

## ОЦЕНКА ПРИЖИВЛЕНИЯ И ДИНАМИКИ РОСТА PDX РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ САЙТА ИМПЛАНТАЦИИ

Заикина Е.В.<sup>1</sup>, Гончарова А.С.<sup>1</sup>, Лукбанова Е.А.<sup>1</sup>, Егоров Г.Ю.<sup>1</sup>, Димитриади С.Н.<sup>1</sup>, Волкова А.В.<sup>1</sup>, Позднякова В.В.<sup>1</sup>, Киблицкая А.А.<sup>1</sup>, Касьяненко В.Н.<sup>1</sup>, Ходакова Д.В.<sup>1</sup>, Миндарь М.В.<sup>1</sup>, Курбанова Л.З.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: katherine\_bio@mail.ru

Рак толстой кишки является одной из наиболее распространенных форм онкопатологий. Неблагоприятный прогноз связан с тем, что в большинстве впервые диагностированных случаев наблюдается распространенная форма заболевания. Актуальным направлением экспериментальной онкологии представляются разработка новых терапевтических стратегий и оценка противоопухолевых эффектов перспективных лекарственных препаратов. Неотъемлемым инструментом при проведении доклинических испытаний служат PDX-модели рака человека. Целями настоящего исследования явились создание гетеротопической и ортотопической PDX-моделей рака толстой кишки человека, а также оценка приживления и динамики роста в зависимости от сайта имплантации. Убедительно продемонстрирована 75%-ная приживляемость опухолевого материала. Процедура ксенотрансплантации свежерезецированного опухолевого материала от одного из доноров не привела к формированию опухолевых узлов. Рост PDX-моделей характеризовался наличием непродолжительного латентного периода (30–60 дней), сменяющегося экспоненциальной фазой роста. Результаты процедуры лапаротомии убедительно продемонстрировали наличие экзофитного роста и метастатического поражения. Значимых различий показателей приживляемости ксенографтов, имплантируемых в гетеротопический и ортотопический сайты, не наблюдалось. В результате работы не было установлено взаимосвязи показателей приживления и скорости роста от используемых сайтов имплантации. Полученные результаты могут быть связаны с гетерогенностью опухолевых фрагментов и различным количеством опухолевых стволовых клеток, трансплантируемых в организм модельных животных.

Ключевые слова: рак толстого кишечника, PDX-модель, ксенотрансплантат, иммунодефицитные мыши, Balb/c nude.

## ASSESSMENT OF ADHESION AND PDX GROWTH DYNAMICS OF HUMAN COLON CANCER DEPENDING ON THE IMPLANTATION SITE

Zaikina E.V.<sup>1</sup>, Goncharova A.S.<sup>1</sup>, Lukbanova E.A.<sup>1</sup>, Egorov G.Yu.<sup>1</sup>, Dimitriadi S.N.<sup>1</sup>, Volkova A.V.<sup>1</sup>, Pozdnyakova V.V.<sup>1</sup>, Kiblickaya A.A.<sup>1</sup>, Kasyanenko V.N.<sup>1</sup>, Khodakova D.V.<sup>1</sup>, Mindar M.V.<sup>1</sup>, Kurbanova L.Z.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Centre for Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don, e-mail: katherine\_bio@mail.ru

Colon cancer is one of the most common forms of cancer pathology. An unfavorable prognosis is associated with the fact that in most newly diagnosed cases, a common form of the disease is observed. The development of new therapeutic strategies and the evaluation of the antitumor effects of promising drugs seem to be an urgent area of experimental oncology. PDX models of human cancer are an essential tool for conducting preclinical trials. The aim of this study was to create heterotopic and orthotopic PDX models of human colon cancer, as well as to assess the engraftment and growth dynamics depending on the implantation site. The 75% survival rate of the tumor material was convincingly demonstrated. The procedure of xenotransplantation of freshly injected tumor material from one of the donors did not lead to the formation of tumor nodes. The growth of PDX models was characterized by a short latent period (30–60 days), followed by an exponential growth phase. The results of the laparotomy procedure convincingly demonstrated the presence of exophytic growth and metastatic lesion. There were no significant differences in the survival rates of xenografts implanted in the heterotopic and orthotopic sites. As a result of the work, the relationship between the rates of engraftment and the growth rate from the implantation sites used was not established. The results obtained may be related to the heterogeneity of tumor fragments and the different number of tumor stem cells transplanted into the body of model animals.

