

МОДЕЛИ ПОДКОЖНОГО И ОРТОТОПИЧЕСКОГО КСЕНОГРАФТОВ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ ЧЕЛОВЕКА У МЫШЕЙ *NUDE* ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗДЕЙСТВИЙ, НАЦЕЛЕННЫХ НА РЕЦЕПТОР ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА

М.С. Воронцова¹, Т.А. Кармакова¹, Е.А. Плотникова¹, Н.Б. Морозова¹, М.А. Абакумов^{2,3},
Р.И. Якубовская¹, Б.Я. Алексеев¹

¹МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России;
Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 3;

²ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1;

³НИТУ «МИСЦ»; Россия, 119049 Москва, Ленинский пр-т, 4

Контакты: Татьяна Анатольевна Кармакова kalmar123@yandex.ru

Введение. Подходы, основанные на принципах таргетной терапии, рассматриваются как перспективное направление создания новых методов лечения, способных увеличить эффективность лечения больных раком мочевого пузыря (РМП).

Цель исследования — получение ортотопической модели РМП человека у мышей линии nude и обоснование ее пригодности для экспериментального изучения таргетных препаратов, нацеленных на рецептор эпидермального фактора роста (РЭФР).

Материалы и методы. Объектом исследования служили эктопические подкожные и ортотопические ксенографты РМП человека, полученные с использованием культивируемых клеток линий EJ и 5637. Рост ортотопических ксенографтов *in vivo* оценивали методом магнитно-резонансной томографии. Для исследования тканей опухолей использованы методы гистологического и иммуногистохимического анализа.

Результаты. Показано, что как эктопические, так и ортотопические ксенографты EJ и 5637 характеризуются высокой воспроизводимостью модели, хорошим кровоснабжением ткани, высоким уровнем экспрессии РЭФР и отличаются локализацией рецептора в опухолевых клетках. Прлиферация клеток EJ и 5637 в слизистой оболочке мочевого пузыря мышей при их внутримышечной имплантации преимущественно приводит к образованию мышечно-неинвазивной формы опухоли.

Заключение. Ксенографты EJ и 5637 у иммунодефицитных мышей могут быть использованы в качестве моделей РМП человека для изучения эффективности биотерапевтических воздействий, использующих в качестве мишени РЭФР.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, ксенографт опухоли, мыши nude, рецептор эпидермального фактора роста

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-31-40

SUBCUTANEOUS AND ORTHOTOPIC XENOGRAFT MODELS OF HUMAN BLADDER CARCINOMA IN *NUDE* MICE FOR EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR-TARGETED TREATMENT

M.S. Vorontsova¹, T.A. Karmakova¹, E.A. Plotnikova¹, N.B. Morozova¹, M.A. Abakumov^{2,3}, R.I. Yakubovskaya¹, B. Ya. Alexeev¹

¹P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute — Branch of the National Medical Research Center of Radiology,
Ministry of Health of Russia; 3 2nd Botkinskiy Proezd, Moscow 125284, Russia;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovitianova st., Moscow 117997, Russia;

³National University of Science and Technology "MISIS"; 4 Leninskiy Prospekt, Moscow 119094, Russia

Introduction. Approaches based on the principles of a targeted therapy are considered a promising strategy that is capable to improve the effectiveness of treatment for bladder cancer (BC) patients.

The purpose of the study was to establish an orthotopic xenograft model of human BC in mice and to prove its suitability for experimental examination of drugs targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR).

Materials and methods. The objects of the study were ectopic subcutaneous and orthotopic human BC xenografts established using EJ and 5637 human BC cell lines. The growth of orthotopic xenografts *in vivo* was assessed by magnetic resonance imaging. Tumor tissues were investigated using histological and immunohistochemical techniques.

Results. It was shown that EJ and 5637 xenografts exhibit a good reproducibility, a sufficient blood supply of the tumor tissues, a high level of EGFR expression, and different pattern of a subcellular receptor localization. Implantation and subsequent proliferation of human EJ or 5637 cells in the murine bladder mucosa presumably results in muscle-non-invasive tumor formation.

Conclusions. The EJ and 5637 xenograft models can be useful for investigation of the efficacy of EGFR-targeted biotherapeutic treatments.

Key words: bladder cancer, orthotopic xenograft tumor model, nude mice, epidermal growth factor receptor

Введение

Рак мочевого пузыря (РМП) — одна из наиболее часто встречающихся злокачественных опухолей. РМП характеризуется высокими темпами годового прироста заболеваемости и занимает одно из ведущих мест в структуре онкологической смертности в развитых странах мира, в том числе в России [1, 2]. Высокий риск рецидива опухоли после органосохраняющего лечения [3, 4], а также ограниченные возможности радикального лечения при местнораспространенных формах РМП [5–7] делают данное заболевание актуальной проблемой современной онкоурологии.

Прогресс на пути улучшения отдаленных результатов лечения больных злокачественными новообразованиями связывают с таргетными методами лечения [8]. Привлекательной мишенью для разработки различных вариантов таргетной терапии при РМП являются мембранные белки семейства рецепторов эпидермального фактора роста (РЭФР, ErbB) [9, 10]. Высокая экспрессия РЭФР (ErbB1) в клетках первичного РМП, по данным клинко-морфологических исследований, наблюдается в 74–86 % случаев, коррелирует с глубокой инвазией, низкой степенью дифференцировки и высокой пролиферативной активностью опухоли [11, 12]. Адыовантное применение при распространенных формах РМП моноклональных антител к РЭФР (цетуксимаб) или ингибиторов тирозинкиназы (гефитиниб, лапатиниб) не показало ожидаемой клинической эффективности [13–15]. Это стимулирует поиск причин резистентности РМП к данным видам терапии и путей ее преодоления, поиск новых препаратов и схем комбинированного лечения, а также разработку способов направленной доставки к клеткам РМП цитостатиков, фотосенсибилизаторов, диагностических и терапевтических радионуклидов с использованием РЭФР в качестве мишени [16–20].

Экспериментальные исследования *in vivo* чаще всего выполняются на моделях эктопических трансплантатов РМП человека, полученных подкожной инокуляцией культивируемых опухолевых клеток или имплантацией операционного материала иммунодефицитным мышам [21]. С учетом механизма противоопухолевого действия релевантность модели для оценки активности ингибиторов РЭФР-ассоциированных тирозинкиназ, как правило, подтверждают определением содержания рецептора в клетках методом вестерн-блота [22, 23], для тестирования воздействий на основе антител к РЭФР — дополняют характеристику модели иммуногистохимическим исследованием внутриклеточного распределения рецептора [18, 24].

