

## ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ КРИОКОНСЕРВАЦИИ КСЕНОТРАНСПЛАНТАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ

Гончарова А.С.<sup>1</sup>, Ходакова Д.В.<sup>1</sup>, Миндарь М.В.<sup>1</sup>, Галина А.В.<sup>1</sup>, Карасев Т.С.<sup>1</sup>, Колесников Е.Н.<sup>1</sup>, Каймакчи О.Ю.<sup>1</sup>, Маслов А.А.<sup>1</sup>, Позднякова В.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: [fateyeva\\_a\\_s@list.ru](mailto:fateyeva_a_s@list.ru)

Ксенотрансплантаты, полученные от пациентов (patient derived xenografts – PDX), являются важной экспериментальной платформой для изучения эффективности противоопухолевых препаратов. Содержание большого количества животных-опухоленосителей непрактично, в связи с чем решающее значение приобретает не только разработка новых методов создания PDX, но также их корректное хранение и воспроизведение. Криоконсервация PDX предполагает работу с макроскопическими объектами, что требует особого подхода, нежели при работе с отдельными клетками и их суспензиями. Важным вопросом представляется поиск наиболее надежных методов криоконсервации PDX, способных обеспечить защиту от потери с течением времени ценных и незаменимых опухолевых образцов. Целью данной работы являлось изучение эффективности трех различных протоколов криоконсервации образцов PDX. 12 уникальных PDX были подвергнуты процедуре криоконсервации согласно трем различным протоколам, затем была выполнена подкожная имплантация восстановленных из криохранения опухолевых образцов и проведена оценка прививаемости и длительности латентной фазы. Анализ полученных нами результатов криоконсервации с использованием различных вариантов протоколов показал, что для успешной криоконсервации PDX важную роль играют скорость охлаждения, в также состав криомикса.

Ключевые слова: опухоль, ксенотрансплантат, PDX, криоконсервация, криомикс.

## STUDY OF EFFECTIVENESS OF DIFFERENT PATIENT-DERIVED XENOGRAFT CRYOPRESERVATION VARIANTS

Goncharova A.S.<sup>1</sup>, Khodakova D.V.<sup>1</sup>, Mindar M.V.<sup>1</sup>, Galina A.V.<sup>1</sup>, Karasev T.S.<sup>1</sup>, Kolesnikov E.N.<sup>1</sup>, Kaymakchi O.Yu.<sup>1</sup>, Maslov A.A.<sup>1</sup>, Pozdnyakova V.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: [fateyeva\\_a\\_s@list.ru](mailto:fateyeva_a_s@list.ru)

Patient-derived xenografts (PDXs) are an important experimental platform for studying the effectiveness of anticancer drugs. Maintaining a large number of tumor-bearing animals is impractical, and therefore both the development of new methods for PDX creation and their correct storage and reproduction are of decisive importance. PDX cryopreservation involves working with macroscopic objects which requires an approach different from the one used when working with individual cells. The search for the most reliable PDX cryopreservation methods preventing against the loss of valuable and irreplaceable tumor samples over time is important. The purpose of this study was to analyze the effectiveness of three different protocols for cryopreservation of PDX samples. 12 unique PDXs were cryopreserved according to three different protocols, and then the reanimated tumor specimens were implanted subcutaneously and assessed for graftability and the latency period. An analysis of results of various cryopreservation protocols showed that success of PDX cryopreservation depended on the freezing rate and the cryomix composition.

Keywords: tumor, xenotransplantat, PDX, cryopreservation, cryomix.

Ксенотрансплантаты, полученные от пациентов (patient derived xenografts – PDX), представляют собой важную экспериментальную платформу для изучения эффективности противоопухолевых препаратов, в связи с чем актуальной задачей является не только разработка новых методов создания PDX, но также их корректное хранение и воспроизведение [1; 2]. В данном аспекте процедуру криоконсервации необходимо рассматривать не только как

этап создания биологических коллекций опухолей, но и как элемент для практического планирования экспериментов, а также для перекрестной проверки результатов, полученных с помощью PDX, в рамках выполнения программы качества.