Keywords: colon cancer, PDX model, xenograft, immunodeficiency mice, Balb/c nude.

Рак толстой кишки (РТК) является одной из наиболее распространенных форм онкопатологий с продолжающимся ростом заболеваемости и смертности. РТК служит четвертой причиной гибели от злокачественных новообразований (ЗНО) во всем мире и второй – в европейской популяции [1]. Данная онкопатология поражает около 10% мужчин и 9% женщин. Низкие показатели общей 5-летней выживаемости ассоциированы с тем, что у 15% пациентов с впервые диагностированным РТК наблюдается стадия Т4, а от 60% до 89% случаев сопровождаются осложнениями в виде острой кишечной непроходимости и перфораций кишечной стенки [2].

На ранних стадиях тактика лечения предполагает выполнение хирургической резекции, после которой определяется необходимость применения последующей адъювантной терапии, что дает хорошие результаты безрецидивной и общей выживаемости [3]. Тем не менее, метастатические формы заболевания характеризуются неблагоприятным прогнозом для пациентов и в 90% случаев являются причиной смерти. Вариативность ответов на терапию связана с различными молекулярными особенностями опухолей рака толстой кишки. В связи с этим актуальным представляется создание доклинических моделей, точно отражающих клинические проявления данного заболевания, с целью успешной разработки и продвижения в клиническую практику новых эффективных препаратов [4].

Ключевым инструментом в разработке новых фармакологических субстанций и проведении доклинических исследований (ДКИ) являются мышинные модели рака, позволяющие проводить оценку противоопухолевой эффективности *in vivo* [5].

Традиционные доклинические модели, созданные на основе клеточных линий рака человека, играют важную роль в формировании понимания механизмов действия новых терапевтических средств. Однако опухолевые клетки в процессе адаптации к росту на плоскости претерпевают изменения некоторых исходных биологических свойств, что можно описать как отсутствие морфологической и молекулярно-генетической гетерогенности [6].

Чтобы преодолеть эти ограничения и улучшить понимание биологии опухоли и механизмов лекарственного ответа, были разработаны ксенотрансплантаты, полученные путем прямой имплантации образцов опухоли пациентов иммунодефицитным мышам, – PDX (Patient-Derived Xenograft), ставшие превосходной альтернативой классическим доклиническим моделям. Образцы тканей пациентов могут быть имплантированы как гетеротопически (подкожно), так и ортотопически в гистологически соответствующий орган [7].

В 2013 г. R.L. Johnson и J.C. Fleet в работе «Animal Models of Colorectal Cancer» описали ключевые аспекты поддержания трансляционного потенциала мышинной модели рака толстой кишки, включающие ограниченность злокачественного процесса органом-мишенью, что

позволяет исключать развитие сопутствующих заболеваний, сохранение гистологических и молекулярно-биологических особенностей, наблюдаемых у пациентов, а также способность отражать сложные межклеточные взаимодействия [8]. Хотя гетеротопические модели не полностью соответствуют описанным признакам в связи с отсутствием характерного опухолевого микроокружения (неоангиогенез, нарушение в регуляции клеточного цикла, отсутствие инвазивного роста, связанного с экспрессией матриксных металлопротеиназ, и секреция промоторов воспаления), они широко используются при проведении ДКИ благодаря относительной простоте процедуры создания и последующего мониторинга роста опухоли.

Ортотопические ксенотрансплантаты, в отличие от подкожных, способны воссоздать опухолевое микроокружение, необходимое для адекватного моделирования инвазивности и метастазирования [9]. Развитие метастазов у животных-носителей имеет решающее значение при моделировании РТК, так как 50% впервые диагностированных ЗНО толстого кишечника сопровождаются наличием метастазов. Но, несмотря на указанные преимущества, сложности оценки темпов и характера роста опухоли, предполагающие выполнение серии исследований с использованием специализированного оборудования для визуализации *in vivo* или проведения травматичной процедуры лапаротомии, ограничивают использование ортотопической PDX-модели [10].

Целями проведенного исследования явились создание гетеротопической и ортотопической PDX-модели рака толстой кишки человека, а также оценка приживления и динамики роста в зависимости от сайта имплантации.

