

*О.И. Кит, А.С. Гончарова, Е.А. Лукбанова*

## **Методы создания ортотопических моделей рака толстой кишки человека на иммунодефицитных животных**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ростовский научно-исследовательский институт»  
Минздрава России, г. Ростов-на-Дону

**Рак толстого кишечника в течение долгого времени остается важной и актуальной проблемой в области онкологии. Значимым аспектом для понимания молекулярных закономерностей развития этого заболевания и разработки новых противоопухолевых препаратов являются исследования, выполненные на животных моделях. Такие модели представляют собой наиболее адекватный инструмент для оценки стратегии лечения рака и ресурс с огромным потенциалом для изучения механизмов туморогенеза. В статье проанализированы данные последних нескольких лет о методах моделирования процесса развития злокачественных опухолей кишечника человека на иммунодефицитных животных, рассмотрены преимущества и недостатки различных вариантов моделей.**

**Ключевые слова:** ксенографт, рак толстого кишечника, ортотопические модели опухоли, обзор

### **Введение**

Рак толстой кишки является одной из самых острых и актуальных проблем современной онкологии. В развитых странах он занимает третье место, в Российской Федерации 4–5-е место в структуре заболеваемости и смертности от злокачественных опухолей [1, 2, 3]. Несмотря на этот факт, в работе над данной проблемой достигнут значительный прогресс — за последние 50 лет заметно выросли продолжительность и качество жизни больных данной патологией [2]. Такой результат обусловлен совершенствованием методов терапии, а успехи в лечении рака толстой кишки и дальнейшие перспективы поиска новых эффективных терапевтических средств, в свою очередь, тесно связаны с исследованиями на животных.

Экспериментальные работы *in vivo* крайне важны как для изучения молекулярных механизмов развития опухолевого процесса, так и для разработки и тестирования противораковых агентов. При выборе подходящей доклинической модели необходимо корректно оценить, насколько точно она соответствует человеческому забо-

леванию [4, 5]. Наиболее удобным на сегодняшний день является моделирование опухолевого роста на мышах. Мелкие лабораторные грызуны имеют широкий спектр характеристик, важных для понимания многих молекулярных аспектов развития рака толстой кишки [5, 6]. Помимо способности имитировать патофизиологические особенности онкобиологии, моделирование опухолевого роста на мышах имеет ряд преимуществ практического характера: удобство содержания и разведения, возможность быстрого размножения животных в стандартных условиях, способность давать многочисленное потомство.

Эти качества сделали лабораторную мышь одним из самых привлекательных объектов для онкологических исследований. Перечисленные особенности, характерные для мелких лабораторных грызунов, а также стремительное развитие клеточных и молекулярных технологий привели к появлению большого количества разнообразных мышинных моделей (ксеногенные, ортотопические, автохтонные, GEM-модели и др.), разработанных с учетом специфики научных задач.

Ниже представлен анализ отечественной и зарубежной литературы, посвященной разработкам и применению в доклинических исследованиях наиболее актуальных моделей рака кишечника человека. Выполнен поиск тематических статей в базе данных Cyber Leninka с использованием следующих поисковых запросов: рак толстой кишки; ортотопическая модель рака кишечника человека, а также PubMed с использованием поисковых запросов: *xenograft*, *orthotopic tumor models*, *models of human colorectal cancer*, *mouse models of cancer*.

### **Модели на основе ксенотрансплантации**

В современной экспериментальной онкологии одной из самых адекватных моделей для изучения злокачественного роста являются ксенографты (гетеротрансплантаты) опухолей человека. Для создания таких моделей в качестве реципиентов опухолевого материала используют иммунодефицитных животных [4, 5, 7], например, SCID-мышей (*severe combined*

immunodeficiency), beige, имеющих низкий уровень Т- и В-лимфоцитов, а также Balb/c Nude, характеризующихся отсутствием тимуса и, как следствие, дефицитом Т-клеток. При подкожном введении опухолевого штамма или культуральной линии у животного формируется подкожный ксенографт. Существующие доклинические модели рака толстого кишечника человека, основанные на подкожной трансплантации относительно просты в исполнении, а также удобны для оценки динамики роста опухоли. Благодаря поверхностной локализации, развитие процесса контролируется легко и точно.

