

ПУТИ МОДЕЛИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА У МЫШЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ РАКА ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА

А. А. Киблицкая , Т. С. Карасев, А. С. Гончарова, А. Ю. Максимов

НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

✉ kibaleand@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Рак желудка (РЖ) – группа злокачественных опухолей, происходящих из клеток слизистой оболочки желудка. Самый высокий уровень заболеваемости РЖ регистрируется в Японии, Китае и России, низкий – в США и Новой Зеландии. Обширные молекулярно-генетические исследования рака желудка выявили его гетерогенность, что связано с геномной нестабильностью опухоли и сложностью её фенотипа за счет одновременных изменений в нескольких онкогенах и супрессорах. Это явилось основанием для создания классификации по молекулярным подтипам. Создание реалистичной доклинической модели имеет важное значение для трансляционных исследований рака желудка. Раковые клеточные линии и полученные из них ксенотрансплантаты – одни из самых распространенных доклинических моделей. Но, несмотря на легкость генерации, они имеют и ограничения, поскольку эти модели не могут в достаточной степени воспроизводить уникальные особенности каждого больного раком. Ксенотрансплантаты, полученные от пациентов (Patient-derived xenograft; PDX), в настоящее время являются лучшей моделью для проверки мишеней и предикторов ответа на терапию. PDX-модели создаются путем трансплантации хирургически резецированных опухолей человека иммунодефицитным мышам. Эти модели поддерживают морфологическое сходство и повторяют молекулярные характеристики исходных опухолей, таким образом, являясь незаменимым инструментом для оценки противоопухолевого лекарственного ответа. Статистические данные, полученные в ходе доклинических исследований с использованием PDX-моделей, помогают значительно сэкономить время и ресурсы, необходимые для клинических испытаний. Также с целью изучения специфических генетических путей онкогенеза и разработки экспериментальной терапии рака желудка в научных лабораториях широко применяют трансгенные и нокаутные мышинные модели. В данном обзоре обсуждаются молекулярные классификации РЖ и экспериментальные модели мышей, которые воспроизводят рак *in situ* и являются универсальной платформой для доклинических исследований в экспериментальной онкологии.

Ключевые слова:

рак желудка, молекулярные подтипы, PDX-модель, ортотопический ксенотрансплантат, геном-модифицированные модели, таргетная терапия

Для корреспонденции:

Киблицкая Александра Андреевна – научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация.

Адрес: 344037, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63

E-mail: kibaleand@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9337-5535>

SPIN: 2437-4102, AuthorID: 610872

Финансирование: финансирование данной работы не проводилось.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования:

Киблицкая А. А., Карасев Т. С., Гончарова А. С., Максимов А. Ю. Пути моделирования опухолевого роста у мышей в экспериментальных исследованиях рака желудка человека. Южно-Российский онкологический журнал. 2021; 2(4): 26-37.

<https://doi.org/10.37748/2686-9039-2021-2-4-4>.

Статья поступила в редакцию 25.06.2021; одобрена после рецензирования 21.09.2021; принята к публикации 09.12.2021.

© Киблицкая А. А., Карасев Т. С., Гончарова А. С., Максимов А. Ю., 2021

METHODS FOR MODELING TUMOR GROWTH IN MICE IN EXPERIMENTAL STUDIES OF HUMAN GASTRIC CANCER

A. A. Kiblitckaya✉, T. S. Karasev, A. S. Goncharova, A. Yu. Maksimov

National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation

✉ kibaleand@gmail.com

ABSTRACT

Gastric cancer (GC) is a group of malignant tumors originating from the gastric mucosa cells. The highest incidence of GC is recorded in Japan, China and Russia, and the lowest one in the USA and New Zealand. Extensive molecular genetic research of GC has revealed its heterogeneity associated with the genomic instability of the tumor and the complexity of its phenotype due to simultaneous changes in several oncogenes and suppressors. This was the basis for the creation of the GC classification by molecular subtypes. The creation of a realistic preclinical model is essential for translational GC studies. Cancer cell lines and xenografts derived from them are among the most common preclinical models. They are easy to generate, but they also have limitations, since these models cannot sufficiently reproduce the unique characteristics of each cancer patient. Patient-derived xenografts (PDX) are currently the best model for testing targets and predictors of response to therapy. PDX models are created by transplanting surgically resected human tumors into immunodeficient mice. These models maintain morphological similarity and replicate the molecular characteristics of parental tumors providing an indispensable tool for assessing anticancer drug response. Statistical data from preclinical studies with PDX models can significantly save the time and resources required for clinical trials. Transgenic and knockout mouse models are also widely used in scientific laboratories in order to study specific genetic pathways of oncogenesis and develop experimental therapy for GC. This review discusses the molecular classifications of GC and experimental murine models that reproduce cancer in situ and are a universal platform for preclinical research in experimental oncology.

Keywords:

gastric cancer, molecular subtypes, PDX model, orthotopic xenograft, genetically modified models, targeted therapy

For correspondence:

Alexandra A. Kiblitckaya – research fellow National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation.

Address: 63 14 line str., Rostov-on-Don 344037, Russian Federation

E-mail: kibaleand@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9337-5535>

SPIN: 2437-4102, AuthorID: 610872

Funding: no funding of this work has been held.

Conflict of interest: authors report no conflict of interest.

For citation:

Kiblitckaya A. A., Karasev T. S., Goncharova A. S., Maksimov A. Yu. Methods for modeling tumor growth in mice in experimental studies of human gastric cancer. South Russian Journal of Cancer. 2021; 2(4): 26-37. (In Russ.). <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2021-2-4-4>.

The article was submitted 25.06.2021; approved after reviewing 21.09.2021; accepted for publication 09.12.2021.