Процесс криоконсервации представляет собой документированную процедуру замораживания биологических образцов с целью хранения их в течение длительного времени с поддержанием жизнеспособности клеток после восстановления из криохранилища [3; 4]. Применение этой процедуры по отношению к ксенотрансплантатам, полученным от пациентов, позволяет формировать коллекцию ранних поколений PDX с возможностью оттаивания и повторной ксенотрансплантации в любое время в зависимости от потребностей исследователей [5; 6]. Кроме того, криохранение образцов PDX позволяет осуществить отсроченное применение ранее сгенерированных ксенотрансплантатов, что является целесообразной альтернативой содержанию мышей-опухоленосителей [7; 8].

Криоконсервация клеточных линий или отдельных клеток является широко распространенной в экспериментальной практике процедурой [9; 10]. Однако создание коллекций PDX предполагает работу с макроскопическими объектами, что требует иного подхода, нежели при работе с отдельными клетками или их суспензиями, так как важным моментом являются отличительные характеристики теплопередачи в объемных системах.

В связи с этим важным вопросом представляется выявление наиболее надежных способов криоконсервации и хранения PDX, способных обеспечить защиту от потери с течением времени ценных и незаменимых опухолевых образцов.

Целью данной работы являлось изучение эффективности трех различных протоколов криоконсервации образцов PDX.

## **Материал и методы исследования**

### *Опухолевый материал*

Криоконсервации, хранению и последующему восстановлению из криоконсервации подвергали третью генерацию подкожных PDX, полученных в ходе ранее выполненных работ в ФГБУ «НМИЦ онкологии». Всего криоконсервации было подвергнуто 12 PDX: из них 4 были ксенотрансплантатами рака пищевода, 4 – ксенотрансплантатами рака кишки, 4 – ксенотрансплантатами рака желудка,

### *Криоконсервация опухолевого материала*

Каждый PDX подвергали трем протоколам криоконсервации:

- 1) протокол 1 криомикс 1 (80% RPMI1640, 10% FBS, 10% DMSO) хранение -80 °С;
- 2) протокол 2 криомикс 2 (90% FBS, 10% DMSO), хранение -80 °С;
- 3) протокол 3 криомикс 1 (80% RPMI1640, 10% FBS, 10% DMSO) + использование криоконтейнера Mr. Frosty, хранение -80 °С.

Для этого предварительно выделенный PDX делили на фрагменты размером ориентировочно 3×3×3 мм и помещали в стерильные криопробирки с завинчивающейся крышкой объемом 1,8 мл, содержавшие микс для криоконсервации. В каждую пробирку помещали по 3 фрагмента. Таким образом, от каждого из 12 ксенотрансплантатов сохранили по 9 фрагментов (по 3 фрагмента для каждого из трех протоколов криоконсервации). Средняя продолжительность хранения образцов при -80 °С была одинаковой для всех используемых протоколов и всех образцов и составила от 90 до 120 дней.

#### *Создание подкожных PDX моделей после криоконсервации*

Оттаивание образцов PDX осуществляли на водяной бане (34–37 °С), затем содержимое криопробирки помещали в чашку Петри и тщательно промывали образцы опухоли (не менее трех раз) 0,9% раствором NaCl, чтобы удалить остатки криопротектора, которые потенциально могут отрицательно повлиять на эффективность приживления. Размороженные и промытые образцы PDX имплантировали иммунодефицитным мышам подкожно. Имплантацию выполняли с применением инъекционного наркоза для лабораторных животных с использованием препаратов «Ксила» и «Золелил-100», дозы 20 и 50 мг/кг соответственно. Для исследования использовали 108 иммунодефицитных мышей Balb/c Nude, полученных из «SPF-вивария» ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск). Мышей содержали в SPF-виварии в системе ИВК в помещении с контролем параметров микроклимата (температура 18-25 °С, влажность 40-60%, световой режим день-ночь).

#### *Анализ роста опухолевых ксенографтов*

Замеры опухолевых узлов выполняли при помощи штангенциркуля. Размеры ксенографтов рассчитывали по формуле Шрека для эллипсоида:  $V = a \times b \times c \times \pi / 6$ , где V – объем опухоли (мм<sup>3</sup>), a, b, c – максимальные диаметры эллипсоида в трех плоскостях (мм).

#### *Анализ эффективности протокола криоконсервации*

В качестве критериев эффективности протокола криоконсервации оценивали эффективность приживления ксенотрансплантата, выраженную в %, и длительность латентной фазы (время от момента имплантации опухолевого фрагмента до начала роста), выраженную в сутках.