Адекватность подобных моделей поставленным задачам показана в ряде исследовательских работ по сравнению клинической эффективности препаратов и результатов их воздействия на ксенографты опухолей человека, полученных на иммунодефицитных мышах [8, 9, 10]. Однако, появление доказательств того, что микроокружение может влиять на рост и развитие злокачественных клеток привело к пониманию значимости различий тканевого гомеостаза и заложило основу для разработки новых ортотопических моделей, предполагающих имплантацию опухолевого материала в гистологически соответ-

ствующую зону [5, 11]. Значимость тканевого микроокружения была убедительно продемонстрирована M.G. Donelli et al. (1967) в работе по исследованию чувствительности к химиопрепаратам метастазов различной локализации на примере рака молочной железы. Метастазы, сформировавшиеся в лимфоузлах и коже, показали большую чувствительность к препаратам, чем метастазы в легких или костях [12]. Было установлено, что эффективность препарата по отношению к опухоли может различаться от 10 до 90% в зависимости от сайта трансплантации [13].

### Преимущества ортотопических моделей

Несмотря на то, что выполнение ортотопической пересадки опухолевого материала по праву считается технически более сложной и трудоемкой процедурой, чем создание подкожной модели, ортотопические ксенографты являются наиболее предпочтительными объектами для изучения основополагающих механизмов злокачественного роста, ангиогенеза и метастатического поведения, а также для доклинического тестирования новых терапевтических схем [14, 15, 16].

**Таблица 1. Методы создания ортотопических моделей опухолей кишечника человека**

| Краткая характеристика методов получения ортотопических ксенографтов |                      |   |   |        |
|--|----------------------|---|---|--------|
| Автор, год   | Вид и линия животных | Опухолевый материал   | Методика  | Ссылка |
| Takahashi T. et al., 2004  | Мыши SCID            | Линия клеток рака кишечника человека LS 174T  | Внутрикишечное промывание   | [37]   |
| Хромова Н.В., 2011   | Мыши D2 × J          | Линия клеток рака кишечника человека: НСТ-116; НСТ-116/p53-/- (сублиния)                    | Хирургический разрез брюшной полости с последующей прямой инъекцией опухолевых клеток в подслизистый слой стенки слепой кишки   | [6]    |
| Bhullar J.S. et al., 2011  | Мыши Nude; SCID      | Линии клеток рака кишечника человека: LS 174T; HT-29  | Трансанальное повреждение слизистого слоя кишечника с последующей инстилляцией через канюлю   | [29]   |
| Priolli D.G. et al., 2012  | Мыши Balb/c-nu/ nu   | Линия клеток рака кишечника человека CCL-218  | Хирургический разрез брюшной полости с последующей прямой инъекцией опухолевых клеток в подслизистый слой стенки слепой кишки   | [27]   |
| Metildi C. A. et al., 2013   | Мыши nu/nu           | Линии клеток рака кишечника человека: НСТ-116-GFP; HT-29-Ds-Red                             | Хирургический разрез брюшной полости с последующей прямой инъекцией опухолевых клеток в стенку слепой кишки, а также имплантация фрагмента опухоли (1 мм <sup>3</sup> ) в стенку слепой кишки | [26]   |
| Metildi C. A. et al., 2014   | Мыши nu/nu           | Фрагмент опухоли (1 мм <sup>3</sup> )   | Хирургический разрез брюшной полости с последующей имплантацией фрагмента опухоли (1 мм <sup>3</sup> ) в стенку слепой кишки  | [33]   |
| Wang J. et al., 2015   | Мыши Balb /c         | Линии клеток рака кишечника человека: НСТ-116; фрагмент опухоли (1,5 мм <sup>3</sup> )      | Хирургический разрез брюшной полости с последующей имплантацией фрагмента подкожного ксенографта (1,5 мм <sup>3</sup> ) в стенку слепой кишки   | [28]   |
| Park J.Y. et al., 2016   | Мыши nu/nu           | Линии клеток рака кишечника человека: HT-29; НСТ-116; фрагмент опухоли (3 мм <sup>3</sup> ) | Хирургический разрез брюшной полости последующей имплантацией фрагмента подкожного ксенографта (3 мм <sup>3</sup> ) в стенку слепой кишки   | [30]   |
| Liao H.-W., Hung M.-C. 2017  | Мыши NU/J nude; SCID | Линии клеток рака кишечника человека: HT-29; НСТ-116  | Хирургический разрез брюшной полости с последующей инъекцией опухолевых клеток в стенку слепой кишки  | [17]   |
| Zhao X. et al., 2017   | Мыши Nude            | Линия клеток рака кишечника человека HT-29  | Инъекция опухолевых клеток в стенку кишечника под контролем эндоскопа   | [22]   |