Рак желудка (РЖ) является третьей по распространенности причиной смерти от рака во всем мире. К сожалению, примерно в 90 % случаев заболевания РЖ диагностируется на поздних стадиях, что приводит к неудовлетворительным результатам лечения. На развитие РЖ наряду с наследственными факторами влияют факторы окружающей среды и наличие *H. pylori* [1]. Нитрозосоединения, курение, неправильное питание значительно увеличивают риск возникновения РЖ. К патологическим процессам, приводящим к РЖ относят: атрофический гастрит, кишечную метаплазию и дисплазию. Резекция при язвенной болезни желудка увеличивает риск развития аденокарциномы в 2 раза [2]. На сегодняшний день существует потребность в улучшении нашего понимания патогенеза РЖ и создании более эффективных и менее токсичных терапевтических препаратов, что можно осуществить только с помощью использования в эксперименте адекватных доклинических моделей. Поиск литературных источников осуществлялся с помощью баз данных Web of Science, Scopus, Pubmed и КиберЛенинка по ключевым словам: gastric cancer, mouse models, PDX, target therapy, transgenic and gene knockout mice, рак желудка, мышинные модели, таргетная терапия, трансгенные и нокаутные мыши.

Морфологическая классификация РЖ

По Международной гистологической классификации (ВОЗ 2010) РЖ можно подразделить на следующие гистологические типы: аденокарциномы (папиллярные, тубулярные высоко/ умеренно дифференцированные, низкодифференцированные, муцинозные, перстневидноклеточные), железисто-плоскоклеточный рак, плоскоклеточный рак, карциносаркомы; хориокарциномы; недифференцированный рак [3].

Международная TNM классификация рака желудка была пересмотрена в 2017 г. (8-е издание) Американским объединенным комитетом по раку (American Joint Committee on Cancer, AJCC). Данная классификация применима только для подтвержденного диагноза карциномы желудка. Согласно системе TNM карцинома классифицируется по следующим критериям: T – первичная опухоль (оценивается степень инвазии опухоли в стенку желудка и в соседние структуры); N – региональные лимфатические узлы (оценивается

количество региональных лимфатических узлов, пораженных метастазами); M – отдаленные метастазы (оцениваются отдаленные метастазы и опухолевые клетки в асцитической жидкости). Существует классификация рака желудка по Лорен (1965 г.), согласно которой опухоли могут быть представлены кишечным, диффузным и смешанным типами [4]. Также рак желудка разделяют на виды по степени дифференцировки и локализации опухоли. Проксимальная (кардиальная) и дистальная разновидности РЖ заметно различаются по эпидемиологии, этиологии и патогенезу, при этом кардиальная форма рака желудка сходна по многим признакам с опухолями пищевода [5].

Молекулярно-генетические классификации РЖ

Прогноз при диагностике рака желудка зависит от следующих показателей: степени инвазии, наличия метастазов в лимфатических узлах, гистологического типа опухоли и стадии процесса. Но даже для опухолей-«двойников», имеющих аналогичный размер, стадию и гистотип, прогноз может очень сильно различаться. Это может быть обусловлено тем, что стандартные морфо-гистологические критерии не могут полностью предсказать течение заболевания. Проект «Атлас генома рака» (The Cancer Genome Atlas, TCGA) выполнил полномасштабное исследование 295 образцов опухолевой ткани больных раком желудка, используя методы секвенирования и биоинформатики. В результате было описано четыре молекулярных подтипа рака желудка: микросателлитная нестабильность (MSI), вирус Эпштейна-Барра (EBV), хромосомная нестабильность (CIN) и опухоли с геномной стабильностью (GS) [6]. Азиатская группа исследования рака (ACRG) установила еще одну классификацию на основе транскриптомного опухолевого профиля. Был проанализирован уровень экспрессии мРНК 300 опухолей пациентов, на основе чего были выделены 4 подтипа: микросателлитная нестабильность (MSI), микросателлитная стабильность с признаками перехода от эпителия к мезенхиме (MSS/EMT), микросателлитная стабильность с активностью опухолевого супрессора p53 (MSS/TP53) и микросателлитная стабильность с потерей активности супрессора p53 (MSS/TP53-). Исследовательской группой Singapore–Duke была проанализирована экспрессия генов в 248 опухолях желудка и определены 3 подтипа (пролифера-

тивный, метаболический и мезенхимальный) [7].

Перечисленные молекулярные классификации рака желудка описывают основные пути патогенеза данного заболевания и облегчают поиск биомаркеров и мишеней для таргетной терапии в каждой опухоли. В таблице 1 приведены основные характеристики всех молекулярных подтипов рака желудка по четырем классификациям. Каждый подтип характеризуется специфическими генными мутациями и изменениями в сигнальных путях, а также прогнозом и реакцией на химиотерапию.

Одной из первостепенных задач является исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе патогенеза рака желудка, с целью разработки новых методов лечения, которые могут улучшить выживаемость пациентов. Ряд химических и генетически модифицированных мышинных моделей рака желудка позволили получить значительное представление о вкладе генетических и экологических факторов в начало и прогрессирование заболевания.

Индукцированные мышинные модели рака желудка

N-нитрозосоединения (N-нитро-N-нитрозогуанидин (MNNG) и N-нитрозо, N-метил-N-нитрозо мочевины (MNU)) – химические канцерогены, добавление которых в питьевую воду индуцирует у грызунов аденокарциному желудка. Применение MNNG приводит к аденоматозным опухолям только в железистом эпителии желудка. При этом MNNG и MNNG вызывают аденокарциномы в слизистой оболочке антрального отдела и редко в нормальной слизистой дна желудка [8; 9]. Бутилированный гидроксианизол (BHA), антиоксидант, использующийся в пищевых консервантах, при введении в рацион грызунам в течение 2-х лет вызывал увеличение гиперплазии и папиллом в кардиальном отделе желудка [10]. Также в качестве канцерогена применялся этилендибромид (EDB) – почвенный, зерновой фумигант, который при введении крысам и мышам способствовал онкогенезу в кардиальном отделе желудка [11].