### **Материал и методы исследования**

#### *Лабораторные животные*

Исследование проводили на 40 интактных иммунодефицитных самках мышей линии Balb/c Nude с массой тела 18–24 г, возрастом 5–6 недель. Животные содержались в SPF-виварии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава РФ в системе искусственно вентилируемых клеток с соблюдением светового режима день/ночь (12/12 часов) при температуре 22–26°C и относительной влажности воздуха 50–60%.

Работа с животными осуществлялась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» Хельсинской декларации. План исследования был одобрен биоэтической комиссией ФГБУ «НМИЦ онкологии» Министерства здравоохранения РФ.

#### *Доноры опухолевого материала*

Донорами опухолевого материала являлись пациентки с ЗНО толстого кишечника (стадии T3–T4), проходящие лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии» Министерства здравоохранения РФ. От каждого донора было получено добровольное письменное согласие

на передачу биологического материала. Опухолевый материал от всех пациенток был получен в ходе хирургической резекции.

#### *Наркотизация лабораторных животных*

Животным выполняли премедикацию путем внутримышечного введения 1,5 мл/кг препарата «Ксила» (Interchemie werken «De Adelaar» B.V, Нидерланды). Через 15 минут проводили внутримышечную инъекцию препарата «Золетил 100» (Virbac, Франция) в дозе 50 мг/кг. Процедура наркотизации была проведена в соответствии с запатентованным ранее способом [10].

#### *Процедура создания подкожной PDX-модели*

Создание подкожной PDX-модели начинали с обработки паховой области 10%-ным раствором повидон-йода, после чего производили надрез длиной 10 мм. Через кожное отверстие вставляли прямой острый пинцет, сдвигая подкожную жировую клетчатку каудальнее, и имплантировали опухолевый фрагмент. Пинцет извлекали, удерживая фрагмент в ране. Края раны соединяли, накладывая простой узловый шов, с использованием материала пролен 4-0.

#### *Процедура создания ортотопической PDX-модели*

Создание ортотопической PDX-модели начинали с обработки брюшной поверхности животного 10%-ным раствором повидон-йода, после чего проводили послойное рассечение кожи и тканей брюшной стенки вдоль тела. Для удобства манипуляций толстую кишку животного выводили в операционную рану и формировали карман, в который погружали фрагмент опухоли, полученный от пациента. После процедуры имплантации затягивали лигатуру и помещали кишку в брюшную полость. Послойное ушивание стенки брюшной полости осуществляли с помощью шовного материала пролен 5-0.

#### *Анализ роста подкожных и ортотопических ксенографтов, полученных от пациенток*

С целью оценки успешности ксенотрансплантации и характера роста опухоли проводили замеры подкожных опухолевых узлов с помощью электронного штангенциркуля (ШЦЦ-I-150-0.01). Для оценки характера роста ортотопических ксенотрансплантатов проводили процедуру контрольной лапаротомии на 20-е, 50-е и 70-е сутки после имплантации.

Объемы опухолевых узлов определяли по формуле Шрека для эллипсоида:

$$V=a \times b \times c \times \pi / 6,$$

где а, в, с – измерения опухолевого узла в трех плоскостях.

#### *Процедура эвтаназии*

На 90-е сутки эксперимента проводили процедуру эвтаназии путем дислокации шейных позвонков. После эвтаназии выполняли выделение опухолевых узлов для дальнейших исследований.

### *Гистологический анализ*

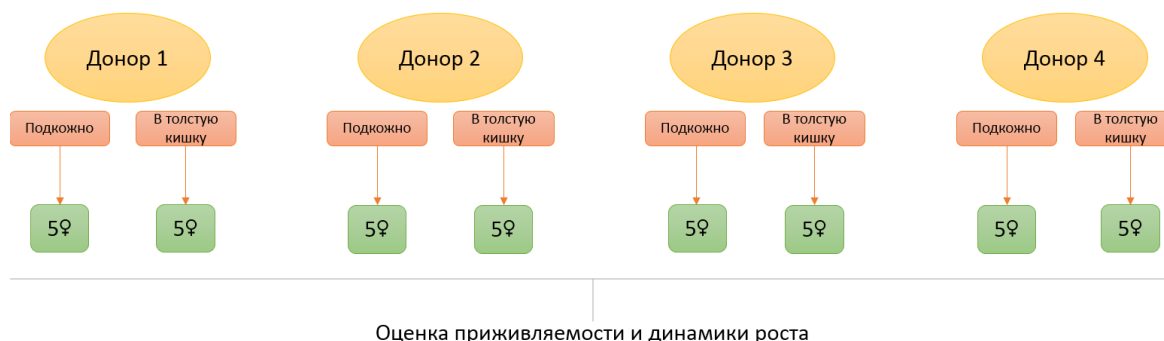
Свежеизолированный опухолевый материал помещали в 10%-ный раствор формалина на 24 часа, после чего образцы подвергали обезвоживанию и заключали в парафин. Серийные срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Sigma). Изображения получали с помощью светового микроскопа (ZEISS).

