

ИММУНОДЕФИЦИТНЫЕ МЫШИ BALB/C NUDE И МОДЕЛИРОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Е. М. Трещалина

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Елена Михайловна Трещалина treshalina@yandex.ru

Получение доклинических моделей злокачественного роста в виде различных ксенографтов (гетеротрансплантатов), как правило подкожных, является наиболее важной областью использования nude-мышей в онкологии. В обзорной работе описаны характеристики полученных из Buffalo (США) и интродуцированных в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России Balb/c nude-мышей и систематизированы возможности их применения. Приведены различные варианты «пациентоподобных» моделей опухолевого роста, позволяющих персонализировать прогноз эффективности отобранных воздействий для конкретного пациента. Детализированы особенности моделирования метастазов различных опухолей человека: рака кишечника, поджелудочной железы, пищевода, легкого, молочной и предстательной желез, яичка и яичников, опухолей головы и шеи. Дана характеристика ортотопической трансплантации (модель MetaMouse) и экспериментальное подтверждение ценности гипотезы Педжета «seed and soil», постулирующей сопряженное участие в процессе метастазирования клеточного и тканевого компонентов опухоли. Описано применение подкожных ксенографтов в качестве контрольных линий клеток при изучении онкогенных потенций различных препаратов, рекомендованных для клеточной иммунотерапии человека. Приведены примеры и основная тематическая литература последних лет.

Ключевые слова: иммунодефицитные мыши, моделирование опухолевого роста, доклинические исследования

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-6-13

IMMUNODEFICIENT MICE BALB/C NUDE AND MODELING OF VARIOUS TYPES OF TUMOR GROWTH FOR PRECLINICAL STUDIES

H. M. Treshalina

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow 115478, Russia

Obtaining preclinical models of malignant growth in a variety of xenografts (heterotransplantation), usually the subcutaneous, is the most important area for the use of nude mice in oncology. In a review paper describes the characteristics of Balb/c nude mice obtained from Buffalo (USA) and introduced to the Federal State Budgetary Scientific Institution “N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Russian Ministry of Health of the Russian Federation and systematized their application. There are various variants «patientology» models of tumor growth, allowing you to personalize the forecast performance of selected impacts for a particular patient. Detailed modeling of metastases of various human cancers: colon cancer, pancreas, esophagus, lung, breast and prostate glands, testicles and ovaries, tumors of the head and neck. The characteristic of orthotopic (“MetaMouse” model) and experimental confirmation of the value of the hypothesis of Paget’s “seed and soil”, postulating a paired part of the process of metastasis of cell and tissue components of the tumor. Describes the use of the subcutaneous xenografts as control cell lines in the study of oncogenic potencies of the various drugs that are recommended for cellular immunotherapy of human. Examples and main thematic literature in recent years.

Key words: immunodeficient mice, tumor growth modeling, preclinical studies

Основные характеристики nude-мышей

В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России (НМИЦ онкологии) разведение и использование гибридных иммунодефицитных Balb/c nude- и bg/bgj nude-мышей с отсутствием трансплантационного иммунитета стартовало в 1974 г. после предоставления из NCI (Bethesda, США) семьи соответствующих

особей. В настоящее время разведение этих мышей на конвенциональном уровне поддерживается в специализированном отсеке под контролем различных показателей качества жизни, в том числе основного – устойчивой динамики массы тела (см. таблицу и рисунок) [1]:

- CAnN. Cg-Foxn1nu/Crl, полученные впервые в филиале Charls River Lab. (CRL, Япония) путем

скрещивания и обратного скрещивания между Balb/cABom-nu и Balb/cAnNCrj-nu. Беременные самки Balb/cAnNCrj-nu получены из CRL в 1985 г. Эти мыши инбредные, генетический мониторинг подтверждает, что это Balb/c nude. У мышей отсутствует тимус и имеется дефицит Т-клеток. Гомозиготные особи лысые, цвет кожи непигментированный, гетерозиготные особи — волосатые, альбиносы;

- **bg/bgj nude**, полученные в НМИЦ онкологии на основе гибридов nu/nu × dgj/bgj и инбредных иммунокомпетентных мышей линии C57BL. Эти мыши инбредные, генетический мониторинг подтверждает, что это bg/bgj nude. У мышей отсутствует тимус и имеется дефицит Т-клеток. Гомозиготные особи лысые, цвет кожи непигментированный, гетерозиготные особи — волосатые, рыжие.