После того, как Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила *H. pylori* одним из канцерогенов I класса, стала актуальной разработка правильной модели животного *in vivo* с целью изучения механизмов патогенеза данного возбудителя *H. felis*, близкий родственник *H. pylori*, выделенный из желудка кошки, колонизирует слизистую

оболочку желудка мыши и образует лимфомы желудка с несколько сходными паттернами заболевания человека. Хотя эти модели предоставляли исходные, очень важные экспериментальные данные, они полностью не имитировали процесс заражения человека *H. pylori*. В литературе сообщалось о нескольких адаптированных к мышам штаммах *H. pylori* с различными генотипическими комбинациями (SS1 и AM1) [12]. Большая часть исследований в настоящее время сосредоточена на профилактическом эффекте эрадикации *H. pylori*. Было показано, что эрадикация хеликобактера у мышей может быть полезна для профилактики рака желудка, даже если она проводится относительно поздно в естественной истории заболевания [13].

В 6–16 % случаев рак желудка во всем мире ассоциирован с вирусом Эпштейна-Барра (ВЭБ) и характеризуется уникальными морфо-фенотипическими особенностями. В целях исследования механизмов ВЭБ-индуцированного рака желудка (ВЭБ-ГК), исследователи разработали модели приживления ВЭБ с использованием инфицированных эпителиальных клеточных линий. Полученные ксенографты показывали умеренно дифференцированные карциномы без образования желез и областей некроза [14].

Генно-модифицированные мышинные модели РЖ

Появление генно-модифицированных моделей мышей обязано технологиям переноса генов и позволяет исследовать значение различных специфических генетических путей в онкогенезе: аномальную экспрессию факторов роста и цитокинов, мутации в локусах онкогенов и генов-супрессоров опухоли. Трансгенная мышь – это животное, в геноме которого присутствует искусственно введенный чужеродный ген (трансген), оно используется чаще всего для изучения последствий чрезмерной экспрессии генов. У нокаутной мыши из организма удаляют или делают неработоспособными определенные гены. Трансгенные и нокаутные мыши, инфицированные *Helicobacter* и получающие лечение канцерогенами, развивают предраковые и раковые поражения и используются в изучении функции генов и разработке экспериментальной терапии [15].

Трансгенная мышь INS-GAS содержит два экзона гена гастрин человека, которые кодируют предшественник прогастрина под контролем про-

мотора инсулина. Данная модель была использована для изучения влияния гастринна на развитие рака желудка. У мышей INS-GAS наблюдалось увеличение максимальной секреции желудочной кислоты и увеличение количества париетальных клеток. В возрасте 20 мес. у мышей INS-GAS на-

блюдались метаплазия, дисплазия и рак желудка [16]. Заражение мышей INS-GAS *H. felis* или *H. pylori* приводило к ускоренному канцерогенезу (через 7 мес. после заражения) [17].

У гастрин-нокаутных мышей (Gastrin knockout mice, GAS^{-/-}) отсутствует секреция кислоты желу-

Таблица 1. Классификации молекулярных подтипов рака желудка человека				
Молекулярная классификация TCGA (The Cancer Genome Atlas) рака желудка				
Молек. п/тип	Молекулярные характеристики	Локализация	Пол/ возраст/ прогноз/ терапия	Тип по классификации Лорен
MSI	<ul style="list-style-type: none"> Гиперметилирование промотора MLH1 Высокая частота мутаций в генах PIK3CA, KRAS/NRAS, JAK2, ERBB3, ERBB2 и EGFR Изменения в двух основных генах комплекса гистосовместимости 1 класса (B2M и HLA-B) 		Женщины/ пожилой возраст/ лучший прогноз/меньшая частота метастазирования лимф. узлов	Кишечный подтип
EBV	<ul style="list-style-type: none"> Гиперметилирование ДНК (гиперметилирование промотора CDKN2A) Мутации в генах PIK3CA, ARID1A и гене корепрессора В-клеточной лимфомы 6 Амплификация PD-L1/2 и JAK2 Активация сигнальных путей иммунных клеток 	Дно и тело желудка	Мужчины/ худший прогноз	
CIN	<ul style="list-style-type: none"> Активация рецепторной тирозинкиназы сигнальных путей (RTK)/RAS Амплификация MET, EGFR, HER2 и FGFR2 Высокая частота мутаций TP53 Изменения в генах-супрессорах опухолей SMAD 4 и APC 	Область желудочно-пищеводного перехода и кардия желудка	Наибольшая польза от адьювантной химиотерапии	Кишечный тип
GS	<ul style="list-style-type: none"> Мутации в генах CDH1 и RHO-family GTPase (RAS) Активация ангиогенеза и клеточной адгезии (E-cadherin) Слияние генов CLDN18/ARHGAP 		Молодой возраст/ лучший прогноз/ наименьшая польза от адьювантной химиотерапии	Диффузный тип
Молекулярная классификация ACRG (Asian Cancer Research Group) рака желудка				
Молек. п/тип	Молекулярные характеристики	Локализация	Прогноз/ частота рецидивов/ диагностика	Тип по классификации Лорен
MSI	<ul style="list-style-type: none"> Мутации в генах путей KRAS, ALK, ARID1A и PI3K 	Антральный отдел желудка	Лучший прогноз/самая низкая частота рецидивов/ диагностируется на ранних стадиях (I-II)	Кишечный тип
MSS/ EMT	<ul style="list-style-type: none"> Потеря экспрессии CDH1 Снижение количества мутаций по сравнению с другими подтипами 		Наихудший прогноз/ самая высокая частота рецидивов/ диагностируется на поздних стадиях	Диффузный тип
MSS/ TP53	<ul style="list-style-type: none"> Ассоциирован с EBV инфекцией Мутации в генах APC, ARID1A, KRAS, PIK3CA и SMAD4 			
MSS/ TP53-	<ul style="list-style-type: none"> Высокая частота мутаций TP53 Амплификация HER2, EGFR, циклина E1 (CCNE1), CCND1, MDM2, Robo2, GATA6 и MYC 			

дочного сока и вследствие этого изменена архитектура желудка и снижено количество париетальных клеток. В возрасте 12 мес. у этих мышей развиваются спонтанные опухоли антрального отдела желудка, ассоциированные с избыточным ростом бактерий и воспалением [18].

