

РАЗРАБОТКА МОДЕЛЕЙ РОСТА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

© 2019 г. Е. Ю. Златник*, А. Ю. Максимов, А. С. Гончарова,
Н. С. Карнаухова

*E-mail: elena-zlatnik@mail.ru, rnoi@list.ru

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт»
Минздрава РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Поступила: 13.03.2019 Принята: 27.03.2019

Проведено получение экспериментальных моделей эктопического и ортотопического роста злокачественных опухолей человека на бестимусных мышцах с последующим морфологическим и иммунологическим исследованием. Показана возможность получения опухолей, морфологически соответствующих исходным. Отмечены различные иммунологические изменения у животных с эктопически и ортотопически трансплантированной опухолью.

Ключевые слова: бестимусные мышцы, модели опухолей человека, лимфоциты

DOI: 10.31857/S102872210006702-7

Адрес: 344037 Ростов-на-Дону. 14-я линия, 63, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Златник Елена Юрьевна.
Тел.: 8 961 272 69 68 (моб.).

E-mail: elena-zlatnik@mail.ru

Авторы:

Златник Е. Ю., д.м.н., проф., гл.н.с. лаб. иммунофенотипирования опухолей ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт», Минздрава РФ, Ростов-на-Дону, Россия;

Максимов А. Ю., д.м.н., проф., зам. генерального директора по перспективным научным разработкам ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава РФ Ростов-на-Дону, Россия;

Гончарова А. С., к.б.н., зав. Испытательным лабораторным центром ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава РФ, Ростов-на-Дону, Россия;

Карнаухова Н. С., к.м.н., зав. патологоанатомическим отделением ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава РФ Ростов-на-Дону, Россия.

Разработка адекватных моделей опухолевого роста является актуальной задачей не только современной онкологии, но и экспериментальной иммунологии. Новое законодательство в области иммунотерапии опухолей с применением клеточных технологий на основе иммунокомпетентных клеток человека предполагает этап

доклинических испытаний *in vivo*, для чего необходимы соответствующие экспериментальные модели опухолевого роста, в частности, на иммунодефицитных мышцах [1]. Считается, что бестимусные мышцы не способны развивать иммунный ответ на введение ксеногенных (человеческих) опухолевых и иммунокомпетентных клеток [1, 2]. Эктопическая перевивка опухолей позволяет легко наблюдать за динамикой их роста, ортотопическая создает возможность формирования микроокружения опухоли и максимального приближения патологического процесса к наблюдаемому в клинике [2].

Цель работы: получение экспериментальных моделей эктопического и ортотопического роста злокачественных опухолей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на бестимусных мышцах линии Nu/J (n=20, самцы весом 21–25 г, возраст 7–8 недель), полученных из Российского национального центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск), руководствуясь «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Животных содержали в SPF-отсеке вивария ФГБУ «РНИОИ» в си-

стеме IVС в комнатах с контролируемым параметрами микроклимата (19–26 °С, влажность 40–60%, световой режим день–ночь). Животные имели свободный доступ к корму и воде, предварительно стерилизованным автоклавированием. Клетки рака легкого линии А-549, полученную из ИИЦ РАН (г. Санкт-Петербург), культивировали в виде монослоя в пластиковых флаконах в среде RPMI-1640 с 10% фетальной бычьей сыворотки при t 37 °С и 5% CO₂. Для создания эктопического (подкожного) ксенографта рака легкого человека клетки А-549 предварительно в течение 3-х дней наращивали на пористый скаффолд, представляющий собой сплав титана, алюминия и ванадия (8×4×2 мм), который имплантировали мышам подкожно. Для создания ортотопической пациентоподобной модели рака пищевода человека проводили операцию ксенотрансплантации фрагмента опухоли пищевода, взятого от больного, в пищевод мышцы линии Nu/J. Первичная опухоль характеризовалась как низкодифференцированная аденокарцинома. Ее промывали 3 раза средой 199 с добавлением 1% пенициллина/стрептомицина. Животных вводили в состояние наркоза при помощи комплексного анестетика «Золетил», для премедикации использовали препарат «Ксила». Для обеспечения доступа к пищеводу выполняли послойные разрезы кожи и ткани брюшной стенки мышцы, затем отодвинув левую долю печени вверх, надсекали стенку пищевода и фиксировали лигатурой фрагмент опухоли (2 мм³). Затем брюшную полость послойно ушивали. Животных с ортотопическим ксенографтом пищевода наблюдали в течение 1 месяца, с эктопическим ксенографтом рака легкого – в течение 55 дней, затем подвергали эвтаназии в CO₂ камере. Размеры ксенографтов рассчитывали по формуле Шрека для эллипсоида – $V = a \times b \times c \times \pi / 6$, где V – объем опухоли (мм³), a , b , c – максимальные диаметры эллипсоида в трех плоскостях (мм). Ткани опухолей фиксировали, готовили срезы, окрашивали гематоксилином и эозином. В крови мышей определяли количество популяций лимфоцитов (Т, В, NK) на проточном цитометре FACS CantoII (BD). Для статистической обработки применяли параметрические и непараметрические методы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При создании ортотопических моделей рака пищевода человека опухоль выявлена через 4 недели у 2 животных из 8. Размер ксенографтов со-