Характеристики иммунодефицитных мышей (самцы/самки 4–10-недельного возраста)

Линия	Шерсть	Т-клетки	В-клетки	НК-клетки
Balb/c nude CAnN. Cg-oxn1nu/Crl	—	—	+	+
bg/bgj nude				

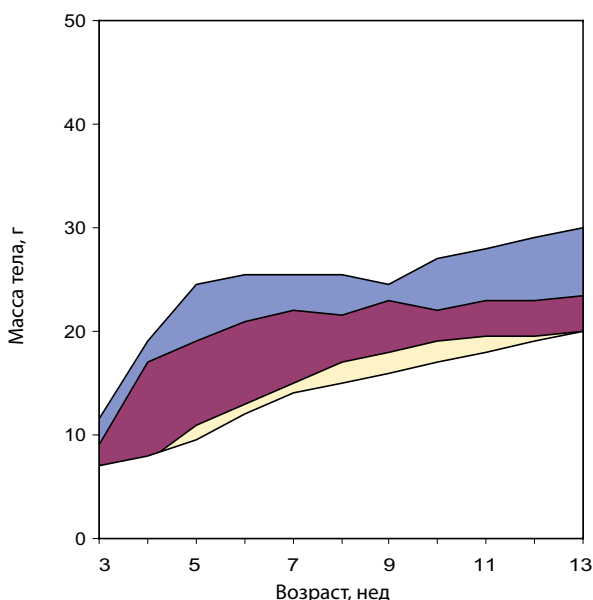
Создание новых моделей опухолевого роста

Иммунодефицитных животных традиционно используют для получения моделей различных злокачественных опухолей. Для экспериментальной онкологии и химиотерапии наиболее ценны перевиваемые линии подкожных (п/к) ксенографтов опухолей человека. Создать такую модель можно путем пер-

вичной имплантации фрагмента опухоли человека, полученного при оперативном удалении, либо при имплантации перевиваемой культуры клеток с целью адаптации ее к росту у мышей. Процесс получения таких линий длительный и трудоемкий, связанный прежде всего с поиском оптимальных условий для приживания ксенографта в организме животного и его полной биологической адаптацией. Последнее подтверждается стабильностью основных биологических характеристик роста, пролиферации, ангиогенеза, гистологической структуры и т. п. опухолевого узла в серии не менее 9 пассажей. Указанным путем в НМИЦ онкологии получены более 60 моделей опухолей человека различных локализаций: кишечника и желудка, легкого и дыхательных путей, мочеполовой, кроветворной и нервной систем, молочной железы, опорно-двигательного аппарата, в том числе соединительной ткани и меланомы, описанные в Коллекции опухолевых штаммов человека [2].

Доклинические исследования противоопухолевых воздействий

П/к ксенографт, частично моделирующий опухолевый процесс, может быть результатом имплантации адаптированной к росту на мышцах культуры опухолевых или трансформированных клеток, взятых в количестве, достаточном для получения опухолей у 100 % животных. Для улучшения прививаемости с использованием меньших количеств клеток используют иммобилизующие материалы (матригель, трехмерные скаффолды и т. п.) или дополнительные иммунодепрессивные воздействия, чаще — тотальное γ -излучение [3]. П/к ксенографты дают опухоли практически всех локализаций. При этом у мышей формируются опухолевые узлы солидного строения (солидные или плотные опухоли) или имеющие структуру лимфатического узла — ЛУ (гемобласты). Эти узлы и являются объектом терапии при проведении различных экспериментальных исследований противоопухолевых воздействий, в том числе доклинических. Для тестирования потенциальных противоопухолевых воздействий предложен ряд методических рекомендаций за рубежом и в нашей стране. Общим в рекомендациях является подход к оценке эффективности лечения, для чего используются количественные критерии изменения объема опухоли во времени, после проведения терапии. Для такого подсчета в качестве единиц измерения чаще используются единица массы или площади опухоли, реже — единица объема опухоли. Последнее вызвано чрезвычайно слабой инвазией п/к ксенографтов или ее отсутствием, что приводит к образованию плоского опухолевого узла. Терапию п/к ксенографтов начинают при достижении массы 34 мг (размеры 4 × 4 мм), что считается ранним лечением, или 68 мг (5 × 5 мм),