#### *Статистический анализ*

Статистический анализ результатов исследования выполнили с помощью программы Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде выборочного среднего значения, стандартной ошибки среднего. Достоверность различий средних величин независимых выборок оценивали с помощью параметрического критерия Стьюдента.

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

Жизнеспособные биологические ткани, имеющие значимый потенциал для проведения как фундаментальных исследований, так и доклинических испытаний, нельзя длительное время сохранять при простом замораживании в связи с явлениями образования кристаллов льда, осмотического шока и повреждения мембраны, возникающих вследствие замораживания-оттаивания, что приводит к гибели клеток [3]. В данном аспекте предотвращение клеточного повреждения в процессе криоконсервации является важным научным вопросом, в связи с чем поиск наиболее эффективного протокола рассматривается нами как приоритетная задача, имеющая большое практическое значение. Учитывая плюрализм мнений относительно оптимальных условий для сохранения жизнеспособности клеток и тканей при экстремально низких температурах, становится очевидной необходимость выполнения оценки имеющихся возможностей, а также представление надежного метода криоконсервации PDX. В связи с этим нами были выполнены работы по криоконсервации образцов PDX с использованием различных вариантов криомиксов и криоконтейнера Mg. Frosty в качестве дополнительного оборудования.

В ходе данной работы каждый из 12 уникальных PDX был подвергнут процедуре криоконсервации согласно трем различным протоколам, то есть каждому протоколу соответствовал одинаковый комплект из 12 криопробирок. Каждая криопробирка вне зависимости от используемого протокола содержала по три фрагмента PDX. Схема криоконсервации образцов представлена на рисунке 1.



*Рис. 1. Схема криоконсервации образцов PDX*

После процедуры оттаивания каждый из фрагментов был подкожно имплантирован иммунодефицитной мышью (1 процедура – 1 криопробирка – 3 фрагмента – 3 мыши), затем была выполнена оценка приживления и скорости роста 108 опухолевых ксенотрансплантатов. Результаты оценки приживления после восстановления из заморозки приведены в таблице.

Оценка приживления образцов PDX после применения различных вариантов протокола криоконсервации

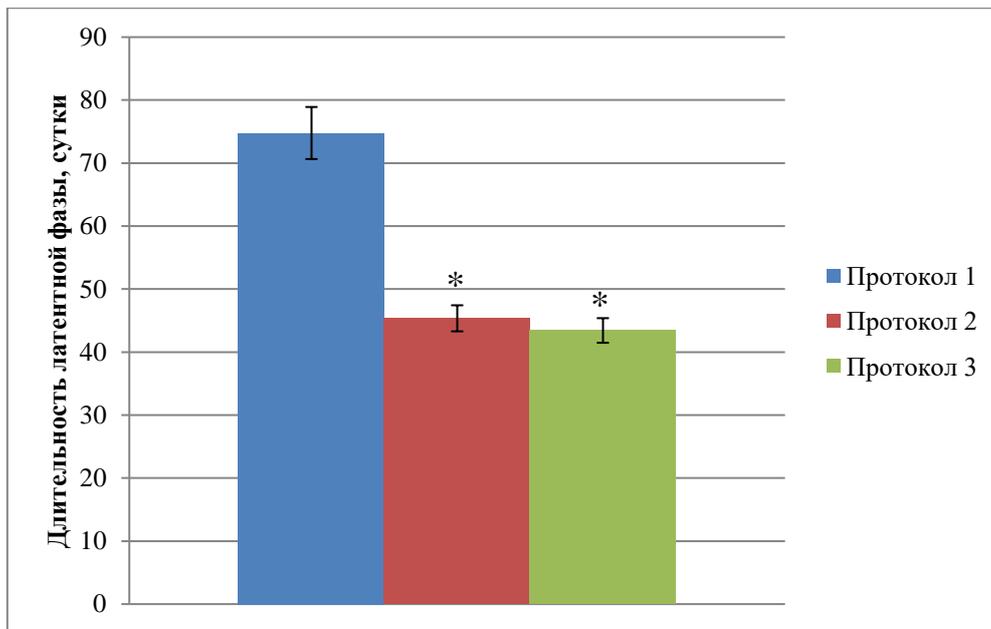
Используемый протокол	Количество животных	Эффективность приживления	
		количество животных с успешным приживлением /общее количество животных	% успешного приживления/% общего количества
Протокол 1	36	11/36	30,5/100
Протокол 2	36	26/36	72,2/100
Протокол 3	36	27/36	75,0/100

Оценка результатов показала, что при выполнении протокола 1 общая эффективность приживления составила 30,5% (успешное приживление 11 из 36 опухолевых фрагментов), при этом в двух случаях из двенадцати не произошло приживление ни одного из трех имплантированных иммунодефицитным мышам фрагментов ксенотрансплантата, что указывает на потенциальную вероятность утраты уникальных образцов PDX при использовании этого протокола криоконсервации.