### *Статистический анализ*

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft. Inc., США). Анализ достоверности различий между изучаемыми группами проводили с помощью произвольных таблиц сопряженности с использованием критерия хи-квадрат.

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

Для выполнения данной работы в результате процедуры хирургической резекции были получены образцы первичных опухолей от четырех пациенток, ранее не получавших химиотерапию. Свежерезецированный опухолевый материал транспортировали из операционной в виварий Испытательного лабораторного центра в питательной среде для культуры клеток с добавлением антибиотика. Образец от каждого пациента был разделен на равные фрагменты и имплантирован в подкожный (n=5) и ортотопический сайт (n=5), который был представлен дистальными отделами толстого кишечника (рис. 1).



*Рис. 1. Дизайн эксперимента*

Приживление PDX считалось успешным, если пересаженные опухоли начинали расти в течение 3 месяцев.

Показатели приживления подкожных и ортотопических ксенотрансплантатов представлены в таблице.

Процент приживления опухолевого материала, полученного от пациенток

**Номер  
пациента-  
донора**

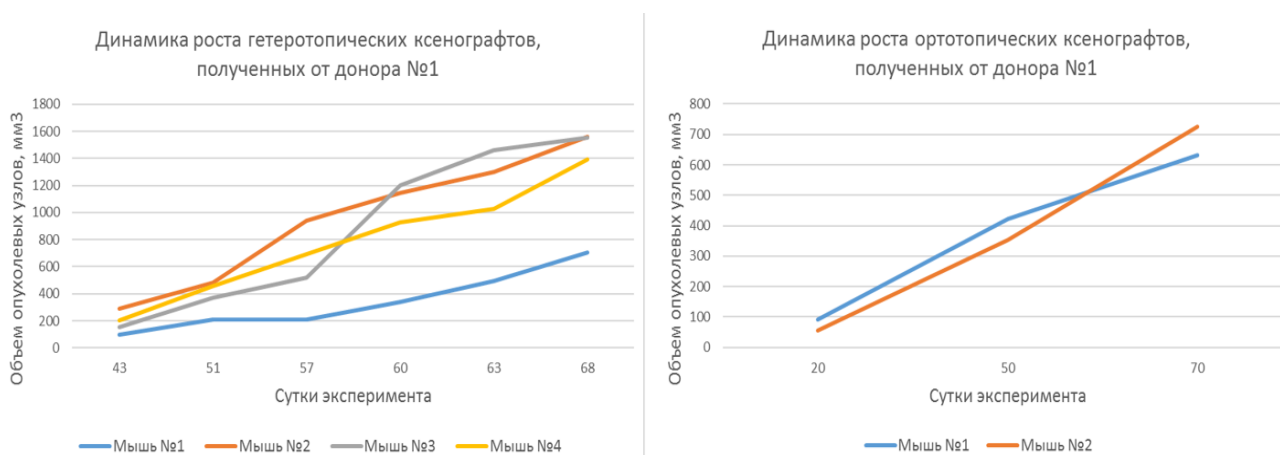
**Процент приживления**

	<b>Ортотопический сайт</b>	<b>Гетеротопический сайт</b>
<b>№ 1</b>	40% (2/5)	80% (4/5)
<b>№ 2</b>	60% (3/5)	40% (2/5)
<b>№ 3</b>	40% (2/5)	40% (2/5)
<b>№ 4</b>	Опухолевый материал не прижился	Опухолевый материал не прижился