Стандартная динамика прироста массы тела nude-мышей

что считается поздним лечением. В качестве количественного критерия эффективности используется соотношение размеров или массы опухолевого узла в единицу времени в леченой и контрольной группах животных, выраженное в процентах: Т/С % (treatment/control). Минимально значимым служит $T/C \leq 42$ %. Это означает, что эффективным считается такое лечение, которое позволяет уменьшить опухоль более чем наполовину [3]. В редких случаях, например при трансплантации некоторых гемобластозов или секретирующих солидных опухолей репродуктивной системы, можно получить асцит. Такие проявления специфического процесса при доклинических исследованиях не используются, так как носят спорадический характер и рассматриваются как артефакт. П/к ксенографты, как правило, не метастазируют и отличаются слабой инвазией в окружающие ткани из-за дефектного строения кожи. Получить метастазы в легких можно, только прививая опухоль внутривенно, как это показано для наиболее агрессивных вариантов меланомы. Продолжительность жизни мышей с п/к ксенографтами различна и зависит от гистологической структуры опухоли. Медленнее всех растут карциномы легкого, латентный период (появление пальпируемой опухоли) достигает 1 мес. Выживаемость мышей ограничена иммунодефицитом — источником различных контаминантов, которые приводят их к гибели независимо от условий содержания. В силу указанных причин продолжительность жизни иммунодефицитных животных практически не используется для оценки эффективности лечения.

Доклинические модели метастазов опухолей человека

Моделирование метастазов рака кишечника

Эксперименты выполняют методом имплантации операционного опухолевого материала прямо от пациента (хирургическая ортотопическая имплантация, surgical orthotopic implantation, SOI) в толстую или слепую кишку nude-мышей. SOI выполняется под серозную оболочку кишки. Трансплантация операционного опухолевого материала из кишечника дает 100 % метастазов в регионарные ЛУ или в печень. Подобные результаты получают также, если трансплантировать опухолевую ткань из ксенографта рака толстой кишки или из полученного в результате трансплантации печеночного метастаза. Было также установлено, что метастатический потенциал ортотопически развившейся опухоли выше, если для инокуляции использовали фрагменты опухолевой ткани, а не взвесь опухолевых клеток с дополнительной гистологической верификацией процесса. Многочисленные опыты с моделированием метастазов рака кишечника показали, что ортотопическая трансплантация («пациентоподобная» модель) суще-

ственно повышает степень злокачественности трансплантата. Изучение чувствительности такой модели к клиническим препаратам показало, что она адекватна для доклинического изучения новых лекарств и для прогноза индивидуальной чувствительности пациента к лечению.

Моделирование метастазов рака яичка

Опыты с раком яичка, выполненные с двумя линиями клеток переходно-клеточной карциномы яичка, показали, что при трансуретральной инъекции в уринальную часть яичка nude-мышей наблюдали опухолевый рост в яичках и метастазы в легкие. П/к трансплантация этих клеточных линий вызывала опухолевый рост с множеством мелких инвазивных очагов, но без метастазов. Такие результаты получены и с клеточной линией карциномы яичка RT-4. При этом трансфекция мутантным онкогеном *N-ras* клеток RT-4 приводила к гиперэкспрессии этого гена и селекции RT-4-mr-10, клетки становились более инвазивными при трансуретральной инокуляции. При п/к трансплантации эти клетки не проявляли инвазивных свойств. В некоторых случаях при ортотопической трансплантации *ras*-трансфицированной линии клеток RT-4-mr-10 наблюдали не только мощный локальный опухолевый рост и увеличение зоны инвазии, но и полиорганное метастазирование. При инокуляции взвесью клеток ксенографта даже при трансфекции геном *ras* получали только местную инвазию, но не метастазы. Эти результаты показали, что на nude-мышам можно получить модель метастазирования путем ортотопической трансплантации первичного опухолевого материала (SOI).