Для протокола 2 общая эффективность приживления составила 72,2% (успешное приживление 26 из 36 опухолевых фрагментов), а в рамках выполнения протокола 3 общая эффективность приживления составила 75,0% (успешное приживление 27 из 36 опухолевых фрагментов).

Полученные данные продемонстрировали более высокие показатели эффективности приживления при применении протокола 2 и 3 в сравнении с протоколом 1, однако ни одна из процедур не продемонстрировала 100% приживления. В связи с этим целесообразно предложить в качестве обязательного условия работы с восстановленными из криосохранения образцов PDX использование нескольких животных (от 3 до 5 голов), так как использование одной особи и отсутствие дублирующих экземпляров может привести к потере уникальных образцов PDX.

Помимо оценки эффективности приживления, нами также была проанализирована длительность латентной фазы, представляющая собой время от момента имплантации опухолевого образца до первой пальпации растущей опухоли. Результаты оценки длительности латентной фазы, соответствующей каждому из использованных нами протоколов, представлены на рисунке 2.



*Рис. 2. Сравнение длительности латентной фазы при росте ксенотрансплантатов после криоконсервации в зависимости от используемого протокола*

Примечание: \* - статистически значимые различия относительно длительности латентной фазы при применении протокола 1,  $p < 0,001$ .

Было установлено, что длительность латентной фазы, соответствующая протоколу 1, составила  $76,1 \pm 4,1$  суток, при этом длительности латентной фазы для протокола 2 и протокола 3 были значимо короче и составили  $46,0 \pm 2,1$  суток ( $p < 0,001$ ) и  $44,8 \pm 2,0$  суток ( $p < 0,001$ ). Значимых различий между продолжительностью латентной фазы, соответствующей протоколу 2, и длительностью латентной фазы, соответствующей протоколу 3, не было зафиксировано.

Важно отметить, что криомикс 1, используемый для протокола 1 и 3, представляет собой один из широко применяемых растворов для криоконсервации с криопротектором, основная часть которого состоит из питательной среды для культуры клеток. В литературе наиболее часто в качестве стандартных миксов для криоконсервации упоминаются различные комбинации питательных сред для культивирования клеток, сывороточного альбумина или фетальной бычьей сыворотки (fetal bovine serum – FBS) и криопротекторных агентов, при этом растворы культуральных сред и сыворотки выполняют роль аналога внеклеточной жидкости и имитируют условия, нужные для поддержания жизнедеятельности клеток, а криопротекторы защищают от низкотемпературной деструкции [5].

В качестве криопротектора в данной работе для всех вариантов протоколов использовали диметилсульфоксид (ДМСО), добавляя его в количестве 10% от всего объема криомикса. На сегодняшний день ДМСО является одним из наиболее широко используемых

криопротекторов, предназначенных для эффективного криосохранения живых клеток и тканей. Его протективное действие реализуется за счет снижения концентрации электролитов в клетках и растворах вокруг нее при любой температуре, однако при этом ДМСО может приводить к повышенному метилированию ДНК и изменению гистонов, создавая тем самым определенные трудности для его использования в рутинных процедурах [11–13].

Для протокола 3, помимо криомикса, содержащего среду для культивирования клеток, сыворотку и ДМСО, использовали также контейнер Mr. Frosty, разработанный для медленного замораживания живых клеток. Применение подобного рода контейнеров или другого дополнительного оборудования позволяет избежать резкого понижения температуры и обеспечивает равномерное охлаждение со скоростью  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ , которая является оптимальной для сохранения жизнеспособности тканей.