Исследования РЭФР-направленных воздействий на ортотопических моделях ксенографтов РМП человека немногочисленны, хотя известно, что такая

модель позволяет в большей степени воспроизвести особенности микроокружения опухоли, которые могут влиять как на экспрессию молекулярной мишени, так и на ответ опухоли на воздействие. Опубликованные работы с использованием такой модели либо не содержат удовлетворительной характеристики гистологических особенностей ксенографтов [17, 22], либо представленные в них данные недостаточно информативны в отношении характера экспрессии рецептора-мишени в опухолевых клетках [16, 25, 26].

Целью настоящей работы стало получение модели ортотопического ксенографта РМП человека и обоснование ее пригодности для экспериментального и доклинического изучения препаратов, нацеленных на опухолевые клетки с высокой экспрессией РЭФР.

Материалы и методы

Культуры опухолевых клеток

В работе использованы клеточные линии карциномы мочевого пузыря человека EJ и 5637 (любезно предоставлены профессором А.С. Соболевым, лаборатория молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Института биологии гена РАН, Москва). Клетки культивировали во флаконах с площадью поверхности 25 или 75 см² (Costar, США) на среде DMEM (для культуры EJ) или RPMI-1640 (для культуры 5637) с добавлением 2 mM L-глутамин и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Среды и культуральные добавки получены от компании «ПанЭко» (Россия).

Животные

Мыши линии BALB/c *nu/nu* (*nude*), самки с массой тела 19–21 г (возраст 7–8 нед), получены из НПП «Питомник лабораторных животных» — филиала ФГБУН «Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН. Животных содержали в специализированном помещении вивария, в условиях повышенной температуры и влажности. Уход за животными, все экспериментальные процедуры и манипуляции выполнялись в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных [27].

Получение ксенографтов опухолей

Для имплантации мышам использовали клеточные линии, прошедшие от 3 до 7 пассажей культивирования. Клетки снимали с поверхности культуральных флаконов раствором Версена, отмывали в среде, не содержащей эмбриональную телячью сыворотку, подсчитывали количество жизнеспособных клеток в камере Горяева и на той же среде готовили клеточную суспензию для введения животным.

На этапе подбора количества вводимых клеток экспериментальные группы состояли из 4 мышей,

на этапе характеристики роста ксенографтов — из 5–8 мышей.

Для получения подкожного ксенографта суспензию опухолевых клеток в количестве 1×10^6 , 3×10^6 или 5×10^6 инокулировали мышам подкожно на правый бок в объеме 0,1 мл. Объем опухоли рассчитывали по формуле

$$V = d_1 \times d_2^2 \times 0,52,$$

где d_1 и d_2 — 2 взаимно перпендикулярных размера опухоли.

Перед процедурой внутривязерной инстилляции мышей анестезировали интраперитонеальным введением золазепама гидрохлорида («Золетил 100», 20 мг/кг) и ксилосина гидрохлорида («Ксилазин», 15 мг/кг) за 5 мин до начала манипуляций и фиксировали на препаровальном столике. Слизистую оболочку мочевого пузыря подвергали химическому повреждению по методике [28] путем введения через стерильный катетер, установленный в мочеиспускательный канал, 0,1 М раствора соляной кислоты с последующей его нейтрализацией 0,1 М раствора гидроксида натрия. После промывания полости мочевого пузыря стерильным физиологическим раствором в мочевой пузырь вводили 70 мкл суспензии, содержащей 1×10^6 , 3×10^6 или 5×10^6 опухолевых клеток. В течение 1 ч мышам время от времени переворачивали, а при признаках выхода из наркоза — освобождали от фиксации. Осмотр, оценку общего состояния и взвешивание животных после процедуры проводили ежедневно. Снижение массы тела мышам более чем на 20 % от исходного показателя служило показанием для выведения животных из опыта. Эвтаназию животных проводили парами эфира.

Магнитно-резонансная томография

Исследование проводилось на базе Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова (ЦКП «Медицинские и биотехнологические нанотехнологии»). Исследование выполнялось на магнитно-резонансном томографе ClinScan 7T 70/30 (Bruker Biospin, Германия) с постоянным магнитным полем 7 Тл (градиентная система BGA 12S/20) при газовой анестезии животных. Обработка результатов проводилась с использованием программного обеспечения SyngoMR 15.

Подготовка материала для гистологического и иммуногистохимического исследования

Образцы тканей, полученные при аутопсии животных, фиксировали в нейтральном забуференном 10 % формалине и после стандартной гистологической проводки заключали в парафин. Готовили серийные срезы тканей толщиной 4 мкм. Для гисто-

логического анализа срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Г&Э).

Иммуногистохимическое окрашивание

Для выявления экспрессии РЭФР в опухолевых клетках использовали моноклональное кроличье антитело D38B1 (Cell Signaling Technology, CA), для выявления клеток эндотелия — моноклональное крысиное антитело к CD34 мыши (BD PharmingenTM). Срезы окрашивали с использованием общепринятой техники непрямого иммунопероксидазного анализа. Для демаскировки антигена стекла с депарафинизированными срезами выдерживали в 0,1 М натрий-цитратном буфере (pH 6,0) при 95 °С в течение 20 мин. Система вторичных реагентов включала биотинилированные поликлональные антитела к иммуноглобулинам соответствующей видоспецифичности (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), конъюгат стрептавидина с пероксидазой конского хрена (Dako) и хромогенный субстрат Liquid DAB + Substrate Chromogen System (Dako). На контрольные срезы вместо первичных антител наносили неспецифические иммуноглобулины кролика или крысы (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). После завершения реакции клетки и срезы докрашивали гематоксилином и заключали в канадский бальзам. Микропрепараты анализировали под микроскопом Olympus BX51 (Olympus Optical Co, Япония), оснащенным системой документирования изображений.

Результаты

Подкожные ксенографты РМП человека EJ и 5637 у мышам *nude*

На 1-м этапе выполнена оценка способности клеток EJ и 5637 к росту *in vivo* при подкожной инокуляции бестимусным мышам и исследована экспрессия РЭФР в клетках подкожных ксенографтов.

Скорость пролиферации клеток EJ, 5637 при культивировании *in vitro* была сходной (по результатам МТТ-теста, данные не представлены), однако при подкожной инокуляции мышам *nude* клетки 5637 отличались более агрессивным биологическим поведением. Так, 100 % выход опухолей, т. е. образование подкожных ксенографтов у всех мышам в экспериментальной группе, при использовании клеток линии EJ достигался при инокуляции животным опухолевого материала в количестве не менее 3×10^6 клеток, образование подкожных ксенографтов при использовании клеток линии 5637 — в количестве 1×10^6 клеток и более. Скорость увеличения объема опухоли 5637 значительно опережала скорость роста опухоли EJ. Через 21 день после инокуляции клеток EJ в количестве 3×10^6 размер подкожных образований варьировал от 100 до 250 мм³, при инокуляции того же количества клеток 5637 — от 220 до 450 мм³ (рис. 1).