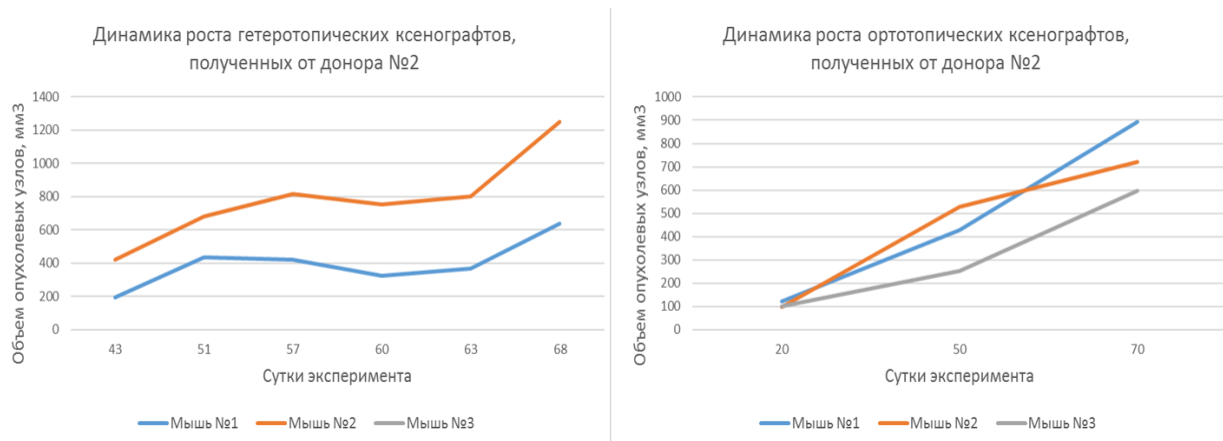
По результатам проведенного анализа статистически значимых отличий между факторным (сайт имплантации) и результативным (% приживления опухолевого материала) признаками обнаружено не было ( $p=7,81$ ,  $p>0,05$ ). Полученные результаты позволяют говорить о том, что успех приживления опухолевого материала не зависит от выбранного сайта имплантации и, возможно, детерминирован другими факторами. Из четырех процедур ксенотрансплантации три привели к формированию опухолевых узлов как в гетеротопическом, так и в ортотопическом сайтах; у животных, получивших биоматериал от донора № 4, не наблюдался опухолевый рост в обоих сайтах имплантации; таким образом, общий показатель результативности составил 75%.

Ксенотрансплантаты, созданные на основе опухолевых фрагментов, полученных от пациенток-доноров № 1, № 2 и № 3, продемонстрировали относительно непродолжительный латентный период, длящийся от 30 до 60 дней, после чего наблюдалась экспоненциальная фаза роста. Динамика роста представлена на рисунках 2, 3 и 4.

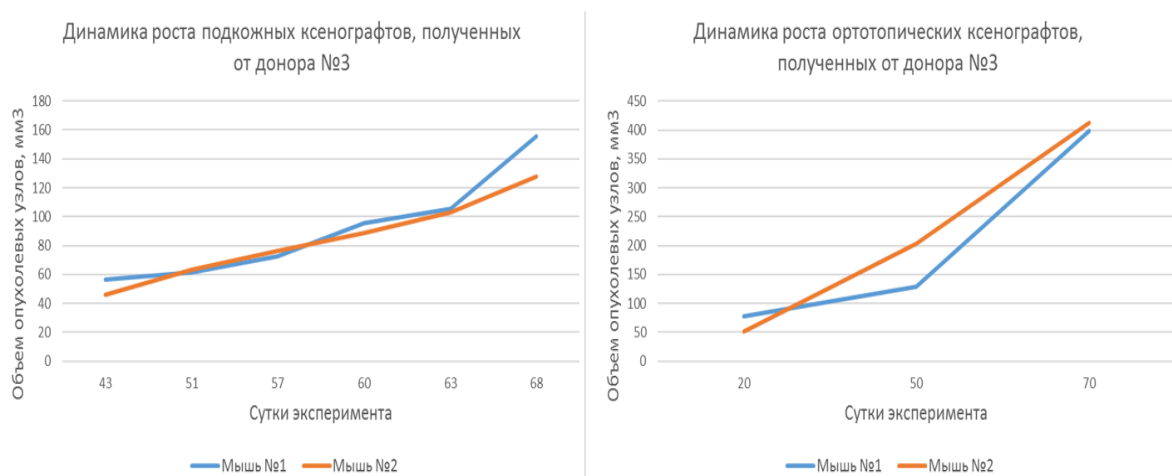
Наблюдаемая динамика роста подкожных ксенотрансплантатов, полученных от доноров № 1, № 2 и № 3, характеризовалась постепенным увеличением объемов опухолевых узлов как при гетеротопическом, так и при ортотопическом варианте имплантации.