Анализ литературных данных продемонстрировал, что поиск и разработка оптимального решения для выполнения наиболее эффективной криоконсервации PDX является актуальной задачей в сфере трансляционных исследований. Например, в исследовании Ivanics T. (2018), выполненном по схожему с предложенным в нашей работе дизайном, была выполнена криосохранение 57 уникальных образцов PDX согласно стандартному и специализированному протоколу, однако из 57 PDX только 7 были подвергнуты криоконсервации согласно обоим протоколам. Авторы данной работы для стандартной процедуры криоконсервации использовали RPMI1640, содержащую 10% ДМСО и 10% фетальной бычьей сыворотки, как это было выполнено и в нашем исследовании, а в качестве специализированной криосреды – Cryostor™ CS10. Авторами продемонстрированы более высокие показатели эффективности приживления и более короткое время формирования опухолевого узла при криоконсервации с использованием специализированной криосреды, чем при применении традиционных миксов, что указывает на превосходство первых, но тем не менее значительная вариативность времени хранения замороженных образцов, колеблющаяся от 29 до 177 недель, указывает на необходимость разработки и применения дизайна, позволяющего получить более сопоставимые данные [5].

Также немаловажно упомянуть, что успех процесса криоконсервации зависит не только от свойств криозащитных агентов. Критическим фактором является также скорость замораживания и хранения объектов при криогенных температурах. Было показано, что при низких скоростях охлаждения в клетках происходит отток внутриклеточной воды, что препятствует образованию внутриклеточного льда, при этом оптимальная скорость охлаждения зависит от типов клеток [14]. В классических протоколах медленного охлаждения типичная скорость охлаждения составляет около  $1\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{мин.}$ , что можно обеспечить путем использования дополнительного оборудования, позволяющего контролировать скорость и

температуру в ходе процесса. К такому оборудованию можно отнести программируемые морозильные камеры (FreezerPro) или более простые в эксплуатации переносные морозильные контейнеры типа CoolCell®, CryoMed LX или Mr.Frosty, используемый в ходе нашего исследования.

Также в качестве возможной альтернативы медленной заморозки с использованием спецоборудования применяют процедуру витрификации, представляющую собой процесс замораживания, при котором растворы, в которых располагаются живые объекты, не кристаллизуются при охлаждении, а приобретают стекловидное состояние [15]. Например, в работе по созданию биобанка PDX опухолей яичника был продемонстрирован опыт использования процедуры витрификации, а также выполнено сравнение эффективности приживления и длительности латентной фазы после прямого приживления, использования криомикса (фетальная бычья сыворотка+ДМСО) и витрификации, при этом авторы заявляют о том, что криоконсервация с использованием криомикса была более успешна, чем витрификация [15].

Таким образом, анализ полученных в ходе нашего исследования результатов криоконсервации с использованием различных вариантов протоколов и сравнение их с данными, представленными в работах других авторов, показал, что для сохранения способности к устойчивому росту PDX после восстановления из криоконсервации важную роль играют скорость охлаждения, в также состав криомиксов.

### **Заключение**

Было продемонстрировано, что показатели приживления PDX и длительность латентной фазы были наилучшими из сравниваемых при применении протокола 2 с использованием криомикса на основе фетальной бычьей сыворотки с содержанием 10% ДМСО и протокола 3 с использованием криомикса на основе питательной среды с 10% фетальной бычьей сывороткой, 10% ДМСО и применением криоконтейнера Mr.Frosty, чем при использовании протокола 1 с криомиксом на основе питательной среды с 10% фетальной бычьей сывороткой и 10% ДМСО без применения Mr.Frosty. Однако, несмотря на сопоставимые показатели эффективности протоколов 2 и 3, предпочтительнее является применение протокола 3, так как использование криоконтейнера Mr.Frosty позволяет снизить расход фетальной бычьей сыворотки – наиболее дорогостоящего компонента криомикса, что является экономически целесообразным.