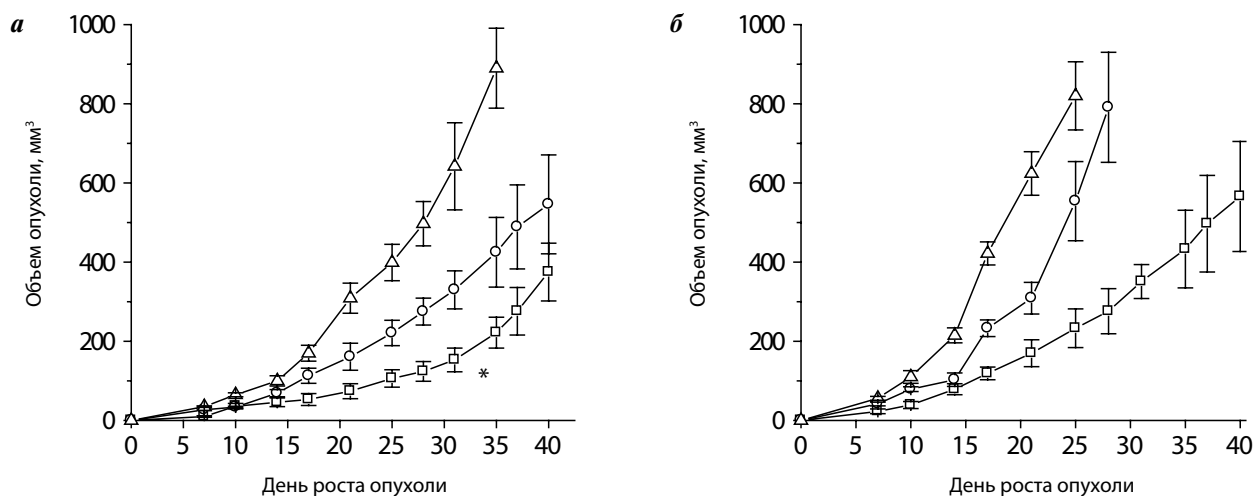


Рис. 1. Кривые роста подкожных ксенографтов рака мочевого пузыря человека EJ (а) и 5637 (б) у мышей *nude* в зависимости от количества инокулируемых клеток: 1×10^6 (квадратные символы), 3×10^6 (круглые символы), 5×10^6 (треугольные символы). В группах — по 5 животных; в группе мышей с привитыми клетками EJ в количестве 1×10^6 (отмечено звездочкой) выход опухолей зафиксирован у 3 из 5 животных. Размеры опухолей (объем, мм³) представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего

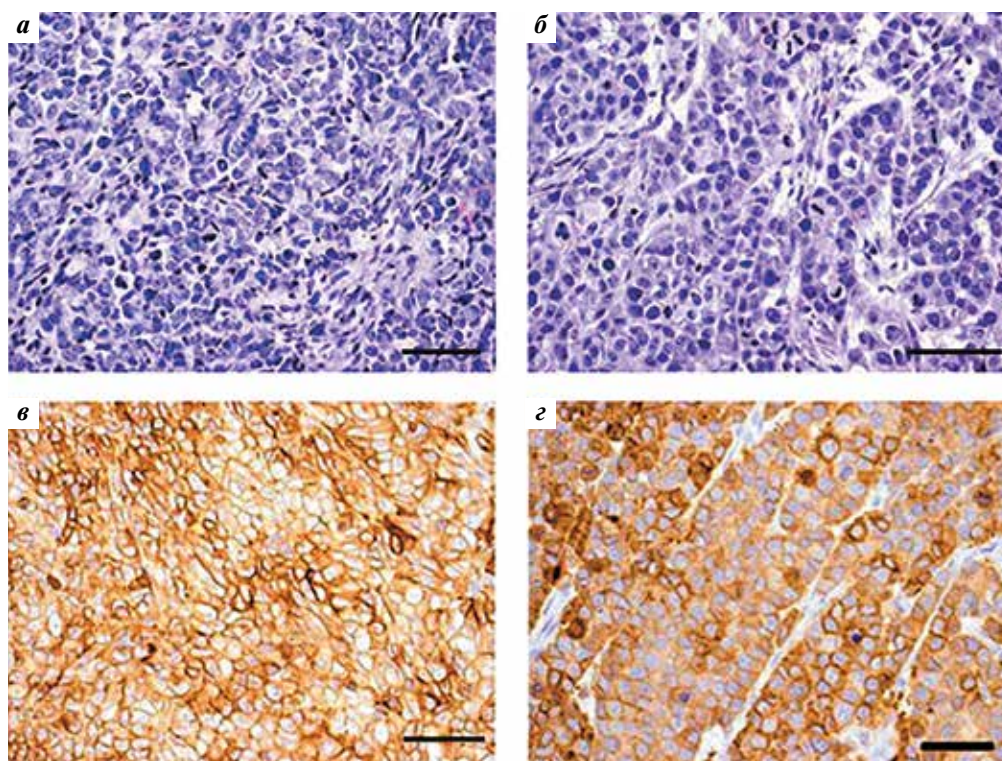


Рис. 2. Гистологические препараты подкожных ксенографтов рака мочевого пузыря человека EJ (а, в) и 5637 (б, г) у мышей *nude*; 21-й день после процедуры трансплантации опухолевых клеток. Микрофотографии парафиновых срезов тканей, фиксированных формалином (увеличение $\times 200$; отметка шкалы — 100 мкм) а, в — общая морфологическая картина, Г&Э; б, г — экспрессия рецептора эпидермального фактора роста в опухолевых клетках, иммунопероксидазная реакция с антителом D38B1, докрасивание гематоксилином

По результатам гистологического исследования подкожные ксенографты опухолей EJ и 5637 имели солидное строение, морфологически соответствующее низкодифференцированному новообразованию. В ткани обеих опухолей определялось большое количество митозов. Опухоли EJ отличались плеоморф-

ными клетками, тесно расположенными в тонкой хаотичной стромальной сети (рис. 2а). Клетки опухоли 5637 были более мономорфны и образовывали разделенные прослойками соединительной ткани островки, которые особенно четко прослеживались по периферии роста опухолей (рис. 2б). На 21-й день