*Рис. 2. Динамика роста гетеротопических и ортотопических ксенотрансплантатов, полученных от донора № 1*

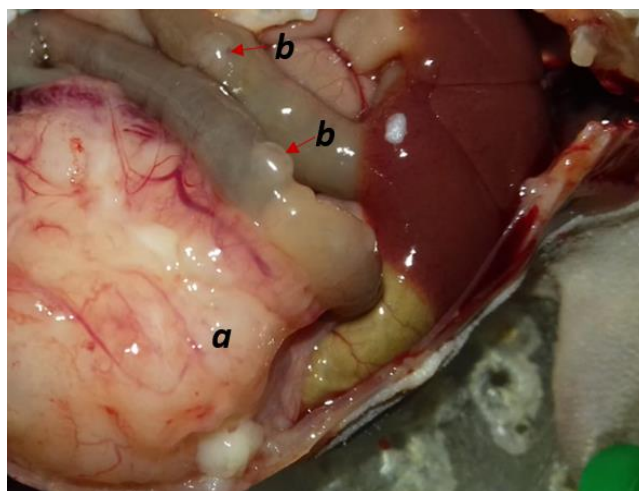


*Рис. 3. Динамика роста гетеротопических и ортотопических ксенотрансплантатов, полученных от донора № 2*



*Рис. 4. Динамика роста гетеротопических и ортотопических ксенотрансплантатов, полученных от донора № 3*

Результаты процедуры лапаротомии убедительно продемонстрировали экзофитный рост и выраженную сосудистую сеть на опухолевых узлах у всех ортотопических PDX-моделей, а также наличие метастатического поражения у некоторых животных (рис. 5). Объемы ортотопических ксенографтов были сопоставимы с таковыми у подкожных.



*Рис. 5. Процедура лапаротомии (a – опухолевый узел, b – метастаз)*

Результаты проведенного гистологического исследования продемонстрировали соответствие PDX-модели гистотипу и степени дифференцировки первичной опухоли пациента.

В настоящее время модели PDX являются востребованной экспериментальной модельной системой, способной воспроизвести важные биологические черты опухолей человека. В ходе данной работы были созданы как гетеротопические, так и ортотопические PDX-модели рака толстой кишки. Согласно исследованию Y. Koga и A. Ochiai (2019), создание гетеротопических (подкожных) PDX является наиболее распространенной процедурой, в 80% всех проанализированных авторами публикациях упоминается именно этот вариант ксенотрансплантации [11]. Тем не менее, ортотопический сайт считается более предпочтительным для нескольких типов рака, включая первичную или метастатическую опухоль головного мозга, рак молочной железы и рак почки [12]. Кроме того, ортотопическая имплантация может увеличить частоту метастазов во время роста ксенотрансплантата и должна рассматриваться как приоритетная, когда метастазирование опухоли является предметом исследования [13].

Однако в работе B. Rashidi с соавторами (2000) было продемонстрировано, что нередко создание ортотопической PDX-модели сопровождается непроходимостью и преждевременной гибелью животного-носителя, связанными с быстрым ростом опухоли человека в слизистой оболочке толстого кишечника мыши [14]. Но в ходе нашей работы описанный характер роста PDX-модели не наблюдался.

В результате эксперимента была проведена оценка приживления и динамики роста PDX рака толстой кишки человека при ортотопической и гетеротопической локализации. Зависимости показателей приживления ксенотрансплантатов, полученных от 4 пациенток с диагнозом «рак толстого кишечника», и скорости роста от используемых сайтов имплантации в данном эксперименте не наблюдалось.

В работе Н.А. Нефёдовой и П.Г. Малькова (2015) подчеркивается роль опухолевых стволовых клеток (ОСК) в канцерогенезе РТК. «Иерархическая» модель развития опухоли объясняет механизм регуляции пролиферативного потенциала путем выделения растворимых факторов роста мезенхимальными клетками [14].

На основании полученных результатов и анализа литературы можно сделать вывод о том, что процент приживления опухолевого материала не зависит от выбранного сайта имплантации, а определяется гетерогенностью свежеизолированных опухолевых фрагментов. Данная особенность могла стать причиной попадания различного количества ОСК в ксенотрансплантат.