Чтобы исследовать путь Wnt в канцерогенезе желудка были созданы трансгенные мыши K19-Wnt1, которые экспрессируют Wnt1 в слизистой оболочке желудка. Мыши K19-Wnt1 были скрещены с трансгенными мышами K19-C2mE, чтобы изучить влияние Wnt и PGE2 на канцерогенез желудка [19].

Ингибитор циклин-зависимой киназы (CDK) p27KIP1 играет важную роль в регуляции клеточного цикла и связан со многими злокачественными новообразованиями. У нокаутных мышей p27KIP1 развивается легкая гиперплазия желудка, случайные очаги умеренной метаплазии и атипии или дисплазии низкой степени. После инфицирования *H. pylori*, у этих мышей наблюдается кишечная метаплазия, высокосортная интраэпителиальная неоплазия желудка, полипоидные аденомы и

иногда карцинома *in situ* или внутримукозальная карцинома. Таким образом, мышь с дефицитом p27KIP1 является полезной моделью для изучения патогенеза *H. pylori* в канцерогенезе желудка и для тестирования стратегий эрадикации и химиопрофилактики [20].

IL-1 β -трансгенные мыши имеют в своем геноме чужеродный человеческий ген интерлейкина-1 β , усиление продукции которого приводит к риску развития гипохлоргидрии, индуцированной *H. pylori*, и рака желудка. В условиях инфекции *H. felis* у этих мышей наблюдается ускоренное развитие воспаления желудка и карциномы по сравнению с контрольными мышами. Также наблюдается снижение рекрутирования макрофагов и нейтрофилов при инфекции *H. pylori* и снижение активации NF- κ B [21].

Трансгенные мыши COX-2, полученные на генетическом фоне C57BL/6, экспрессирующие полную человеческую кДНК COX-2, показали повышенную частоту MNU-индуцированного рака желудка [22].

Таблица 1. Классификации молекулярных подтипов рака желудка человека (продолжение)

Молекулярная классификация рака желудка Singapore-Duke			
Молек. п/ тип	Молекулярные характеристики	Чувствительность к терапии	Тип по классификации Лорен
Пролiferативный	<ul style="list-style-type: none"> Повышенная экспрессия генов клеточного цикла Частые мутации гена TP53 Гипометилирование ДНК Активация генов E2F, MYC и RAS 		Кишечный тип
Метаболический	<ul style="list-style-type: none"> Повышенная регуляция генов метаболизма и пищеварения Гиперактивация спазмолитико-полипептид-экспрессирующего пути метаплазии 	Чувствителен к 5-фторурацилу	
Мезенхимальный	<ul style="list-style-type: none"> Повышенная экспрессия генов, связанных с клеточной адгезией, с взаимодействием внеклеточного матрикса с рецептором, фокальной адгезией и активацией путей EMT и раковых стволовых клеток Изменения в p53, TGFβ, VEGF, NF-κB, mTOR и Shh сигнальных путей 	Чувствителен к ингибиторам PI3K/AKT/mTOR	Диффузный тип
Классификация внутренних подтипов рака желудка (Tan, et al.)			
Молек. п/ тип	Молекулярная характеристика	Прогноз/чувствительность к терапии	Тип по классификации Лорен
G-INT	<ul style="list-style-type: none"> Высокая экспрессия генов углеводного и белкового обмена (FUT2) и клеточной адгезии (LGALS4, CDH17) 	Благополучный прогноз/Чувствителен к 5-ФУ и оксалиплатину	Кишечный тип
G-DIF	<ul style="list-style-type: none"> Высокая экспрессия генов клеточной пролиферации (AURKB) и метаболизма жирных кислот (ELOVL5) 	Плохой прогноз/Чувствителен к цисплатину	Диффузный тип

Мутации гена K-ras обнаруживаются при раке желудка диффузного (6 %) и кишечного (18 %) типа. K-ras-трансгенные мыши с системной активацией K-ras характеризуются изменениями в клеточном гомеостазе желудка, истощением париетальных клеток, повышением уровня фактора воспалительного ответа (COX-2), маркера стволовых клеток (Dcamk1, CD44), активированного пути MAPK, а также гиперпролиферацией плоского эпителия в кардии желудка и метаплазией в железистом желудке, напоминающей пренеопластические изменения, которые происходят во время канцерогенеза желудка у человека. Это предполагает, что мутантная сигнализация K-ras модулирует важные молекулярные события в иницированном канцерогенезе желудка [23].

Tff1-нокаутные мыши (Tff1^{-/-}) – мыши, у которых нокаутирован ген-супрессор опухоли фактор 1 трилистника. Экспрессия TFF1 часто теряется при карциномах желудка и приводит к активации сигнального пути β-катенина и AKT-GSK3β. У гомозиготных мутантных мышей Tff1 (Tff1^{-/-}) развивается антропилорическая аденома и даже мультифокальные карциномы, что согласуется с повышенными показателями воспаления. Мыши Tff1^{+/-} применяются для исследований гетерозиготности генов и регуляции транскриптов [24].