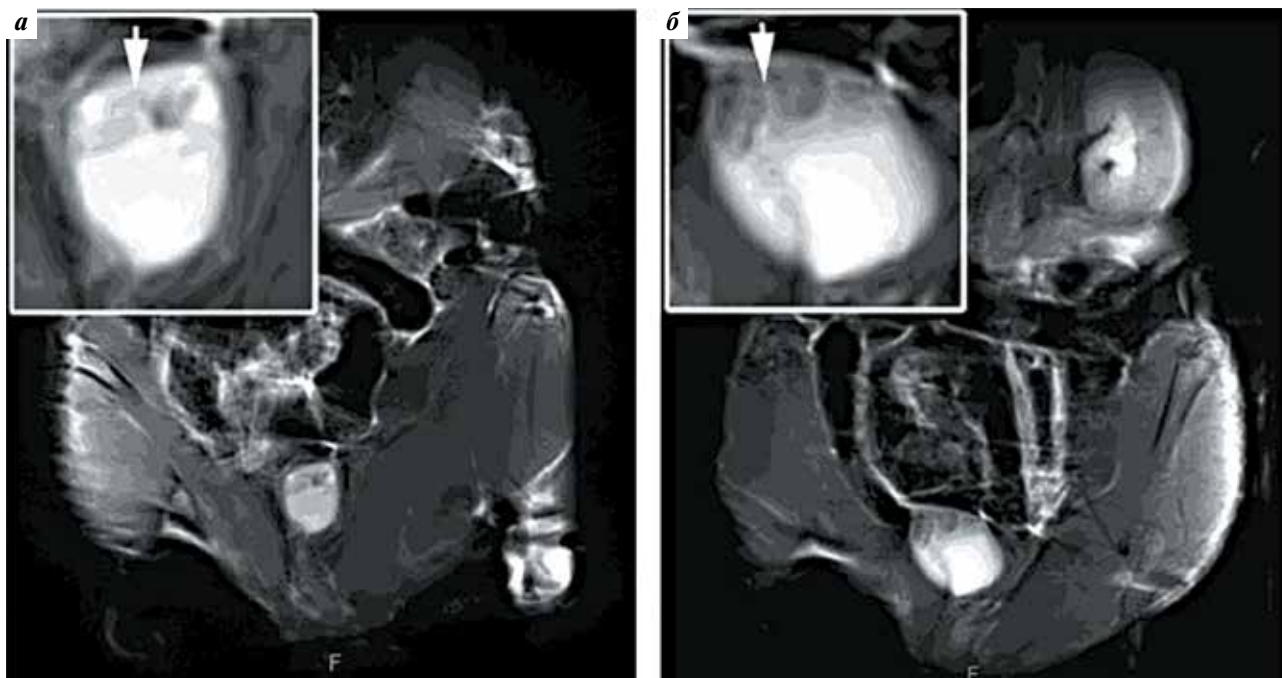


Рис. 3. МРТ-изображения нижней части тела мышей *nude* с ортотопическим ксенографтом рака мочевого пузыря человека EJ (а) и 5637 (б) на 20-й день после процедуры трансплантации опухолевых клеток, фронтальная проекция. На врезках — увеличенное изображение мочевого пузыря; расположение опухолей указано стрелками

роста в ткани опухоли 5637 обнаружены только минимальные фокусы дегенерации, в ткани опухоли EJ признаков некроза при гистологическом исследовании в этот срок не наблюдалось.

По результатам оценки интенсивности иммуногистохимической реакции с анти-РЭФР антителом клетки ксенографтов EJ и 5637 слабо различались по общему уровню экспрессии РЭФР. При этом в клетках опухоли EJ наряду с окрашиванием цитоплазмы наблюдалось преимущественное окрашивание поверхностной мембраны (рис. 2в), а в различных участках ткани опухолевого образования картина иммуногистохимического окрашивания в целом была сходной. В клетках опухоли 5637 преобладала цитоплазматическая локализация РЭФР (рис. 2г), мембранное окрашивание можно было наблюдать в клетках некоторых структур, располагающихся по периферии опухолевого узла.

Ортотопические ксенографты рака мочевого пузыря человека EJ и 5637 у мышей *nude*

Отработку условий ортотопической трансплантации клеток РМП человека выполняли, варьируя количество клеток, вводимых в мочевой пузырь мышей.

Введение 1×10^6 клеток EJ или 5637 удовлетворительно переносилось животными. Однако на 20-е сутки после процедуры инстилляций признаки опухолевого роста в стенке мочевого пузыря были обнаружены только у 2 из 4 мышей в каждой группе и только по результатам гистологического исследования.

При введении мышам 5×10^6 клеток EJ или 5637 в течение 14 сут после воздействия наблюдалась гибель животных. При вскрытии павших мышей установлено, что причиной гибели в обеих группах стало нарушение функции почек, которое развивалось как следствие перекрытия мочеточников опухолью, прорастающей стенку органа или заполняющей полость мочевого пузыря.

Оптимальным признано внутривезикулярное введение клеток EJ или 5637 в количестве 3×10^6 на мышь. По совокупным результатам независимо проведенных экспериментов выживаемость мышей, которым прививали клетки EJ, на 24-е сутки после воздействия составила 92 % (11 из 12 животных), выживаемость мышей, которым прививали клетки 5637 — 83 % (10 из 12 животных). На данный срок при вскрытии мышей в мочевом пузыре обнаруживали утолщение складок, экзофитные выросты различного числа и размера либо полное заполнение опухолью полости органа.

Анализ результатов исследования методом магнитно-резонансной томографии, полученных у мышей на 20-й день после инстилляций опухолевых клеток, показал возможность прижизненного мониторинга роста ксенографтов. МРТ-изображения, представленные на рис. 3, демонстрируют пристеночные образования, выступающие в полость мочевого пузыря мышей, соответствующие растущей опухоли. Отмечено, что ксенографты, как правило, локализовались в области верхушки мочевого пузыря,