## **Заключение**



Проведенный эксперимент позволяет предположить, что успех имплантации и высокая приживляемость определяются клеточным составом имплантируемых фрагментов, таким образом, минимизируется роль сайта имплантации при создании PDX-модели. Гетерогенность опухолевого материала, полученного от пациентов, детерминирует различия пролиферативного потенциала опухолевых клеток, а также определяет вероятность метастатического поражения прилегающих тканей и локорегиональных лимфатических узлов. Перспективным представляется определение роли гетерогенности клеточного состава и количества ОСК в образцах опухолей, полученных от пациента, при создании как гетеротопических, так и ортотопических PDX-моделей рака толстого кишечника.

### Список литературы

1. Siegel R.L., Miller K.D., Goding Sauer A., Fedewa S.A., Butterly L.F., Anderson J.C., Cercek A., Smith R.A., Jemal A. Colorectal cancer statistics 2020. CA: a cancer journal for clinicians. 2020. № 3. P. 145-164.
2. Klaver C.E.L., Kappen T.M., Borstlap W.A.A., Bemelman W.A., Tanis P.J. Laparoscopic surgery for T4 colon cancer: a systematic review and meta-analysis. Surgical endoscopy. 2017. № 12. P. 4902-4912.
3. McQuade R.M., Stojanovska V., Bornstein J.C., Nurgali K. Colorectal cancer chemotherapy: the evolution of treatment and new approaches. Current medicinal chemistry. 2017. № 15. P. 1537-1557.
4. Кит О.И., Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.В., Колесников В.Е., Харагезов Д.А. Лапароскопические комбинированные оперативные вмешательства при метастатическом колоректальном раке // Колопроктология. 2015. № 4. С. 19-23.
5. Gengenbacher N., Singhal M., Augustin H.G. Preclinical mouse solid tumour models: status quo, challenges and perspectives. Nature Reviews Cancer. 2017. № 12. P. 751-765.
6. Жукова Г.В., Шихлярова А.И., Сагакянц А.Б., Протасова Т.П. О расширении вариантов использования мышей balb/c nude для экспериментального изучения злокачественных опухолей человека in vivo // Южно-российский онкологический журнал. 2020. № 2. С. 28-35.
7. Lwin T.M., Hoffman R.M., Bouvet M. Advantages of patient-derived orthotopic mouse models and genetic reporters for developing fluorescence-guided surgery. Journal of surgical oncology. 2018. № 2. P. 253-264.
8. Johnson R.L., Fleet J.C. Animal models of colorectal cancer. Cancer and Metastasis Reviews. 2013. № 1. P. 39-61.

9. Lai Y., Wei X., Lin S., Qin L., Cheng L., Li P. Current status and perspectives of patient-derived xenograft models in cancer research. *Journal of hematology & oncology*. 2017. № 1. P. 1-14.
10. Колесников Е.Н., Лукбанова Е.А., Ванжа Л.В., Максимов А.Ю., Кит С.О., Гончарова А.С., Заикина Е.В., Миндарь М.В., Ткачев С.Ю., Ходакова Д.В., Волкова А.В. Способ проведения наркоза у мышей balb/c nude при оперативных вмешательствах // Патент на изобретение. 2020. Номер патента: RU 2712916 С1. Номер заявки: 2019130699Дата регистрации: 26.09.2019. Патентообладатели: федеральное государственное бюджетное учреждение "Ростовский научно-исследовательский онкологический институт" Министерства здравоохранения РФ.
11. Lim H. I., Namada K., Yamamoto J., Han Q., Tan Y., Choi H.J., Oral methioninase inhibits recurrence in a PDOX mouse model of aggressive triple-negative breast cancer. *In vivo*. 2020. № 5. P. 2281-2286.
12. Higuchi T., Sugisawa N., Miyake K., Oshiro H., Yamamoto N., Hayashi K. Combination treatment with sorafenib and everolimus regresses a doxorubicin-resistant osteosarcoma in a PDOX mouse model. *Anticancer research*. 2019. № 9. P. 4781-4786
13. Rashidi B., Sun F.X., Jiang P., An Z., Gamagami R., Moossa A. R. A nude mouse model of massive liver and lymph node metastasis of human colon cancer. *Anticancer research*. 2000. № 2. P. 715-722.
14. Нефёдова Н.А., Мальков П.Г. Роль стволовых клеток в канцерогенезе толстой кишки // *Онкологическая колопроктология*. 2015. № 3. С. 15-24.