ставил 12,6 мм³ и 16,7 мм³. Выявленные опухоли были охарактеризованы морфологически как низкодифференцированные аденокарциномы с инвазией в ткани печени. Начало роста ксенографта, полученного при культивировании клеток рака легкого А549 на скаффолде, отмечено на 10-й день после имплантации; на 55-й день объем ксенографта составил 1207,6 мм³. Опухоль представляла собой низкодифференцированную немелкоклеточную карциному солидного строения с инвазией в жировую ткань. Лимфоциты в крови интактных бестимусных мышей составляют $67,7 \pm 3,1\%$, в основном представлены В-лимфоцитами – $89,3 \pm 1,2\%$, на долю Т-клеток приходится $1,6 \pm 0,4\%$. NK-клетки обнаружены у половины животных в количестве $0,1–0,4\%$ ($0,12 \pm 0,035\%$). Выявлена область неидентифицируемых данной панелью клеток в количестве $7,8 \pm 0,9\%$. Возможно, это моноциты, хотя при уменьшении размера данного гейта сокращался и процент лимфоцитов. Подобная субпопуляция описана среди спленоцитов иммунологически полноценных мышей [3]. Рост ортотопически трансплантированной опухоли сопровождается повышением содержания этих клеток (CD3e-CD19-) до 21% и NK-лимфоцитов до 12% при двукратном снижении общего уровня лимфоцитов за счет В-клеток. При росте эктопической опухоли отмечено снижение процента лимфоцитов без изменения состава их популяций.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, получены модели ортотопических и эктопических опухолей, по морфологии соответствующих исходным, охарактеризована динамика их роста. Отмечены различные иммунологические изменения у животных-опухоленосителей с эктопически и ортотопически трансплантированными опухолями, причину которых предстоит исследовать. Разработанные модели роста злокачественных опухолей, в том числе, приближенные по характеру роста к новообразованиям больных, могут быть использованы для экспериментальной иммунотерапии опухолей с применением клеточных продуктов человеческого происхождения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Трещалина Е. М.* Иммунодефицитные мыши Balb/c Nude и моделирование различных вариантов опухолевого роста для доклинических исследований //

- Российский биотерапевтический журнал.— 2017.— Т. 16.— № 3—С. 6—13. [Treshalina H. M. Immuno-deficient mice Balb/c Nude and modeling of various types of tumor growth for preclinical studies. Russian Journal of biotherapy. 2017; 16(3): 6–13 (In Russ).] doi: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-6-13.
2. Zhao X., Li L., Starr T. K., Subramanian S. Tumor location impacts immune response in mouse models of colon cancer. *Oncotarget*, 2017; 8(33): 54775–54787. doi: 10.18632/oncotarget.18423.
3. Karasova D., Sebkova A., Havlickova H., Sisak F., Volf J., Faldyna M., Ondrackova P., Kummer V., Rychlik I. Influence of 5 major Salmonella pathogenicity islands on NK cell depletion in mice infected with Salmonella enterica serovar Enteritidis. *BMC Microbiol.*, 2010; 10: 75. Published online 2010 Mar 12 doi: 10.1186/1471-2180-10-75.

DEVELOPMENT OF MODELS OF HUMAN MALIGNANT TUMORS FOR CELLULAR IMMUNOTHERAPY

© 2019 E. Y. Zlatnik*, A. Yu. Maksimov, A. S. Goncharova, N. S. Karnaukhov

*E-mail: elena-zlatnik@mail.ru, rnioi@list.ru

Federal Budget Institution Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Received: 13.03.2019. Accepted: 27.03.2019

Development of ectopic and orthotopic models of human malignant tumors in nude mice with consequent morphologic and immunologic studies was carried out. Morphologic compliancy of tumors having grown in mice to the initial ones was shown. Divergent immunologic changes were found in animals with ectopic and orthotopic tumors.

Key words: nude mice, models of human malignant tumors, lymphocytes

Authors:

Zlatnik E. Y., ✉ MD, Prof., Chief Researcher, Laboratory of Immunophenotyping of Tumors, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia. E-mail: elena-zlatnik@mail.ru, rnioi@list.ru;

Maksimov A. Yu., MD., Professor, Deputy General Director for Advanced Scientific Developments, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia;

Goncharova A. S., Ph D., Head of Experimental Laboratory Center, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia;

Karnaukhov N. S., Ph D., Head of Department of Pathological Anatomy, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia.