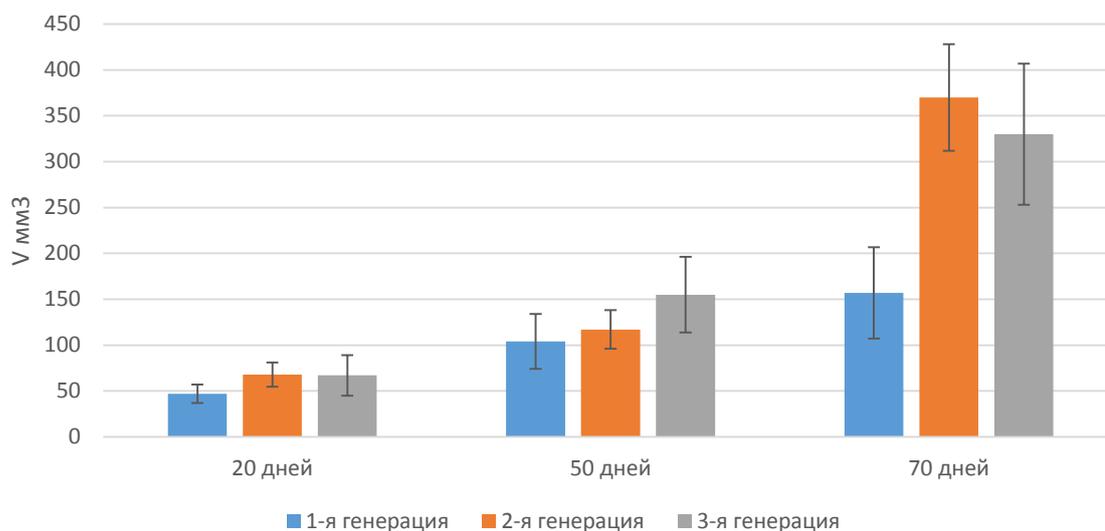


*Рис. 3. Гистологические препараты рака толстой кишки. А – опухоль пациента (донорская опухоль). Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 200$ ; Б – ксеногенная опухоль, 1-я генерация; В – ксеногенная опухоль, 2-я генерация; Г – ксеногенная опухоль, 3-я генерация*

Контрольная лапаротомия, выполненная через 20, 50 и 70 дней, показала отсутствие положительного результата процедур имплантации № 1, № 4 и № 5; в результате процедуры № 2 наблюдался рост ксенографтов у двух из трех животных в группе, однако динамика увеличения объемов опухолевых узлов была незначительной (менее  $100 \text{ мм}^3$  через 70 дней после имплантации), в связи с этим животные были подвергнуты эвтаназии, а опухолевый материал был выделен и заморожен для дальнейшего изучения.

При лапаротомии, выполненной через 20 дней, в результате процедуры имплантации № 3 у всех мышей в группе наблюдался рост первичной опухоли, средний размер ксенографтов составил  $47,6 \text{ мм}^3$ . Средние объемы ксенографтов через 50 и 70 дней после имплантации составили  $104,1 \text{ мм}^3$  и  $157,0 \text{ мм}^3$  соответственно.

2-я и 3-я генерации PDX, полученные путем последовательной серийной ортотопической трансплантации опухолевого материала, характеризовались более высокими темпами роста. Средние объемы ксенографтов 2-й генерации составили  $67,9 \text{ мм}^3$ ,  $117,1 \text{ мм}^3$  и  $370,0 \text{ мм}^3$  через 20, 50 и 70 дней после имплантации соответственно; средние объемы ксенографтов 3-й генерации составили  $67,2 \text{ мм}^3$ ,  $155,4 \text{ мм}^3$  и  $330,0 \text{ мм}^3$  через 20, 50 и 70 дней после имплантации соответственно.



*Рис. 4. Средние объемы ортотопических ксенографтов рака толстой кишки человека трех последовательных генераций через 20, 50 и 70 дней после имплантации опухолевого фрагмента иммунодефицитным мышам линии Balb/c Nude (процедура имплантации № 3)*

Данные представлены в виде среднего значения, в качестве планки погрешности указана стандартная ошибка среднего.