Моделирование метастазов рака поджелудочной железы

Первые опыты по трансплантации рака поджелудочной железы были проведены с быстрорастущим вариантом карциномы COLO 357, которую инъекцировали взвесью клеток в селезенку nude-мышам. В результате получили метастазы в печень и легкие. При этом было отмечено, что двусторонняя инвазия и генерализация процесса наступали значительно быстрее, чем метастазирование. В другом опыте результаты ортотопической трансплантации сравнили с п/к трансплантацией 2 вариантов рака поджелудочной железы COLO 357 и L3.3. Для перевивки использовали п/к ксенографты (первый пассаж), из которых готовили фрагменты 2×2 мм. Ксенографты были подсажены в наружную часть поджелудочной железы. Операционная рана укрыта парафином, края окружающего железу сальника были ушиты так, чтобы ксенографт располагался в брюшной полости. В результате у большинства мышей выросли опухоли в месте инокуляции, появились метастазы в печени,

легких, регионарных и отдаленных ЛУ. Авторы утверждают, что использование кусочков опухоли в качестве ксенографта лучше, чем инъекция опухолевых клеток в поджелудочную железу, так как последнее приводит к быстрому попаданию клеток в местный кровоток, их рассеивание и элиминацию. Они считают, что данная модель аналогична клинической ситуации рака поджелудочной железы с поражением ретроперитонеальных ЛУ, печени и легких.

Особенности роста клеточных линий рака поджелудочной железы изучали при трансплантации в разные сайты: ортотопически в дуоденальную часть поджелудочной железы, гетеротопически в печень или под кожу. В ряде работ описаны результаты метастазирования ортотопического трансплантата и оказалось, что у молодых мышей можно получить опухолевый рост в печени через месяц, а у взрослых — не ранее чем через 1,5–2,0 мес. При этом наблюдали рост опухоли в другие органы, чаще всего в двенадцатиперстную кишку, реже — в органы брюшной полости и в почки. П/к опухоли не давали метастазов и не прорастали в другие органы. Первичный опухолевый материал рака поджелудочной железы трансплантировали ортотопически неоднократно и, если при этом использована методика SOI, опухоли получали в 100 % случаев, как в виде интенсивного местного роста, так и с инвазией и полиорганным метастазированием.

Моделирование метастазов опухолей головы и шеи

Для получения ксенографтов клеточную линию сквамозно-клеточной карциномы гортани имплантировали в полость рта nude-мышей. В результате превалировал инвазивный рост в мягкие ткани, венозные анастомозы и костный мозг, реже — в легкие и чрезвычайно мало — в ЛУ. При п/к трансплантации метастазов не получено. Использование SOI, включая метастазы языка и опухоли гортани, при имплантации в мягкие ткани ротовой полости, мимические мышцы и *m. mylohyoideus* получен инвазивный рост. Если трансплантировали тот же материал п/к, инвазии не было.

Моделирование метастазов рака пищевода

Линию клеток рака желудка G/F имплантировали под кожу или в стенку пищевода nude-мышей. При ортотопической трансплантации опухоли росли медленнее. При трансплантации в стенку пищевода почти у половины мышей опухоли прорастали в окружающие ткани и метастазировали в регионарные ЛУ и отдаленные органы, такие как печень, легкие. П/к растущие опухоли были инкапсулированы и не давали метастазов. Таким образом, стенка пищевода обеспечивала лучшее микроокружение

для линии клеток рака желудка G/F для экспрессии его метастатического потенциала. При использовании SOI можно получить хороший местный опухолевый рост, высокий процент метастазирования и полиорганные метастазы. Лучшие результаты получаются с инокулятом в виде суспензии клеток.

Моделирование метастазов рака легкого

Для получения ксенографтов опухолевые клетки инокулируют интраторакально (в грудную полость) или интрабронхиально nude-мышам. Для обеспечения успешной имплантации используют метод Meta-Mouse при торакотомии с инокуляцией опухоли в левое легкое дополнительно иммунодепрессированным nude-мышам или мышам SCID (Severe Combined Immuno Deficient). Результаты показывают, что эти методики позволяют эффективно получать локальный опухолевый рост как в nude-, так и в SCID- мышах при развитии регионарных и отдаленных метастазов. Хорошие результаты получены и трансплантацией клеточной линии дифференцированной крупноклеточной/сквамозно-клеточной карциномы легкого #2268. Выход опухолей составил 100 %, метастазы получены также в 100 % случаев. Наблюдают также метастазы во второе легкое и ЛУ. При п/к трансплантации опухоли росли локально без метастазов. Также успешно nude-мышам в левое легкое при торакотомии трансплантируют мелкоклеточную карциному линии Lu-24 по 1,5 мм³ опухолевой ткани. Опухоли получены в 100 % случаев, на 24-й день они достигали 10 мм в диаметре. У всех мышей получены регионарные и отдаленные метастазы, в том числе в правое легкое, грудную стенку, перикардий, пищевод, диафрагму, париетальную плевру и ЛУ. Эту же опухоль трансплантировали SCID-мышам. Оказалось, что у всех мышей на 17-й день появились опухоли, достигшие 7,5 мм в диаметре, картина метастазирования была идентичной, но сроки появления первых метастазов несколько короче.