### **Список литературы**

1. Кит О.И., Фоменко Ю.А., Карнаухов Н.С., Лаптева Т.О., Волошин М.В., Вакуленко Г.Ю. Использование электронного архива результатов прижизненных патологоанатомических исследований, как инструмент внутреннего контроля качества кодирования по системе МКБ-О-3 (ICD-O), на примере анализа злокачественных новообразований желудка // Южно-Российский онкологический журнал. 2021. № 25. Т. 2 (1).С. 26–34.
2. Кит О.И., Колесников Е.Н., Максимов А.Ю., Протасова Т.П., Гончарова А.С., Лукбанова Е.А. Методы создания ортотопических моделей рака пищевода и их применение в доклинических исследованиях // Современные проблемы науки и образования. 2019 № 2. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=28606> (дата обращения: 05.09.2022).
3. Yang J., Gao L., Liu M., Sui X., Zhu Y., Wen C., Zhang L. Advanced biotechnology for cell cryopreservation. *Trans Tianjin Univ.* 2020. № 26 (6). P. 409–423.
4. Weng L., Beauchesne P.R. Dimethyl sulfoxide-free cryopreservation for cell therapy: A review. *Cryobiology.* 2020 № 94. P. 9–17.
5. Ivanics T., Bergquist J.R., Liu G., Kim M.P., Kang Y., Katz M.H., Perez M.V.R., Thomas R.M., Fleming J.B., Truty M.J. Patient-derived xenograft cryopreservation and reanimation outcomes are dependent on cryoprotectant type. *Lab Invest.* 2018. № 98 (7). P. 947–956.
6. Al Diffalha S., Sexton K.C., Watson P.H., Grizzle W.E. The Importance of Human Tissue Bioresources in Advancing Biomedical Research. *Biopreserv Biobank.* 2019. № 17 (3). P. 209–212.
7. Kageyama K., Ohara M., Saito K., Ozaki S., Terai M., Mastrangelo M.J., Fortina P., Aplin A.E., Sato T. Establishment of an orthotopic patient-derived xenograft mouse model using uveal melanoma hepatic metastasis. *Journal of Translational Medicine.* 2017 № 23. Vol. 15 (1). P. 145.
8. Porter L.H., Lawrence M.G., Wang H., Clark A.K., Bakshi A., Obinata D., Goode D., Papargiris M., Clouston D., Ryan A., Norden S., Corey E., Nelson P.S., Isaacs J.T., Grummet J., Kourambas J., Sandhu Sh., Murphy D.G., Pook D., Frydenberg M., Taylor R.A., Risbridger G.P. Establishing a cryopreservation protocol for patient-derived xenografts of prostate cancer. *Prostate.* 2019. № 79 (11). P. 1326–1337.
9. Shibamiya A., Schulze E., Krauß D., Augustin C., Reinsch M., Schulze M.L., Steuck S., Mearini G., Mannhardt I., Schulze Th., Klampe B., Werner T., Saleem U, Knaust A, Laufer S.D., Neuber Ch., Lemme M., Behrens Ch.S., Loos M., Weinberger F., Fuchs S., Eschenhagen Th., Hansen A., Ulmer B.M. Cell banking of hiPSCs: a practical guide to cryopreservation and quality control in basic research. *Current Protocols in Stem Cell Biology.* 2020. № 55 (1). P. e127.
10. Singh G., Manian K.V., Premkumar C., Srivastava A., Daniel D., Velayudhan S.R. Derivation of clinical-grade induced pluripotent stem cell lines from erythroid progenitor cells in xenofree

conditions. in: nagy a, turksen k, editors. induced pluripotent stem (ips) cells: Methods and Protocols. 2022. № 2454. P. 775-789.

11. Thaler R., Spitzer S., Karlic H., Klaushofer K., Varga F. DMSO is a strong inducer of DNA hydroxymethylation in pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Epigenetics*. 2012 № 1. Vol. 7 (6). P. 635–651.

12. Verheijen M., Lienhard M., Schrooders Y., Clayton O., Nudischer R., Boerno S., Timmermann B., Selevsek N., Schlapbach R., Gmuender H., Gotta S., Geraedts J., Herwig R., Kleinjans J., Caiment F. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Sci Rep*. 2019. № 15. Vol. 9 (1). P. 4641.

13. Robles V., Valcarce G.D., Riesco F.M. The use of antifreeze proteins in the cryopreservation of gametes and embryos. *Biomolecules*. 2019. № 9 (5). P. 181.

14. Lee S., Ryu K.J., Kim B., Kang D., Kim Y.Y., Kim T. Comparison between slow freezing and vitrification for human ovarian tissue cryopreservation and xenotransplantation. *Int. J. Mol. Sci*. 2019 № 8. Vol. 20 (13). P. E3346.

15. Alkema N.G., Tomar T., Duiker E.W., Jan Meersma G., Klip H., van der Zee A.G.J., Wisman G.B.A, de Jong S. Biobanking of patient and patient-derived xenograft ovarian tumour tissue: efficient preservation with low and high fetal calf serum based methods. *Sci Rep*. 2015. № 6. Vol. 5 (1). P. 14495.