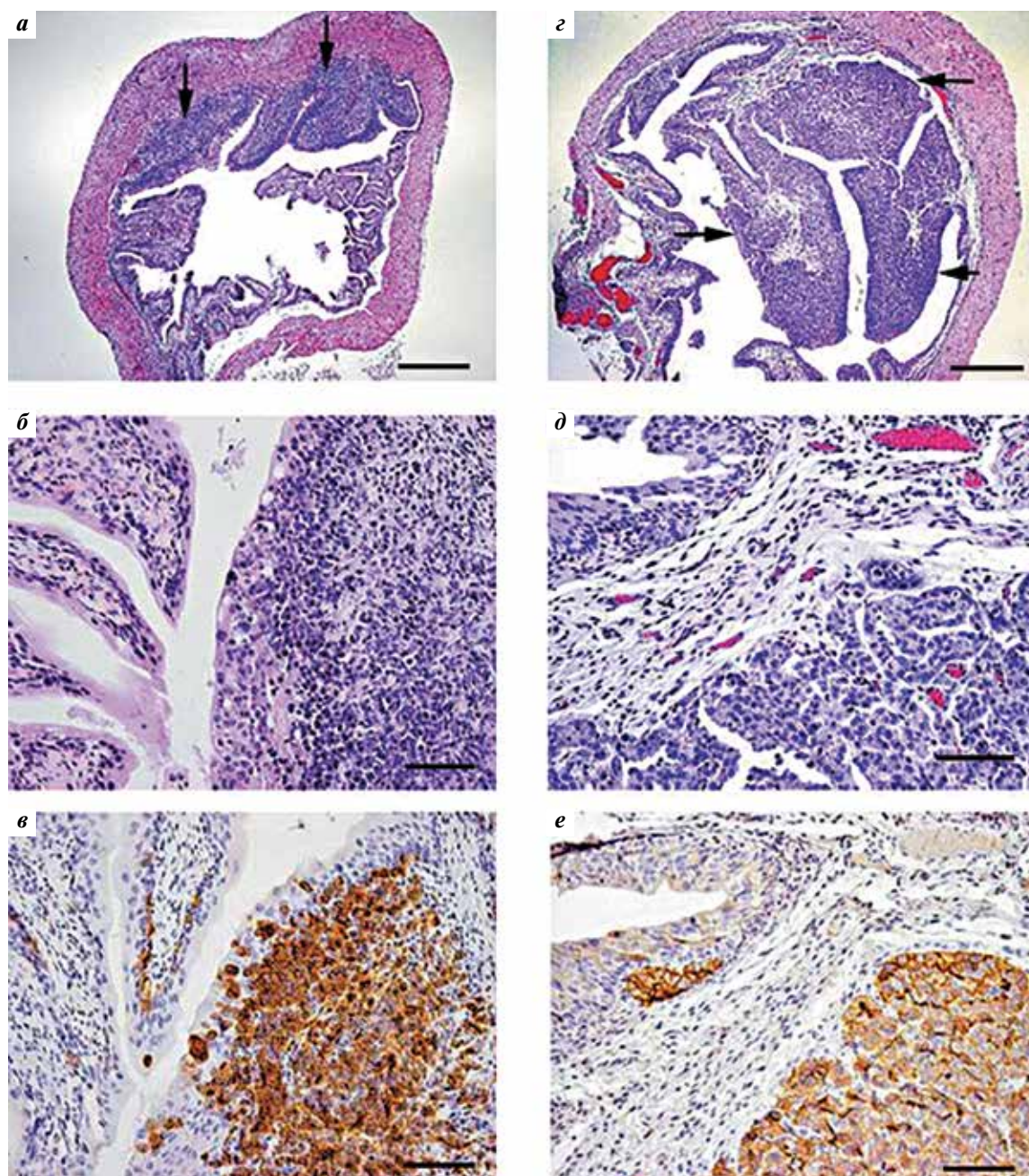


Рис. 4. Гистологические препараты мочевого пузыря мышей nude с ортотопическим ксенографтом рака мочевого пузыря человека EJ (а–в) и 5637 (г–е); 24-й день после процедуры трансплантации опухолевых клеток. Микрофотографии парафиновых срезов тканей, фиксированных формалином: а, г – общий вид опухолевых образований, растущих в слизистой оболочке мочевого пузыря (указаны стрелками), Г&Э (увеличение $\times 50$; отметка шкалы – 500 мкм); б, д – морфологическая картина роста солидного ксенографта под слоем уротелия, Г&Э (увеличение $\times 200$); в, е – серийные срезы тех же участков ткани, окрашенных иммунопероксидазной реакцией с анти-РЭФР антителом D38B1, докрасивание гематоксилином (увеличение $\times 200$; отметка шкалы – 200 мкм)

что обусловлено положением тела наркотизированного животного во время процедуры.

Гистологическое исследование подтвердило наличие опухолевого роста в мочевом пузыре у всех выживших животных. Репрезентативные микрофотографии парафиновых срезов мочевого пузыря животных-опухоленосителей представлены на рис. 4а, г.

У большинства животных рост опухолей EJ и 5637, независимо от их размера, был ограничен слизистой оболочкой, т. е. уровень поражения стенки мочевого пузыря опухолью соответствовал стадии T1. Однако у 3 из 12 мышей с ксенографтами EJ на поздний срок наблюдения выявлены признаки начала инвазии опухоли в мышечный слой стенки мочевого пузыря.

По результатам иммуногистохимического окрашивания тканей характер экспрессии РЭФР в клетках ортотопических ксенографтов EJ и 5637 в целом был сходен с тем, что наблюдалось при исследовании подкожных опухолевых образований (рис. 4в, е). При этом отмечено, что в клетках ортотопического ксенографта EJ выраженность цитоплазматического компонента окрашивания была существенно выше, чем в клетках подкожно растущих опухолей. Как следствие этого, общая интенсивность окрашивания ортотопических ксенографтов EJ во всех исследованных случаях была существенно выше, чем интенсивность окрашивания ортотопических ксенографтов 5637.

Для того чтобы проследить динамику формирования и роста имплантированных опухолевых клеток в стенке мочевого пузыря и оценить оптимальное время начала потенциального лечения, на модели ксенографта EJ проведено гистологическое исследование мочевого пузыря на различные сроки после процедуры внутривезикулярной инстиляции клеток (4, 7, 10 и 14-е сутки). Метод иммуногистохимического

окрашивания использован для оценки характера экспрессии РЭФР и распределения сосудов в образцах удаленных тканей.

Было установлено, что регенерация уротелия у мышей *nude* после его химического повреждения происходит сравнительно быстро. На фоне полной реэпителизации покрова мочевого пузыря на 4–7-й день после внутривезикулярного введения клеток EJ РЭФР-положительные (РЭФР+) клетки, как правило, располагались под уротелием (рис. 5а). Возможно, что выживанию опухолевых клеток, проникших под базальную мембрану, способствует хорошо развитая сеть CD34⁺ кровеносных капилляров, которая в стенке интактного мочевого пузыря протекает непосредственно под базальной мембраной (рис. 6а).