Подобные результаты были получены при трансплантации мелкоклеточных карцином легкого Ku-130 и H-69 с существенным локальным ростом и выраженным метастазированием. В случае использования взвеси клеток в качестве инокулята наблюдали только локальный рост без метастазирования. При трансплантации опухолевой ткани в париетальную или висцеральную плевру nude-мышей получали раннюю или запущенную модель поражения плевры. Полученная модель, идентичная клинической ситуации по симптоматике, различиям между поражением париетальной (ранняя симптоматика) и висцеральной (поздняя симптоматика) плевры, причине и срокам гибели от дыхательной недостаточности, пригодна для доклинического изучения новых лекарств.

Злокачественная плевральная мезотелиома человека является одной из самых агрессивных и трудно лечимых опухолей. Адекватная модель необходима для улучшения терапевтической ситуации. Для получения первых моделей свежие фрагменты от пациентов со злокачественной мезотелиомой имплантировали в париетальную плевру nude-мышей. Во всех случаях получены локальный опухолевый рост и идентичная клинике симптоматика с распространением опухоли на обе половины грудной клетки при поражении медиастинальных ЛУ. Если опухоль не распространялась на вторую половину плевральной полости, симптоматика была сглажена. Морфологически опухоль была верифицирована. Модель вполне пригодна для доклинического изучения лекарств [4].

Моделирование метастазов рака предстательной железы

Опыты выполняются аналогично ксенографтам колоректального рака Du-154 или рака предстательной железы PC-3, когда мы имеем дело с гормоннезависимой опухолью. Опухоли у nude-мышей растут локально, иногда дают метастазы и инвазию, прорастают в окружающие ткани, в том числе в мочевой пузырь. Возможной причиной гибели мышей в этом случае может быть обструкция мочевого пузыря и гидронефроз.

Моделирование метастазов рака яичников

Посредством метода SOI трансплантируют опухоль яичника под капсулу яичника nude-мышам. Опыты с опухолевым материалом от пациенток с опухолями разной степени дифференцировки показали следующее. Трансплантат от пациентки с высокодифференцированной инкапсулированной опухолью и асцитом дал локальный опухолевый рост по типу цистаденокарциномы и мелкие метастазы в легкие. Трансплантат от пациентки с быстрорастущей первичной опухолью, занимающей всю брюшную полость, не дал локального роста, но вызвал метастазы в кишечник и париетальную брюшину. Последующие многочисленные эксперименты дали основание полагать, что для успешного моделирования метастазов яичника необходимо забирать трансплантат прямо от пациентки, опухоль должна расти локально в яичнике, а после трансплантации может метастазировать в легкие, давать отсевы по брюшине и отдаленные органы, например в кишечник. Такие свойства позволили считать модель пригодной для доклинических целей и использовать ее.

Моделирование метастазов рака молочной железы

Опухолевый материал получают от пациенток и прямо трансплантируют nude-мышам в жировую ткань (складку) в области молочной железы, где опухоль растет экстенсивно и метастазирует в легкие.

Это первая и пока единственная модель метастазов рака молочной железы.

Возможные пути повышения метастазирования опухолей человека при ортотопической трансплантации nude-мышам

В результате анализа причин лучшего метастазирования ортотопически трансплантированных опухолей в сравнении с эктопически трансплантированными были сформулированы следующие условия, которые необходимо учитывать для хорошего результата. На первом месте — анатомические особенности опухоли, с которыми связано ее локальное микроокружение, включая возможность плохого кровоснабжения. Затем следует образование опухолевых эмболов и молекулы, которые могут специфически атаковать опухолевые клетки, а также тканеспецифичные молекулы экстрацеллюлярного матрикса. Обязательно определение локальных ростовых факторов и химических соединений, выделяемых локальным матриксом при контакте с трансплантатом.