Этот способ моделирования позволяет довольно точно имитировать опухоль человека и лучше предсказывать реакцию пациента на терапию по сравнению с гетеротопическими трансплантатами [17, 18, 19]. В частности, локализация ксенографта имеет ключевое значение для исследований эффективности новых иммунотерапевтических препаратов [20, 21].

В работе X. Zhao et al. (2017) убедительно показано, что местоположение опухоли влияет на формирование иммунного ответа в моделях колоректального рака [22]. При сравнении инфильтрации подкожной и ортотопической опухолей клетками иммунной системы обнаружено, что опухоли в подкожной модели имели меньшее количество Т-клеток, В-клеток и естественных киллеров (NK), но большее содержание иммуносупрессивных миелоидных клеток. Напротив, опухоль в ортотопической модели имела большее количество инфильтрующих Т-клеток, В-клеток и NK и меньшее — иммуносупрессивных миелоидных клеток. Количество иммуномодулирующих цитокинов, таких как интерлейкин (IL) -2, IL-6, интерферон (IFN) -гамма и гранзим В, также было повышено в ортотопических опухолях по сравнению с подкожными [22].

От сайта ксенотрансплантации зависит выраженность иммунного ответа, а также профиль экспрессии ряда белков и микроРНК в клетках ксенографта опухоли человека, что указывает на важность выбора корректной доклинической модели для тестирования таргетных и иммунопрепаратов [23, 24, 25].

### Методы создания ортотопических моделей

Результаты анализа полнотекстовых статей с подробным описанием методов создания ортотопических моделей рака кишечника человека представлены в табл. 1.

По результатам тщательного анализа массива литературных данных выяснилось, что одной из самых часто используемых методик является COI (cellular orthotopic implantation) [26]. Этот метод создания ортотопического ксенографта кишечника предполагает хирургический разрез брюшной полости с последующей прямой инъекцией опухолевых клеток в подслизистый слой стенки слепой кишки [27, 28]; при этом чаще всего используют такие культуральные линии, как HCT-116 и HT-29 [17, 29, 30]. Такая модель может имитировать процесс развития рака кишечника человека от первичной опухоли до метастатической. Однако, клеточные линии, в течение долгого времени существующие *in vitro*, могут лишиться некоторых свойств, характерных для опухолей, растущих *in vivo*, в связи с чем

инъекция клеток, полученных непосредственно из очага злокачественного роста, является более предпочтительной [31, 32].

Еще одним эффективным методом создания ортотопических ксенографтов кишечника является SOI (surgical orthotopic implantation) — хирургическая ортотопическая имплантация, предполагающая пересадку фрагмента опухоли в соответствующий орган животного-реципиента [33]. Согласно литературным данным, этот метод характеризуется высокой вероятностью развития метастазирования, кроме того, работа с фрагментом ткани, а не взвесью или культурой клеток предотвращает элиминацию материала [4, 28, 33]. Еще более продвинутым вариантом для изучения метастатического колоректального рака является ортотопическая трансплантация органоидов толстой кишки человека — трехмерных структур, спроектированных при помощи современных клеточных технологий [34, 35].