В дальнейшем, до 14-го дня наблюдения, в стенке мочевого пузыря можно было проследить распространение опухолевых клеток под слоем эпителия в собственной пластинке слизистой оболочки (рис. 5б). Увеличение количества пролиферирующих клеток приводило к утолщению складок слизистой оболочки,

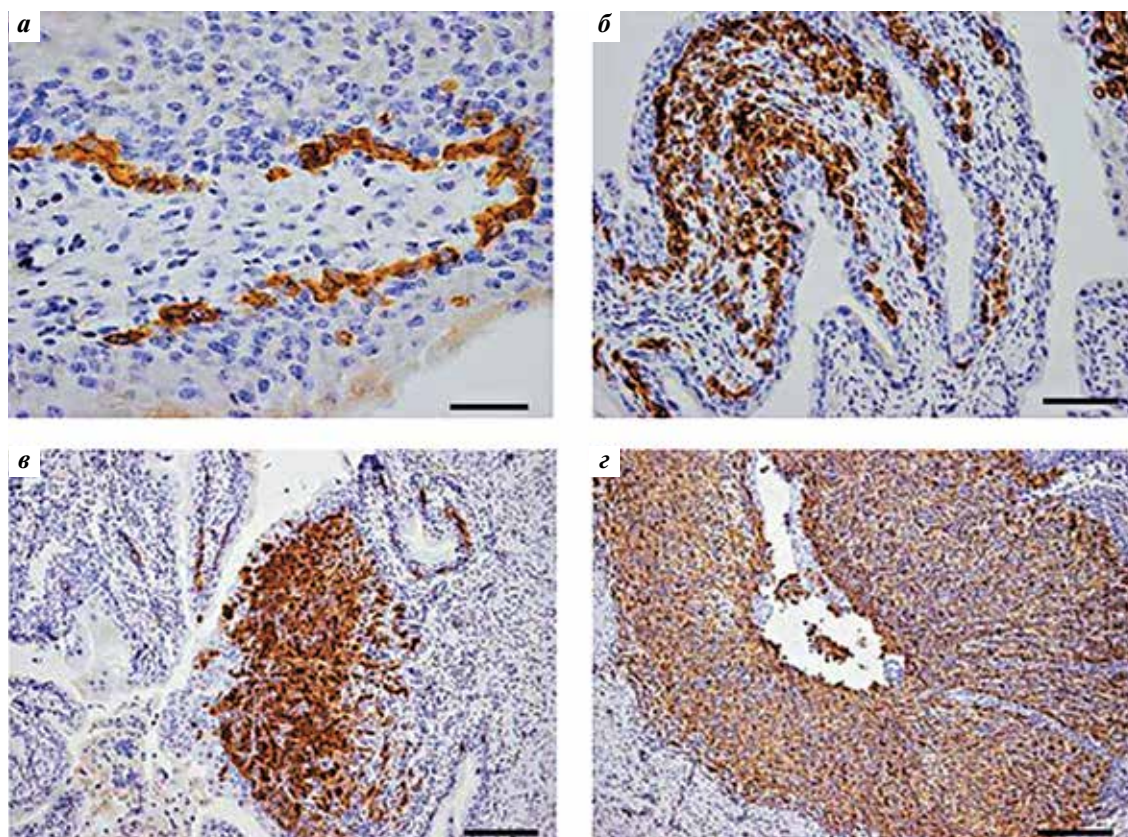


Рис. 5. Гистологические препараты мочевого пузыря мышей *nude* с ортотопическим ксенографтом рака мочевого пузыря человека EJ, демонстрирующие различные этапы формирования опухоли. Микрофотографии парафиновых срезов тканей, фиксированных формалином и окрашенных иммунопероксидазной реакцией с анти-РЭФР антителом D38B1 (докрашивание гематоксилином): а — РЭФР+ депозиты опухолевых клеток в подэпителиальном слое собственной пластинки слизистой оболочки мочевого пузыря (7-й день после имплантации опухолевых клеток; увеличение $\times 400$, отметка шкалы — 50 мкм); б, в — пролиферация опухолевых клеток в толще подслизистого слоя (10-й день; увеличение $\times 200$ и $\times 100$ соответственно; отметка шкалы — 100 и 200 мкм соответственно); г — полость мочевого пузыря заполнена опухолью (24-й день; увеличение $\times 100$, отметка шкалы — 200 мкм)

формированию экзофитных выростов (рис. 5в), которые со временем сливались в единый массив, заполняющий полость органа (рис. 5г).

Оптимальным сроком начала терапевтического воздействия у животных-опухоленосителей с ксенографтами EJ или 5637, с учетом динамики роста опухолевых образований, может считаться интервал до 7 дней после процедуры инстилляции опухолевых клеток.

Количество и линейная протяженность депозитов опухолевых клеток варьировали у индивидуальных животных. При множественных фокусах имплантации рост опухолевых зачатков в разных участках слизистой оболочки мочевого пузыря был неодинаковым. Можно предположить, что вариативность числа опухолевых зачатков и скорость роста ксенографтов у животных-опухоленосителей определяются количеством опухолевых клеток, успешно осуществивших имплантацию в данном участке поврежденной слизистой оболочки.

Исследование распределения микрососудов в опухолевой ткани показало, что в ткани ксенографта клетки эндотелия мыши образуют насыщенную капиллярную сеть, которая пронизывает всю толщу опухоли (рис. 6б). Таким образом, ортотопическая модель опухоли EJ наглядно демонстрирует способность ксеногенных клеток привлекать ресурсы организма-хозяина для формирования адекватного кровоснабжения растущей опухолевой массы.

На протяжении всего времени роста, до поздних его этапов, когда опухоли достигали значительных размеров, опухолевые клетки ксенографтов EJ и 5637, в отличие от естественно образующихся опухолей мочевого пузыря, не контактировали непосредственно с содержимым мочевого пузыря мышей и были отделены от полости органа слоем регенерировавшего уротелия. Необходимо отметить, что при внутрипузырном введении противоопухолевых лекарственных средств это обстоятельство может существенно ограничивать доступ активного компонента лекарства к опухолевым клеткам, особенно при воздействии на ранние сроки после инокуляции опухоли.