Примеры таких соединений дают опыты с раком кишечника, клетки которого растут интрацекально и производят метастазы при высоком уровне продукции гепариназы и 2 типов IV коллагеназы (м. м. 92 и 64 kDa) в отличие от п/к трансплантированных клеток, которые не метастазируют. Эти ферменты считаются маркерами метастазирования ортотопически перевитых опухолей кишечника. Кроме этого, есть подтверждение тому, что фибробласты хозяина могут увеличивать способность клеток к метастазированию. Показано, что стромальные элементы ортотопического сайта, такие как фибробласты, способны взаимодействовать с эпителием органоспецифичной опухоли с запуском прямой клеточной инвазии в эктопический сайт.

Моделирование ортотопического рака почки

В качестве трансплантата используется (п/к) штамм рака почки человека РПоч1, полученный из удаленного опухолевого узла пациента НМИЦ онкологии [2]. Полученный ксенографт для ортотопической имплантации в паренхиму почки имеет адекватные трансплантационные характеристики: 100 % прививаемость и устойчивая динамика роста в течение не менее 3 нед. Гистологически опухоль светлоклеточная, представлена солидными полями крупных полиморфных клеток с митозами (10–15 в очаге), разделенными соединительно-ткаными прослойками, и единичными очагами позднего некроза (21 сут роста), что свидетельствует о достаточном васкулогенезе. Наиболее ценны чувствительность модели к ингибиторам тирозинкиназ ($T/C_{\min} = 2–30\%$ без регрессии) и повышенные уровни экспрессии NK1.1 (в 1,5 раза) и CD8a (в 3,3 раза). Это

открывает возможность поиска на такой модели новых классических или таргетных цитостатиков и/или комбинаций для химио- или иммунотерапии диссеминированного рака почки [5, 6]. Важно также, что в Коллекции есть депонированная во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов одноименная оригинальная клеточная линия (рег. № Н-165). Такая тест-система выигрышна еще и потому, что позволяет оценить антипролиферативное действие агента или комбинации последовательно на 1 модели *in vitro/in vivo*.

Экспериментальные подтверждения гипотезы Педжета о ценности модели MetaMouse

Для того чтобы понять ведущую роль организма хозяина в опухолевой прогрессии, nude-мышам были трансплантированы гистологически верифицированные опухоли кишечника человека в серозную оболочку желудка (гетеротопический сайт) и серозную оболочку кишечника (ортотопический сайт) методом SOI. Для трансплантации были использованы 2 ксенографта: хорошо дифференцированная линия клеток Co-3 и мало дифференцированная линия клеток COL-3-JCK. После ортотопической трансплантации у 10 мышей наблюдали в основном идентифицированный визуально распространенный на серозную оболочку кишечника рост опухоли, локальный рост и метастазы в легкие найдены почти у половины мышей, наиболее часто встречались регионарные метастазы в ЛУ и инвазивный рост. В противоположность этому при гетеротрансплантации опухоли кишечника в желудок nude-мышам наблюдали мощный локальный рост с единичными случаями инвазии, без прорастания в серозную оболочку или инвазии в лимфатические сосуды. Этот опыт ясно показал, что только ортотопическая трансплантация в серозную или субсерозную оболочку приводит к требуемому характеру роста новообразования, который характеризуется способностью к инвазии, метастазированию и имплантации у иммунодефицитных мышей (ИДМ). Другими словами, оригинальный сайт реципиента при трансплантации опухолевого материала играет критическую роль в опухолевой прогрессии. Результаты трансплантации рака кишечника человека в печень nude-мышам показали, что таким образом можно моделировать метастазирование в печень. При этом выявлен интересный феномен обратного метастазирования (reverse-metastazed): метастазирующая опухоль кишечника человека, трансплантированная в печень nude-мышам, в свою очередь, метастазирует в кишечник. Эти данные демонстрируют избирательную способность злокачественной опухоли человека отсеивать и внедрять свои «семена» как в виде первичного, так и метастатического роста.