Тем не менее, несмотря на соответствие таких моделей основным критериям, они имеют значительный недостаток — хирургическая процедура приводит к обширным воспалениям, тем самым создавая нефизиологическое микроокружение опухоли, делая их непригодными для исследования иммунологических препаратов. Этого недостатка лишен метод введения опухолевых клеток в стенку прямой кишки при помощи колоноскопа [36], а также микроинъекция культуры клеток под контролем эндоскопа [22]. Хорошие результаты были продемонстрированы и в работах по трансанальному введению опухолевых клеток после внутрикишечного промывания растворами, нарушающими целостность слизистого слоя кишечника без применения хирургии [37, 38]. Авторы данной методики регистрировали развитие ректальной опухоли у 100% мышей, а возникновение спонтанного метастазирования в лимфоузлы и легкие было обнаружено более чем в 90% случаев.

### Заключение

Благодаря активным поискам идеальной концепции воспроизведения опухолевого роста на модели животного, было создано большое количество разнообразных вариантов, каждый из которых обладает своими преимуществами и недостатками. Несмотря на достигнутые в этом вопросе успехи, работы по созданию ортотопической модели, наиболее точно имитирующей закономерности развития первичной опухоли и возникновения спонтанных метастазов, наблюдаемых у пациентов с злокачественными опухолями кишечника, продолжают.

*Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.*

#### ЛИТЕРАТУРА

- Идиятуллина Э.Т., Павлов В.Н., Yuan Y, Cai B. Современные представления о лечении колоректального рака с метастазами // Медицинский вестник Башкортостана. — 2017. — Т. 12. — № 5. — С. 124-127. [Idiyatullina ET, Pavlov VN, Yuan Y, Cai B. Modern views to treatment of colorectal cancer patients with metastases. Bashkortostan medical journal. 2017; 12(5): 124-127 (In Russ).].
- Кит О.И. Проблема колоректального рака в начале XXI века: достижения и перспективы // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 2013. — Т. 23. — №. 3. — С. 65-71. [Kit OI. Issue of colorectal cancer at the beginning of XXI century: achievements and prospects. The Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology. 2013; 23(3): 65-71 (In Russ).].
- Федоров В.Э., Поделякин К.А. Эпидемиологические аспекты колоректального рака // Медицинский альманах. — 2017. — №. 4. — С. 145-148. [Fedorov VE, Podelyakin KA. Epidemiological aspects of colorectal cancer. Medicinskij al'manah. 2017; 4: 145-148 (In Russ).] doi.org/10.21145/2499-9954-2017-4-145-148.
- 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 EM. Immunodeficient 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.
- Холоденко Р.В., Доронин И.И., Холоденко И.В. Опухолевые модели в изучении онкологических заболеваний // Иммунология. — 2013. — Т. 34. — №. 5. — С. 282-286. [Kholodenko IV, Doronin II, Kholodenko RV. Tumor models in the study of cancer diseases. Immunology. 2013; 34(5): 282-286 (In Russ).].
- Хромова Н.В., Копнин П.Б., Копнин Б.П. Стимуляция гемангиогенеза, лимфангиогенеза и васкулогенной мимикрии при различных нарушениях функции опухолевого супрессора p53 в ксенографтах рака ободочной кишки // Онкологическая колопроктология. — 2011. — №. 2. — С. 37-43. [Kromova NV, Kopnin PB, Kopnin BP. Stimulation hemangiogenesis, lymphangiogenesis and vasculogenic mimicry in various lesions of tumor suppressor p53 in colon cancer xenografts. Oncological coloproctology. 2011; 2: 37-43 (In Russ).].
- 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. — Т. 16. — №. 1. — С. 51-60. [Andronova NV, Sitdikova SM, Morozova LF et al. 2017; 34(5): 51-60 (In Russ).] doi: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-51-60.
- Scholz C.C., Berger D.P., Winterhalter B.R. et al. Correlation of drug response in patients and in the clonogenic assay with solid human tumor xenografts. Eur. J. Cancer. 1990; 26: 901-905. doi.org/10.1016/0277-5379(90)90196-Z.
- Bhullar JS, Makarawo T, Subhas G et al. A true orthotopic gastric cancer murine model using electrocoagulation. J Am Coll Surg. 2013; 217: 64-70. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2013.01.062.
- Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D et al. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. Br J Cancer. 2001; 84: 1424-1431. doi: 10.1054/bjoc.2001.1796.
- Miller S, Senior PV, Prakash MV et al. Leukocyte populations and IL-6 in the tumor microenvironment of an orthotopic colorectal cancer model Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2016; 48(4): 334-341. doi: 10.1093/abbs/gmw002.
- Donelli M.G., Rosso R., Garattini S. Selective chemotherapy in relation to the site of tumor transplantation. Int. J. Cancer. 1967; 2: 421-424. doi.org/10.1002/ijc.2910020503.
- Wilmanns C, Fan D, O'Brian C et al. Modulation of doxorubicin sensitivity and level of P-glycoprotein expression in human colon carcinoma cells by ectopic and orthotopic environments in nude mice. Int. J. Oncol. 1993; 3: 413-422. doi.org/10.3892/ijco.3.3.413.
- Porru M, Artuso S, Salvati E et al. Targeting G-Quadruplex DNA structures by EMICORON has a strong antitumor efficacy against advanced models of human colon cancer. Mol Cancer Ther. 2015; 14(11): 2541-2551. doi: 10.1158/1535-7163.
- Evans JP, Winiarski BK, Sutton PA et al. The Nrf2 inhibitor brusatol is a potent antitumor agent in an orthotopic mouse model of colorectal cancer Oncotarget. 2018; 9(43): 27104-27116. doi: 10.18632/oncotarget.25497.
- Hite N, Klinger A, Hellmers L et al. An optimal orthotopic mouse model for human colorectal cancer primary tumor growth and spontaneous metastasis. Dis Colon Rectum. 2018; 61(6): 698-705. doi: 10.1097/DCR.0000000000001096.
- Liao H-W, Hung M-C. Intracaecal orthotopic colorectal cancer xenograft mouse model. Bio Protoc. 2017; 7(11): doi:10.21769/BioProtoc.2311.
- Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. The American Journal of Pathology. 2007; 170(3): 793-804. doi:10.2353/ajpath.2007.060929.
- Costa MJ, Kudravalli J, Liu WH et al. A mouse model for evaluation of efficacy and concomitant toxicity of anti-human CXCR4 therapeutics. PLoS One. 2018; 13(3):e0194688. doi: 10.1371/journal.pone.0194688.
- Palucka AK, Coussens LM. The basis of oncoimmunology. Cell. 2016; 164:1233-1247. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.049.
- Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T-cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2016; 16:566-581. doi: 10.1038/nrc.2016.97.
- Zhao X, Li L, Starr TK, Subramanian S. Tumor location impacts immune response in mouse models of colon cancer. Oncotarget. 2017; 8(33): 54775-54787. doi: 10.18632/oncotarget.18423.
- Wege AK. Humanized mouse models for the preclinical assessment of cancer immunotherapy. BioDrugs. 2018; 32(3): 245-266. doi: 10.1007/s40259-018-0275-4.
- Mukohyama J, Shimono Y, Yamashita K, et al. Effect of xenotransplantation site on MicroRNA expression of hu-