Представленные результаты позволяют говорить о том, что стратегия последовательной ортотопической имплантации фрагментов опухолевого материала (создание 2-й и 3-й генераций PDX) позволяет добиться устойчивых трансплантационных и динамических характеристик, а отсутствие дезагрегации клеток для введения в соответствующий орган мыши, как это описано в ряде работ [9, 10, 11], способствует сохранению исходной структуры опухолевой ткани человека, что может иметь большое значение для определения биологического поведения опухоли.

### **Заключение**

Для создания ортотопической PDX-модели образцы рака толстой кишки человека, полученные хирургическим путем у пациентов, были имплантированы ортотопически в слепую кишку мышей линии Balb/c Nude, при этом наблюдался обширный ортотопический рост у 3 из 15 животных при создании 1-й генерации ксенографтов рака толстой кишки человека. Полученная модель демонстрировала локальный рост, устойчивые характеристики приживления, а также воспроизводила гистологию донорской опухоли, что указывает на возможность ее применения для *in vivo* тестирования фармакологических субстанций, обладающих потенциальным противоопухолевым эффектом в отношении рака толстой кишки человека.

## Список литературы

1. Bürtin F., Mullins C.S., Linnebacher M. Mouse models of colorectal cancer: Past, present and future perspectives. *World Journal of Gastroenterology*. 2020. vol. 26. no. 13. P. 1394-1426.
2. Кит О., Гончарова А., Лукбанова Е. Методы создания ортотопических моделей рака толстой кишки человека на иммунодефицитных животных // *Вопросы онкологии*. 2019. №. 2. С. 303-307.
3. Ireson C.R., Alavijeh M.S., Palmer A.M., Fowler E.R., Jones H.J. The role of mouse tumour models in the discovery and development of anticancer drugs. *British journal of cancer*. 2019. vol. 121. no. 2. P. 101-108.
4. Oliveira R.C. et al. The role of mouse models in colorectal cancer research — The need and the importance of the orthotopic models. *Animal Models and Experimental Medicine*. 2020. vol. 3. no. 1. P.1-8.
5. Gould S.E., Junttila M.R., de Sauvage F.J. Translational value of mouse models in oncology drug development. *Nature medicine*. 2015. vol. 21. no. 5. P 431-439.
6. Katsiampoura A., Raghav K., Jiang Z.-Q., Menter D.G., Varkaris A., Morelli M.P., Manuel S., Wu J., Sorokin A.V., Rizi B.S., Bristow C., Tian F., Airhart S., Cheng M., Broom B.M., Morris J., Overman M.J., Powis G., Kopetz S. Modeling of patient-derived xenografts in colorectal cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2017. vol. 16. no. 7. P.1435-1442.
7. Jung J., Seol H.S., Chang S. The generation and application of patient-derived xenograft model for cancer research. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association*. 2018. vol. 50. no. 1. P. 1-10.
8. Кит О.И., Егоров Г.Ю., Максимов А.Ю., Гончарова А.С., Лукбанова Е.А., Ходакова Д.В., Миндарь М.В., Протасова Т.П., Заикина Е.В., Ткачев С.Ю., Волкова А.В. Способ трансплантации фрагмента опухоли толстой кишки человека в слепую кишку иммунодефицитных мышей // Патент РФ 2727868. Патентообладатель: ФГБУ «НМИЦ онкологии». 2020. Бюл. № 21.
9. Priolli D.G., Abrantes A.M, Batista J.N., Cardinalli I.A., Botelho M.F. A novel model of distal colon cancer in athymic mice. *Acta cirúrgica brasileira*. 2012. vol. 27. no. 6. P. 355-360.
10. Liao H.W., Hung M.C. Intracaecal orthotopic colorectal cancer xenograft mouse model. *Bio-protocol*. 2017. vol. 7. no. 11. P. e2311-e2326.
11. Cho H., Seo Y., Loke K., Kim S.-W., Oh S.-M., Kim J.-S., Kim H.-S., Lee H., Min J.-J., Jung Da-W., Williams D. Cancer-stimulated CAFs enhance monocyte differentiation and protumoral TAM activation via IL6 and GM-CSF secretion. *Clinical Cancer Research*. 2018. vol. 24. no. 21. P. 5407-5421.