Изучение новых препаратов на «пациентоподобных» мышинных опухолевых моделях

Примером такого подхода могут служить эксперименты с использованием ингибитора матричных металлопротеиназ ВВ-94 (батимастат) в качестве ингибитора опухолевой прогрессии. Матричные металлопротеиназы, как известно, участвуют в росте и распространении метастазов опухолей. В опыте фрагменты рака кишечника человека были ортотопически трансплантированы методом SOI nude-мышам. ВВ-94 вводили мышам внутривентриально ежедневно более 2 мес. В результате масса леченой опухоли и частота инвазии уменьшились наполовину, частота полиорганного метастазирования — в 3 раза, а поджелудочная железа леченых мышей увеличилась при хорошей переносимости лечения. На основании этих данных ингибиторы металлопротеиназ были направлены на клиническое изучение, а модель признана пригодной для доклинических исследований средств адьювантной терапии рака.

Доклиническое изучение онкогенных потенций (туморогенности) различных агентов

В последние годы в России принят ряд важных правительственных решений по вопросам развития высокотехнологичных видов медицинской помощи, среди которых открытие новых криобанков для клеточных культур, основы клеточных медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП). Предпосылкой этому были разработки и успешное применение многих клеточных препаратов на основе различных функционально активных клеток [7–10]. МИБП проявляют регуляторно-репаративное и иммуностимулирующее действие, ориентированное на различные терапевтические цели. Соответственно свойствам МИБП используются для посттравматической реконструкции тканей [7], тканевой инженерии крупных сосудов [8], лечения инсулинзависимого сахарного диабета, производства противомикробных или противоопухолевых вакцин и/или для заместительной терапии.

На доклинической стадии изучаются мезенхимальные и эмбриональные стволовые клетки, способные к переживанию *in vivo*. Поскольку имплантаты из культур клеток *in vivo* достаточно уязвимы для иммунологического надзора хозяина, разрабатываются методы иммобилизации с использованием различных матриц в виде близких к структуре губчатой кости микро- или трехмерных капсул (скаффолдов), в том числе из металлов.

Однако при этом возрастает опасность малигнизации клеток внутри скаффолда *in vivo*, не только в результате исключения иммунной реакции на атипичные клетки, но и по причине реставрации исходного клеточного фенотипа. Морфологические

исследования срезов могут выявить возможную атипию, но только в мягких материалах. Канцерогенная или мутагенная активность некоторых металлов (никель или хром) известны, а онкогенные потенциалы современных пористых материалов из других металлов, например титана, не изучены. Применение новых МИБП невозможно без доклинического изучения их безопасности, что регламентировано рядом документов РФ. Одним из обязательных разделов доклинического изучения МИБП является определение онкогенных потенциалов или туморогенности, т. е. способности вызывать развитие злокачественной опухоли. Для выявления этого побочного действия на доклиническом этапе в настоящее время используются различные методики, наиболее достоверной из которых является п/к имплантация клеточного препарата мышам, лишенным трансплантационного иммунитета. Среди рекомендованных для изучения туморогенности животных — обычные иммунокомпетентные мыши, депрессированные классическими иммунодепрессантами (циклоспорином, азатиоприном, имураном, циклофосфаном, антилимфоцитарной, антитимоцитарной сыворотками или антилимфоцитарным иммуноглобулином) или наследственные ИДМ, полученные нокаутированием генов, ответственных за трансплантационный иммунитет. Обычные иммунокомпетентные мыши дешевле и не требуют особых условий содержания, но биологически не вполне адекватны для современных МИБП. Но применение депрессанта создает не длительную, а временную иммуносупрессию, что не дает возможности достоверно оценить отдаленные проявления туморогенности, особенно при изучении иммобилизованных или инкапсулированных на носителях препаратов с отсроченным эффектом [11, 12].

Кроме того, наличие индуцированной системной иммуносупрессии, подавляющей все иммунные клеточные реакции, не дает возможности выявить пролиферативную активность клеток в ЛУ (мишенях возможного метастазирования) и дифференцировать ее от воспалительных изменений при применении нестерильных объектов.