- man colon cancer stem cells. *Anticancer Res.* 2016; 36(7):3679-86.
25. Lal N, White BS, Goussous G et al. Are Independently associated with reduced immune infiltration and reactivity in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2018; 24(1): 224-233. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1090.
  26. Metildi CA, Kaushal S, Snyder CS et al. Fluorescence-guided surgery of human colon cancer increases complete resection resulting in cures in an orthotopic nude mouse model *J Surg Res.* 2013; 179(1): 87-93. doi:10.1016/j.jss.2012.08.052.
  27. Priolli DG, Abrantes AM, Neves S et al. A novel model of distal colon cancer in athymic mice. *Acta Cir Bras.* 2012; 27: 355-360. doi: 10.1590/S0102-86502012000600001.
  28. Wang J, Chen C, Wang S et al. Bufalin Inhibits HCT116 colon cancer cells and its orthotopic xenograft tumor in mice model through genes related to apoptotic and PTEN/AKT pathways. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2015; 457193. doi: 10.1155/2015/457193.
  29. Bhullar JS, Subhas G, Silberberg B et al. A novel nonoperative orthotopic colorectal cancer murine model using electrocoagulation. *J Am Coll Surg* 2011; 213: 54-60; discussion 60-61 doi: 10.1016/j.jamcoll surg.2011.02.022.
  30. Park JY, Murakami T, Lee JY et al. Fluorescent-antibody targeting of insulin-like growth factor-1 receptor visualizes metastatic human colon cancer in orthotopic mouse models. *PLoS One.* 2016; 11(1): doi: 10.1371/journal.pone.0146504.
  31. Mittal VK, Bhullar JS, Jayant K. Animal models of human colorectal cancer: Current status, uses and limitations. *World Journal Gastroenterology.* 2015; 21(41): 11854-11861. doi: 10.3748/wjg.v21.i41.11854.
  32. Fu XY, Besterman JM, Monosov A, Hoffman RM. Models of human metastatic colon cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88: 9345-9349. doi: 10.1073/pnas.89.12.5645.
  33. Metildi CA, Kaushal S, Luiken GA et al. Fluorescently-labeled chimeric anti-CEA antibody improves detection and resection of human colon cancer in an orthotopic nude mouse model. *J Surg Oncol.* 2014; 109(5): 451-458. doi:10.1002/jso.23507.
  34. Fumagallia A, Drosta J, Suijkerbuijka SJ et al. Genetic dissection of colorectal cancer progression by orthotopic transplantation of engineered cancer organoids *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(12): E2357-E2364. doi: 10.1073/pnas.1701219114.
  35. Matano M, Date S, Shimokawa M et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med.* 2015; 21(3):2562-62. doi: 10.1038/nm.3802.
  36. Zigmond E, Halpern Z, Elinav E et al. Utilization of murine colonoscopy for orthotopic implantation of colorectal cancer. *PLoS One* 2011; 6: e28858 doi: 10.1371/journal.pone.0028858.
  37. Takahashi T, Morotomi M, Nomoto K. A novel mouse model of rectal cancer established by orthotopic implantation of colon cancer cells. *Cancer Sci* 2004; 95: 514-519 doi: 10.1371/journal.pone.0079453.
  38. Kishimoto H, Momiyama M, Aki R, et al. Development of a clinically precise mouse model of rectal cancer. *PLoS One* 2013; 8: e79453 doi: 10.1371/journal.pone.0079453.

*O.I. Kit, A.S. Goncharova, E.A. Lukbanova*

### **Methods of creation of orthotopic models of human colon cancer in immunodeficient animals**

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don

Colon cancer has long been considered an important and actual problem in oncology. Studies performed on animal models are significant for understanding molecular patterns of the disease development and developing new antitumor drugs. Such models are the most adequate tool for evaluating the cancer treatment

strategy and a resource with enormous potential for studying tumorigenesis mechanisms. In this review, we analyzed the recent data on methods of modeling the process of development of malignant tumors in the human intestine on immunodeficient animals and considered advantages and disadvantages of different model variants.

**Key words:** xenograft, colon cancer, orthotopic tumor models, review

Поступила в редакцию 23.05.2018 г.