Особого внимания заслуживают различия внутриклеточной локализации РЭФР в клетках опухолей EJ и 5637, выявленные при иммуногистохимическом окрашивании тканей ксенографтов. По данным клинико-морфологических исследований, при некоторых злокачественных новообразованиях — раке поджелудочной железы, раке почки, немелкоклеточном раке легкого — тип субклеточного распределения РЭФР в опухоли может служить независимым фактором клинического прогноза [29–32]. По существующим представлениям преимущественная внутриклеточная локализация РЭФР может определяться активностью процессов интернализации рецептора,

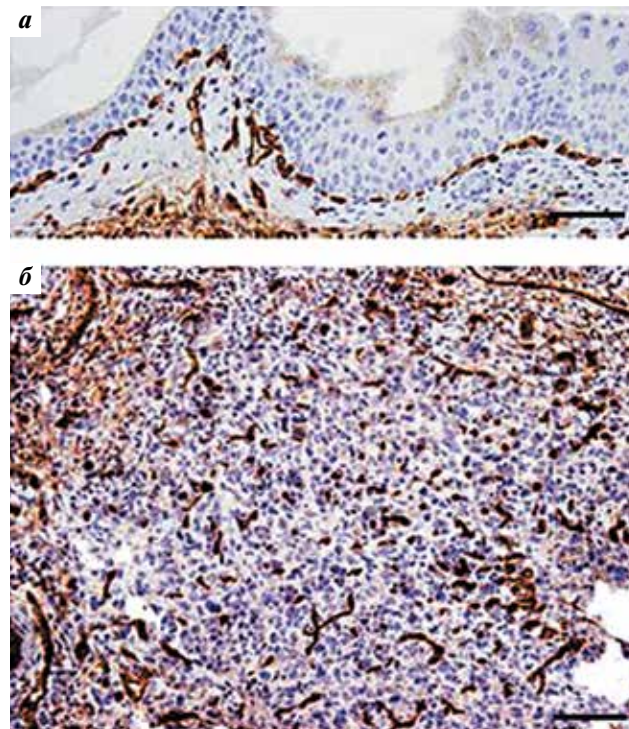


Рис. 6. Расположение кровеносных микрососудов в стенке мочевого пузыря intactного животного (а) и в ткани ортотопического ксенографта рака мочевого пузыря человека EJ (б) у мышей *nude*. Микрофотографии парафиновых срезов тканей, окрашенных иммунопероксидазной реакцией с антителом к CD34 (докрашивание гематоксилином; увеличение $\times 200$; отметка шкалы — 100 мкм): а — в нормальном мочевом пузыре CD34⁺ клетки эндотелия располагаются в подэпителиальном слое; б — в ткани ксенографта клетки эндотелия мыши образуют разветвленную сосудистую сеть

которая инициируется взаимодействием с лигандами, может зависеть от организации внутриклеточного транспорта комплекса рецептор — лиганд, а также от специфики взаимодействия внутриклеточных сигнальных путей [33]. Совокупность этих процессов не только способна определять биологические особенности роста опухоли, но и может влиять на реализацию механизмов лечебного воздействия. Так, например, ожидаемыми являются результаты клинического исследования, показавшего, что у больных с распространенным немелкоклеточным раком легкого лечебный эффект химиотерапии в сочетании с цетуксимабом более выражен в случаях с высоким уровнем экспрессии РЭФР на поверхности опухолевых клеток [34].

Заключение

С использованием клеточных линий EJ и 5637 нами получены ксенографты РМП человека у мышей *nude*, которые характеризуются хорошей воспроизводимостью роста и высоким уровнем экспрессии РЭФР. Хорошее кровоснабжение ткани подкожных и ортотопических ксенографтов РМП указывает на

потенциально высокую доступность опухолевых клеток для системно вводимых лекарственных средств. Рост ортотопических вариантов ксенографтов в подслизистом слое мочевого пузыря накладывает определенные ограничения на их релевантность как моделей для изучения цитотоксических лекарственных средств, для которых предполагается внутривезикулярный путь введения. Особенности локализации РЭФР в клетках ксенографтов EJ и 5637, выявленные в дан-

ной работе, могут служить критерием при выборе экспериментальной модели, а также дополнительным фактором анализа при интерпретации результатов экспериментального воздействия. Ксенографты EJ и 5637 могут быть полезны для разработки новых способов эффективного лечения РМП человека, в том числе, при экспериментальном изучении биотерапевтических воздействий, использующих РЭФР в качестве мишени.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Злокачественные новообразования в России в 2015 г. (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. 250 с. [Malignant tumors in Russia in 2015 (morbidity and mortality). Ed. A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: Hertsen MORI, branch of NMRRС МН RF. 2017. 250 p. (In Russ.)].
2. Torre L.A., Siegel R.L., Ward E.M., Jemal A. Global cancer incidence and mortality rates and trends — an update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016;25:16–27. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0578. PMID: 26667886.
3. Алексеев Б.Я., Андреева Ю.Ю., Новикова И.В. Факторы прогноза выживаемости у больных немусечно-инвазивным раком мочевого пузыря. *Онкоурология* 2013;9(1):34–42. DOI: <http://dx.doi.org/10.17650/1726-9776-2013-9-1-34-42>. [Alekseev B.Ya., Andreeva Yu.Yu., Novikova I.V. Factors predicting survival in patients with non-muscle invasive bladder cancer. *Onkourologiya = Oncourology* 2013;9(1):34–42 (In Russ.)].
4. Chou R., Selph S., Buckley D.I. et al. Intravesical therapy for the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Urol* 2017;197(5):1189–99. DOI: 10.1016/j.juro.2016.12.090. PMID: 28027868.
5. Комяков Б.К., Гулиев Б.Г., Сергеев А.В. и др. Выживаемость больных раком мочевого пузыря после радикальной цистэктомии. *Онкоурология* 2016;12(1):29–35. DOI: <http://dx.doi.org/10.17650/1726-9776-2016-12-1-29-35>. [Komyakov B.K., Guliev B.G., Sergeev A.V. Survival of patients with bladder cancer after radical cystectomy. *Onkourologiya =*
6. Oncourology 2016;12(1):29–35 (In Russ.)].
7. Lobo N., Mount C., Omar K. et al. Landmarks in the treatment of muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol* 2017;14(9):565–74. DOI: 10.1038/nrurol.2017.82. PMID: 28675174.
8. Sanli O., Dobruch J., Knowles M.A. et al. Bladder cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:17022. DOI: 10.1038/nrdp.2017.22. PMID: 28406148.
9. Ghosh M., Brancato S.J., Agarwal P.K., Apolo A.B. Targeted therapies in urothelial carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2014;26(3):305–20. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000064. PMID: 24685646.
10. Weintraub M.D., Vourganti S., Li Q. et al. Targeting the epidermal growth factor receptor in bladder cancer. *J Carcinogene Mutagene* 2013;4:143. DOI: 10.4172/2157–2518.1000143.
11. Mooso B.A., Vinnal R.L., Mudryj M. et al. The role of EGFR family inhibitors in muscle invasive bladder cancer: a review of clinical data and molecular evidence. *J Urol* 2015;193(1):19–29. DOI: 10.1016/j.juro.2014.07.121. PMID: 25158272.
12. Chaux A., Cohen J.S., Schultz L. et al. High epidermal growth factor receptor immunohistochemical expression in urothelial carcinoma of the bladder is not associated with EGFR mutations in exons 19 and 21: a study using formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. *Hum. Pathol* 2012;43(10):1590–5. DOI: 10.1016/j.humpath.2011.11.016. PMID: 22406363.
13. Carlsson J., Wester K., De La Torre M. et al. EGFR-expression in primary urinary bladder cancer and corresponding metastases and the relation to HER2-expression. On the possibility to target these receptors with radionuclides. *Radiol Oncol* 2015;49(1):50–8. DOI: 0.2478/raon-2014–0015. PMID: 25810701.
14. Hussain M., Daignault S., Agarwal N. et al. A randomized phase 2 trial of gemcitabine/cisplatin with or without cetuximab in patients with advanced urothelial carcinoma. *Cancer* 2014;120(17):2684–93. DOI: 10.1002/cncr.28767. PMID: 24802654.
15. Miller K., Morant R., Stenzl A. et al. A phase II study of the Central European Society of Anticancer-Drug Research (CESAR) Group: Results of an open-label study of gemcitabine plus cisplatin with or without concomitant or sequential gefitinib in patients with advanced or metastatic transitional cell carcinoma of the urothelium. *Urol Int* 2016;96(1):5–13. DOI: 10.1159/000381589. PMID: 26068576.
16. Powles T., Huddart R.A., Elliott T. et al. Phase III, double-blind, randomized trial that compared maintenance lapatinib versus placebo after first-line chemotherapy in patients with human epidermal growth factor receptor 1/2-positive metastatic bladder cancer. *J Clin Oncol* 2017;35(1):48–55. DOI: 10.1200/JCO.2015.66.3468. PMID: 28034079.
17. Pfost B., Seidl C., Autenrieth M. et al. Intravesical alpha-radioimmunotherapy with 213Bi-anti-EGFR-mAb defeats human bladder carcinoma in xenografted nude mice. *J Nucl Med* 2009;50(10):1700–8. DOI: 10.2967/jnumed.109.065961. PMID: 19793735.
18. Yang X., Kessler E., Su L.J. et al. Diphtheria toxin-epidermal growth factor fusion protein DAB389EGF for the treatment of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19(1):148–57. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1258. PMID: 23172881.
19. Grivas P.D., Day K.C., Karatsinides A. et al. Evaluation of the antitumor activity of dacomitinib in models of human