Ксеногенные модели РЖ

Доклиническая фаза исследования рака желудка должна включать модели *in vivo*, которые достаточно точно имитируют клиническую ситуацию в организме человека. Для продвижения концепции прецизионной медицины были разработаны ксеногенные модели рака желудка, способные воспроизводить гистологические и геномные особенности опухоли пациента и предсказывать реакцию на исследуемые противоопухолевые препараты. В создании экспериментальных моделей рака желудка применяются специальные безтимусные мыши линии Bald/c nude с мутацией в гене Foxp1 [25]. Дефицит Т-лимфоцитов значительно ослабляет иммунитет мышей, что способствует приживлению, росту и метастазированию опухолевых клеток в ксенотрансплантатах после имплантации [26]. Однако интактный врожденный иммунитет и высокая активность NK-клеток могут ограничивать скорость приживления большинства первичных солидных опухолей. Также в экспериментальной онкологии используют мышей с

тяжелыми комбинированными иммунодефицитами по Т- и В-лимфоцитам (SCID-мышей), мышей с выраженным иммунодефицитом и диабетом (NOD-SCID-мышей) и мышей с отсутствием зрелых Т-, В- и NK-клеток, дисфункцией макрофагов и дендритных клеток и сниженной активностью системы комплемента (мыши линии NOG) [27].

Ксенографты, полученные из раковых клеточных линий (*Cell-line-derived xenografts; CDX*), являются часто используемыми модельными системами в области изучения генетики рака желудка. Однако такие модели имеют ряд ограничений: невозможность воспроизведения внутриопухолевой гетерогенности и микроокружения, слабая предиктивная способность в отношении оценки эффективности медикаментозного лечения, высокоагрессивность клеточных линий и их восприимчивость к генетическим изменениям вследствие длительного культивирования *in vitro* [28].

Ксенографты, полученные от пациента (*patient-derived xenografts – PDX*), на данный момент являются лучшей доклинической моделью РЖ для проверки мишеней и предикторов ответа на терапию. Современные процедуры создания PDX-моделей включают как гетеротопические (подкожные), так и ортотопические методы трансплантации. Гетеротопические ксенографты получают путем имплантации опухолевой ткани или клеток человека в область мыши, не связанную с исходным участком опухоли, как правило, подкожно в боковую или дорсальную область или субренально. Полученные модели морфологически и биохимически схожи с первичными опухолями доноров, но при этом имеют ряд ограничений, таких как аномальное микроокружение и псевдокапсула. В крупномасштабном исследовании Takeshi Kuwata, et al. из 232 первичных опухолей пациентов с диагностированной аденокарциномой желудка были созданы 35 PDX-моделей и 32 CDX-модели. Большинство опухолей PDX показали гистологически согласованную морфологию с первичными опухолями, а более половины CDX имели гистологически подтвержденное несоответствие с первичными опухолями. Более высокий показатель приживления имели PDX, у доноров которых наблюдались поражения с метастазами в лимфатические узлы. Более чем в половине случаев в месте приживления ткани донора наблюдались лимфопролиферативные поражения, полученные из В-лимфоцитов [29]. Также в данном исследова-

нии было показано, что ни одна из подкожных PDX и CDX-моделей не развила метастатических поражений у мышей. В работе Hernandez MC, et al. была показана возможность создания подкожных моделей PDX из биопсийных образцов пациентов с нерезектабельным или метастатическим заболеванием в клинических условиях [30].

Для изучения механизмов метастазирования опухолей применяются ортотопические мышинные модели, которые создаются путем трансплантации фрагментов материала пациента в органы происхождения опухоли иммунодефицитным мышам. Техника создания ортотопического ксенотрансплантата была усовершенствована от метода «сшивания» до метода «прилипания». Illert B, et al. в 2003 г. описали методику создания ортотопического ксенографта РЖ, в которой серозная оболочка передней стенки желудка мыши удалялась скальпелем и 2–3 фрагмента опухоли донора пришивались нерассасывающимися швами. Наблюдался первичный рост опухоли у 90 % мышей и метастазы распространялись в печень (70 %), легкие (10 %) и лимфатические узлы (10 %) [31]. Jones-Bolin S со своей исследовательской группой разработал методику создания ортотопических ксенографтов путем сшивания двух фрагментов опухоли донора размером 2 × 2 мм³ с дорсальной стороной желудка мыши в средней части, используя 2–3 узла. Опухоль росла более чем у 90 % животных, а метастазы развивались в печень (40 %), лимфатические узлы (40 %) и поверхность брюшины (60 %) [32]. В 2009 г. группой ученых из Германии был предложен метод создания PDX-модели путем фиксации фрагмента опухоли донора в тканевом кармане желудка одной каплей тканевого клея. Карман был выполнен либо в подслизистой оболочке дистального отдела желудка, либо в кардии. Ортотопический рост опухоли наблюдался в 100 % случаев, метастазы распространялись в легкие, поджелудочную железу, печень, кишечник и почки [33]. В описанных выше исследованиях животных забивали, если опухоль увеличивалась в диаметре до 10 мм или ухудшалось общее состояние. Li, et al. опубликовали метод генерации PDX-модели путем «вклеивания» фрагмента опухоли в тканевую мешочек, выполненный в середине большой кривизны желудка мыши-реципиента. Наблюдалось 100 % приживление опухоли, метастазы после некропсии были обнаружены в лимфатических узлах (79 %), печени (91,5 %), поч-

ках (62,5 %) [34]. В исследовании Busuttill, et al. взяты три линии клеток рака желудка (MKN45, AGS, MKN28), 50 микролитров суспензии раковых клеток и Матригеля инокулировали в подсерозный слой антрального отдела желудка. Успешность приживления наблюдалась в 76 % случаев, метастазы были обнаружены в грудной и брюшной областях. В результате анализа вышеупомянутых работ можно сделать вывод, что скорость приживления опухоли донора и распространение метастазов не зависят от места имплантации образца в желудок.