ИДМ биологически интактны, так как не подвергаются экзогенным иммунодепрессивным воздействиям и вследствие этого могут давать адекватный биологический ответ на наличие туморогенности,

как в отношении опухолевого узла, так и в отношении диссеминации процесса. Важно то, что в качестве контроля в опытах на ИДМ параллельно используется группа животных, которым имплантируется такое же количество раковых клеток с близким к исследуемому препарату гистогенезом из доступных коллекций культур клеток [13], что дает возможность иметь доказательный отрицательный результат. Для подтверждения значимости указанной модели с использованием ИДМ при изучении онкогенных потенциалов МИБП различного происхождения, состава и назначения было предпринято настоящее исследование. В исследование включены МИБП интактные, в том числе нестерильные, и иммобилизованные на различных носителях, включая скаффолды из пористого титана.

Заключение

В настоящее время в России существуют de facto 2 учреждения, в которых имеются ИДМ, пригодные для выполнения экспериментальных и доклинических исследований. Питомник, филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, нарабатывает животных в Пушкино (Московская область) для продажи на территории РФ. Специализированный отсек НМИЦ онкологии нарабатывает животных для обеспечения и выполнения научно-исследовательских разработок в Москве. Наличие специализированного отсека для разведения и содержания иммунодефицитных животных в структуре НМИЦ онкологии, имеющем множество хирургических подразделений для лечения разнообразных злокачественных опухолей, позволило получить оригинальные модели опухолей человека, изучить основные характеристики их роста и выполнить ряд рекомендованных для внедрения плановых разработок в научно-исследовательских организациях, а также по заказам производителей лекарственных средств на территории России и стран СНГ. Обеспечение отечественными иммунодефицитными животными является основой современной материальной базы научно-исследовательских разработок, особенно на этапе бурного развития биотехнологических средств и таргетной терапии в онкологии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши разведения НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина РАМН: Возможности использования.

М.: Издательская группа НМИЦ онкологии, 2010.
2. Трещалина Е.М. Коллекция опухолевых штаммов человека. Под ред.

М.И. Давыдова. М.: Практическая медицина, 2009.

3. Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and

- approval. Second ed. by B.A. Teicher and P.A. Andrews. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2004.
4. Vailli V.E., Jacobs R.M., Norris A. et al. The histological classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the NCI working formulation. *J Vet Drugs Invest* 2000;12:296–306.
 5. Андропова Н.В., Ситдикова С.М., Морозова Л.Ф. и др. Моделирование ортотопического роста рака почки человека с перевиваемым штаммом РПоч1 на иммунодефицитных мышах. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;1:50–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-00-00.
 6. Самойленко И.В., Харкевич Г.Ю., Демидов Л.В. Применение блокатора рецепторов CTLA4 в лечении больных метастатической меланомой. *Российский медицинский журнал* 2015;1:4–9.
 7. Григорян А.С., Пилерович Е.Г., Павличенко Н.Н. и др. Влияние трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на посттравматические процессы при экспериментальной травме головного мозга. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2009;4(3):58–67.
 8. Григорян А.С., Кругляков П.В. Применение в тканевой инженерии крупных сосудов трансплантатов на основе аутогенных мононуклеарных клеток костного мозга. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2009;4(3):37–41.
 9. Зорин В.Л., Зорина А.И., Черкасов В.Р. Анализ зарубежного рынка регенеративной медицины. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2009;4(3):68–78.
 10. Панарин Е.Ф., Нудьга П.А., Петрова В.А. и др. Матрицы для культивирования клеток кожи человека на основе природных полисахаридов — хитина и хитозана. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2009;4(3):42–6.
 11. Pokrovsky V.S., Lesnaya N.A., Romanenko V.I., Treshalina H. M. A new triplet of combined chemotherapy with irinotecan, cisplatin and aranoza for lung cancer therapy. Abstract book of 20th International Congress of Anti-Cancer Treatment. Paris, 2009.
 12. Трешалина Е.М., Андропова Н.В., Райхлин Н.Т. Изучение онкогенных потенциалов различных иммунобиологических препаратов на иммунодефицитных мышах. *Российский биотерапевтический журнал. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты* 2009;2:22.
 13. Кармацких О.Л., Ерофеев С.А., Кононович Н.А. и др. Опыт использования иммунологического препарата диплоидной клеточной культуры ЛЭЧ-4 (81) для замещения локального дефекта костной ткани длинных трубчатых костей собак. *Гений ортопедии: научно-теоретический и практический журнал* 2006;1:17–21.