- bladder cancer. *Mol Med* 2013;19:367–76. DOI: 10.2119/molmed.2013.00108. PMID: 24166682.
19. Tsai Y.C., Ho P.Y., Tzen K.Y. et al. Synergistic blockade of EGFR and HER2 by new-generation EGFR tyrosine kinase inhibitor enhances radiation effect in bladder cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2015;14(3):810–20. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0951. PMID: 25589492.
 20. Railkar R., Krane L.S., Li Q.Q. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) targeted photoimmunotherapy (PIT) for the treatment of EGFR expressing bladder cancer. *Mol Cancer Ther* 2017;16(10):2201–14. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0924. PMID: 28619755.
 21. Arantes-Rodrigues R., Colaço A., Pinto-Leite R. et al. *In vitro* and *in vivo* experimental models as tools to investigate the efficacy of anti-neoplastic drugs on urinary bladder cancer. *Anticancer Res* 2013;33(4):1273–96. PMID: 23564765.
 22. Dominguez-Escrig J.L., Kelly J.D., Neal D.E. et al. Evaluation of the therapeutic potential of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib in preclinical models of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(14):4874–84. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0034. PMID: 15269164.
 23. Mansure J.J., Nassim R., Chevalier S. et al. A novel mechanism of PPAR gamma induction via EGFR signalling constitutes rational for combination therapy in bladder cancer. *PLoS One* 2013;8(2):e55997. DOI: 10.1371/journal.pone.0055997. PMID: 23409107.
 24. Bhuvanewari R., Gan Y.Y., Soo K.C., Olivo M. Targeting EGFR with photodynamic therapy in combination with Erbitux enhances *in vivo* bladder tumor response. *Mol Cancer* 2009;8:94. DOI: 10.1186/1476-4598-8-94. PMID: 19878607.
 25. Wu M.L., Li H., Yu L.J. et al. Short-term resveratrol exposure causes *in vitro* and *in vivo* growth inhibition and apoptosis of bladder cancer cells. *PLoS One* 2014;9(2):e89806. DOI: 10.1371/journal.pone.0089806. PMID: 24587049.
 26. Fazel J., Rötzer S., Seidl C. et al. Fractionated intravesical radio-immunotherapy with (213) Bi-anti-EGFR-MAb is effective without toxic side-effects in a nude mouse model of advanced human bladder carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2015;16(10):1526–34. DOI: 10.1080/15384047.2015.1071735. PMID: 26177233.
 27. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М.: Профиль-2С, 2010. 358 с. [Guidelines for laboratory animals and alternative models in biomedical research. Ed. N.N. Karkishchenko, S.V. Grachev. Moscow: Profil-2S Ltd, 2010. 358 p. (In Russ.)].
 28. Chan E., Patel A., Heston W., Larchian W. Mouse orthotopic models for bladder cancer research. *BJU Int* 2009;104(9):1286–91. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2009.08577.x. PMID: 19388981.
 29. Einama T., Ueda S., Tsuda H. et al. Membranous and cytoplasmic expression of epidermal growth factor receptor in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Exp Ther Med* 2012;3:931–36. DOI: 10.3892/etm.2012.518. PMID: 22969995.
 30. Ueda S., Ogata S., Tsuda H. et al. The correlation between cytoplasmic overexpression of epidermal growth factor receptor and tumor aggressiveness: poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2004;29:e1–8. PMID: 15211117.
 31. Kankaya D., Kiremitci S., Tulunay O., Baltaci S. Prognostic impact of epidermal growth factor receptor on clear cell renal cell carcinoma: Does it change with different expression patterns? *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 2016;59:35–40. DOI: 10.4103/0377-4929.178219. PMID: 26960632.
 32. Kallio J.P., Hirvikoski P., Helin H. et al. Membranous location of EGFR immunostaining is associated with good prognosis in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003;89:1266–9. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601241. PMID: 14520458.
 33. Tomas A., Futter C.E., Eden E.R. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol* 2014;24(1):26–34. DOI: 10.1016/j.tcb.2013.11.002. PMID: 24295852.
 34. Pirker R., Pereira J.R., von Pawel J. et al. EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *The Lancet Oncology*. 2012;13:33–42. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70318-7. PMID: 22056021.