Использование PDX-моделей рака желудка в разработке молекулярной таргетной терапии

Отсутствие стандартных стратегий химиотерапии и низкий уровень общей выживаемости создают потребность в создании метода лечения с более специфичной противораковой эффективностью и низкой неселективной токсичностью и резистентностью. В результате молекулярно-генетических исследований рака желудка особое внимание было сосредоточено на понимании механизмов, лежащих в основе таргетной терапии прогрессирующего рака. Таргетные ингибиторы эффективно регулируют работу сигнальных путей, задействованных в процессах роста опухоли, что обеспечивает лучшую специфичность и селективность противораковой терапии. PDX-модели являются важным инструментом для скрининга пациентов, которые могут получить пользу от таргетной терапии.

В качестве мишени при таргетной терапии рака желудка в первую очередь стоит рассматривать рецептор эпидермального фактора роста (EGFR). Это трансмембранный гликопротеин, обладающий тирозинкиназной активностью. Также семейство рецепторов эпидермального фактора роста представлено другими его видами: HER2, HER3 и HER4. Эти рецепторы участвуют в активации сигнальных путей, способствующих пролиферации, дифференцировке, инвазии клеток и подавлению апоптоза. Поэтому ожидается, что препараты, нацеленные на EGFR и HER2, улучшат терапевтическую эффективность лечения рака желудка. Примером может служить препарат Цетуксимаб (Cetuximab), который представляет собой моноклональное антитело и специфически связывается с внеклеточным доменом EGFR. В китайском исследовании Wang X, et al.

было обнаружено, что число копий гена EGFR является прогностическим биомаркером эффективности цетуксимаба в модели PDX рака желудка [35]. Моноклональное антитело, ингибирующее формирование лигандзависимых гетеродимеров рецептора HER2 с другими представителями семейства – пертузумаб в сочетании с трастузумабом, капецитабином и цисплатином, – демонстрируют выраженную антипролиферативную и противоопухолевую активность на ксенографтных моделях рака желудка в гиперэкспрессией HER2. Трастузумаб, в свою очередь, является гуманизированным моноклональным антителом, связывающимся с рецептором HER2 для устранения или снижения активности рецептора [36]. Доклинические исследования показали, что пертузумаб в сочетании с трастузумабом усиливает противоопухолевый эффект в модели HER2-позитивного ксенотрансплантата рака желудка [37].

В исследованиях было обнаружено, что нарушение регуляции сигнального пути MET происходит при раке желудка, что коррелирует с плохими клиническими исходами и лекарственной устойчивостью. При этом препарат волиитиниб (ингибитор EGFR) демонстрирует сильную противоопухолевую активность в моделях PDX с избыточной экспрессией MET и pMET путем ингибирования пути PI3K/mTOR. Кроме того, на пяти моделях PDX с различным уровнем экспрессии или амплификации EGFR была оценена эффективность двух моноклональных антител EGFR (BK011 и цетуксимаба). И BK011, и цетуксимаб индуцировали полную регрессию модели PDX с амплификацией EGFR [38].

Недавние исследования показали, что монотерапия афатинибом – селективным необратимым ингибитором протеинкиназы рецепторов семейства ErbB – приводила к регрессии HER2-амплифицированного РЖ за счет пролонгирования ингибирования HER3 и EGFR, что превосходило монотерапию трастузумабом. В работе Zuhua Chen et al. было показано, что модели PDX РЖ с амплификацией EGFR, сверхэкспрессией EGFR или амплификацией HER2 поддаются лечению афатинибом. Афатиниб является ингибитором рап-HER; поэтому необходимы дальнейшие исследования, чтобы определить, эффективен ли афатиниб у пациентов с изменениями в семействе EGFR [39].

Лапатиниб является двойным ингибитором тирозинкиназных рецепторов 1 и 2 типа (ErbB1 и ErbB2). Модели PDX с высокой плотностью микрососудов более чувствительны к афатинибу по сравнению с другими моделями с низкой экспрессией CD31 [40].

Нарушение регуляции клеточного цикла при РЖ встречается довольно часто, при этом наблюдается амплификация генов CCNE1, CCND1 и CDK4/6. В этом случае могут применяться ингибиторы циклинзависимых киназ. Было показано, что ингибитор CDK1/2/9 AZD5438 оказывал значительное ингибирование опухоли в двух моделях PDX с высоким числом копий CCNE1 [41].

Таким образом, PDX являются универсальными моделями для оценки потенциальных таргетных молекул и служат инструментом скрининга пациентов для таргетной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По мере развития прецизионной медицины молекулярно-ориентированные терапевтические стратегии должны быть индивидуализированы для больных раком. При создании доклинических моделей важно проводить оценку дифференцировки и классификации ксенотрансплантатов по Лорен, так как изменения этих характеристик могут приводить к сдвигу генетических и гистопатологических параметров ксенотрансплантатов по отношению к первичной опухоли. Причиной таких изменений является высокая гетерогенность рака желудка. Мышиные модели являются важной экспериментальной платформой (инструментом) для изучения молекулярных механизмов возникновения и развития рака желудка, а также для скрининга и тестирования эффективности новых таргетных препаратов, которые воздействуют целенаправленно на опухолевые клетки, практически не оказывая повреждающего действия на нормальные ткани. Дальнейшее изучение молекулярных особенностей патогенеза РЖ и использование ксеногенных, «аватарных», моделей мышей для предсказания реакции на исследуемые препараты в опухолях пациентов должно внести существенный вклад в развитие трансляционной медицины.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
2. Hays T. Review on Gastric Cancer. *NACS*. 2019 Aug 2;3(1):1–2. <https://doi.org/10.31031/NACS.2019.03.000555>
3. Захаренко А. А., Вовин К. Н., Беляев М. А., Трушин А. А., Рыбальченко В. А., Купенская Т. В. Рак желудка: диагностика и лечение: метод. пособие. СПб.: РИЦ ПСПбГМУ, 2018. 36 с.
4. Кит О. И. Нейроэндокринные, клинические и морфологические аспекты рака желудка. Ростов-на-Дону, Новочеркасск: Лик, 2014. 224 с.
5. Sano T, Coit DG, Kim HH, Roviello F, Kassab P, Wittekind C, et al. Proposal of a new stage grouping of gastric cancer for TNM classification: International Gastric Cancer Association staging project. *Gastric Cancer*. 2017 Mar;20(2):217–225. <https://doi.org/10.1007/s10120-016-0601-9>
6. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014 Sep 11;513(7517):202–209. <https://doi.org/10.1038/nature13480>
7. De Re V. Molecular Features Distinguish Gastric Cancer Subtypes. *Int J Mol Sci*. 2018 Oct 11;19(10):E3121. <https://doi.org/10.3390/ijms19103121>
8. Abe M, Yamashita S, Kuramoto T, Hirayama Y, Tsukamoto T, Ohta T, et al. Global expression analysis of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced rat stomach carcinomas using oligonucleotide microarrays. *Carcinogenesis*. 2003 May;24(5):861–867. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg030>
9. Tatematsu M, Ogawa K, Hoshiya T, Shichino Y, Kato T, Imaida K, et al. Induction of adenocarcinomas in the glandular stomach of BALB/c mice treated with N-methyl-N-nitrosourea. *Jpn J Cancer Res*. 1992 Sep;83(9):915–918. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1992.tb01999.x>
10. Ito N, Fukushima S, Tsuda H. Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and other antioxidants. *Crit Rev Toxicol*. 1985;15(2):109–150. <https://doi.org/10.3109/10408448509029322>
11. Moch RW. Forestomach lesions induced by butylated hydroxyanisole and ethylene dibromide: a scientific and regulatory perspective. *Toxicol Pathol*. 1988;16(2):172–183. <https://doi.org/10.1177/019262338801600210>
12. Dey TK, Karmakar BC, Sarkar A, Paul S, Mukhopadhyay AK. A Mouse Model of Helicobacter pylori Infection. *Methods Mol Biol*. 2021;2283:131–151. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1302-3_14
13. Zhang S, Lee DS, Morrissey R, Aponte-Pieras JR, Rogers AB, Moss SF. Early or late antibiotic intervention prevents Helicobacter pylori-induced gastric cancer in a mouse model. *Cancer Lett*. 2014 Dec 1;355(1):106–112. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.010>
14. Oh ST, Cha J-H, Shin D-J, Yoon SK, Lee SK. Establishment and characterization of an in vivo model for Epstein-Barr virus positive gastric carcinoma. *J Med Virol*. 2007 Sep;79(9):1343–1348. <https://doi.org/10.1002/jmv.20876>
15. Yang Z-R, Chen Z-G, Du X-M, Li Y. Apatinib Mesylate Inhibits the Proliferation and Metastasis of Epithelioid Malignant Peritoneal Mesothelioma In Vitro and In Vivo. *Front Oncol*. 2020;10:585079. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.585079>
16. Wang TC, Koh TJ, Varro A, Cahill RJ, Dangler CA, Fox JG, et al. Processing and proliferative effects of human progastrin in transgenic mice. *J Clin Invest*. 1996 Oct 15;98(8):1918–1929. <https://doi.org/10.1172/JCI118993>
17. Fox JG, Rogers AB, Ihrig M, Taylor NS, Whary MT, Dockray G, et al. Helicobacter pylori-associated gastric cancer in INS-GAS mice is gender specific. *Cancer Res*. 2003 Mar 1;63(5):942–950.
18. Zavros Y, Eaton KA, Kang W, Rathinavelu S, Katukuri V, Kao JY, et al. Chronic gastritis in the hypochlorhydric gastrin-deficient mouse progresses to adenocarcinoma. *Oncogene*. 2005 Mar 31;24(14):2354–2366. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208407>
19. Oshima H, Matsunaga A, Fujimura T, Tsukamoto T, Taketo MM, Oshima M. Carcinogenesis in mouse stomach by simultaneous activation of the Wnt signaling and prostaglandin E2 pathway. *Gastroenterology*. 2006 Oct;131(4):1086–1095. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.07.014>
20. Chien W-M, Garrison K, Caufield E, Orthel J, Dill J, Fero ML. Differential gene expression of p27Kip1 and Rb knockout pituitary tumors associated with altered growth and angiogenesis. *Cell Cycle*. 2007 Mar 15;6(6):750–757. <https://doi.org/10.4161/cc.6.6.3986>
21. Shigematsu Y, Niwa T, Rehnberg E, Toyoda T, Yoshida S, Mori A, et al. Interleukin-1 β induced by Helicobacter pylori infection enhances mouse gastric carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2013 Oct 28;340(1):141–147. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.07.034>
22. Leung WK, Wu K, Wong CYP, Cheng ASL, Ching AKK, Chan AWH, et al. Transgenic cyclooxygenase-2 expression and high salt

enhanced susceptibility to chemical-induced gastric cancer development in mice. *Carcinogenesis*. 2008 Aug;29(8):1648–1654. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn156>

23. Matkar SS, Durham A, Brice A, Wang TC, Rustgi AK, Hua X. Systemic activation of K-ras rapidly induces gastric hyperplasia and metaplasia in mice. *Am J Cancer Res*. 2011 Apr 1;1(4):432–445.

24. Tomita H, Takaishi S, Menheniott TR, Yang X, Shibata W, Jin G, et al. Inhibition of gastric carcinogenesis by the hormone gastrin is mediated by suppression of TFF1 epigenetic silencing. *Gastroenterology*. 2011 Mar;140(3):879–891. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.11.037>

25. Szadvari I, Krizanova O, Babula P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. *Physiol Res*. 2016 Dec 21;65(Suppl 4):S441–S453. <http://doi.org/10.33549/physiolres.933526>

26. Stakleff KDS, Von Gruenigen VE. Rodent models for ovarian cancer research. *Int J Gynecol Cancer*. 2003 Aug;13(4):405–412. <http://doi.org/10.1136/ijgc-00009577-200307000-00002>

27. Cespedes MV, Casanova I, Parreño M, Manges R. Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. *Clin Transl Oncol*. 2006 May;8(5):318–329. <https://doi.org/10.1007/s12094-006-0177-7>

28. Кит С. И., Максимов П. А., Гончарова А. С., Лукбанова Е. А., Карнаухов Н. С., Непомнящая Е. М. и др. Создание пациентоподобной модели рака пищевода на иммунодефицитных мышах. *Сибирский онкологический журнал*. 2020;19(2):70–75. <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2020-19-2-70-75>

29. Kuwata T, Yanagihara K, Iino Y, Komatsu T, Ochiai A, Sekine S, et al. Establishment of Novel Gastric Cancer Patient-Derived Xenografts and Cell Lines: Pathological Comparison between Primary Tumor, Patient-Derived, and Cell-Line Derived Xenografts. *Cells*. 2019 Jun 14;8(6):E585. <https://doi.org/10.3390/cells8060585>

30. Hernandez MC, Bergquist JR, Leiting JL, Ivanics T, Yang L, Smoot RL, et al. Patient-Derived Xenografts Can Be Reliably Generated from Patient Clinical Biopsy Specimens. *J Gastrointest Surg*. 2019 Apr;23(4):818–824. <https://doi.org/10.1007/s11605-019-04109-z>

31. Illert B, Otto C, Thiede A, Timmermann W. Detection of disseminated tumor cells in nude mice with human gastric cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20(6):549–554. <https://doi.org/10.1023/a:1025862800798>

32. Jones-Bolin S, Ruggeri B. Orthotopic models of human gastric carcinoma in nude mice: applications for study of tumor growth and progression. *Curr Protoc Pharmacol*. 2007 Jun;Chapter 14:Unit 14.4. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph1404s37>

33. Bhargava S, Hotz B, Buhr HJ, Hotz HG. An orthotopic nude mouse model for preclinical research of gastric cardia cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2009 Jan;24(1):31–39. <https://doi.org/10.1007/s00384-008-0584-z>

34. Busuttill RA, Liu DS, Di Costanzo N, Schröder J, Mitchell C, Boussioutas A. An orthotopic mouse model of gastric cancer invasion and metastasis. *Sci Rep*. 2018 Jan 16;8(1):825. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19025-y>

35. Wang X, Fu R, Hu Y, Du H, Li S, Li Z, et al. EGFR gene status predicts response and survival benefit in a preclinical gastric cancer trial treating patient derived xenografts with cetuximab. *Oncol Rep*. 2017 Oct;38(4):2387–2393. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5907>

36. Kang Y-K, Rha SY, Tassone P, Barriuso J, Yu R, Szado T, et al. A phase IIa dose-finding and safety study of first-line pertuzumab in combination with trastuzumab, capecitabine and cisplatin in patients with HER2-positive advanced gastric cancer. *Br J Cancer*. 2014 Aug 12;111(4):660–666. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.356>

37. Yamashita-Kashima Y, Iijima S, Yorozu K, Furugaki K, Kurasawa M, Ohta M, et al. Pertuzumab in combination with trastuzumab shows significantly enhanced antitumor activity in HER2-positive human gastric cancer xenograft models. *Clin Cancer Res*. 2011 Aug 1;17(15):5060–5070. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2927>

38. Chen Z, Huang W, Tian T, Zang W, Wang J, Liu Z, et al. Characterization and validation of potential therapeutic targets based on the molecular signature of patient-derived xenografts in gastric cancer. *J Hematol Oncol*. 2018 Feb 13;11(1):20. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0563-y>

39. Chen Z, Liu Z, Zhang M, Huang W, Li Z, Wang S, et al. EPHA2 blockade reverses acquired resistance to afatinib induced by EPHA2-mediated MAPK pathway activation in gastric cancer cells and avatar mice. *Int J Cancer*. 2019 Nov 1;145(9):2440–2449. <https://doi.org/10.1002/ijc.32313>

40. Roskoski R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res*. 2014 Jan;79:34–74. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.11.002>

41. Byth KF, Thomas A, Hughes G, Forder C, McGregor A, Geh C, et al. AZD5438, a potent oral inhibitor of cyclin-dependent kinases 1, 2, and 9, leads to pharmacodynamic changes and potent antitumor effects in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther*. 2009 Jul;8(7):1856–1866. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0836>

Информация об авторах:

Киблицкая Александра Андреевна [✉] – научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9337-5535>, SPIN: 2437-4102, AuthorID: 610872

Карасев Тимофей Сергеевич – ординатор ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5071-2028>

Гончарова Анна Сергеевна – к.б.н., заведующая испытательным лабораторным центром ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0676-0871>, SPIN: 7512-2039, AuthorID: 553424

Максимов Алексей Юрьевич – д.м.н., профессор, заместитель генерального директора по перспективным научным разработкам ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1397-837X>, SPIN: 7322-5589, AuthorID: 710705

Вклад авторов:

Киблицкая А. А. – сбор, анализ и интерпретация данных, написание текста;

Карасев Т. С. – написание текста, техническое редактирование;

Гончарова А. С. – научное редактирование;

Максимов А. Ю. – научное редактирование.