

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ВЛИЯНИЕ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ НА ОРТОТОПИЧЕСКУЮ PDX-МОДЕЛЬ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПИЩЕВОДА ЧЕЛОВЕКА

А. А. Киблицкая [✉], А. С. Гончарова, А. Е. Анисимов, А. В. Снежко, С. Н. Димитриади, А. А. Маслов, Ю. А. Геворкян, Е. Н. Колесников

Национальный медицинский исследовательский центр онкологии, Ростов-на-Дону, Россия

Аденокарцинома пищевода развивается, как правило, в нижней части органа. Продолжительность жизни и выживаемость при данном заболевании зависят от стадии патологического процесса и состояния здоровья пациента. Наиболее успешный метод для лечения аденокарциномы пищевода — химиолучевая терапия. Проблема подбора оптимальных доз облучения для получения максимального эффекта по сей день актуальна. Целью исследования было изучить эффективные дозы и оценить противоопухолевую активность лучевой терапии на ортотопическом PDX аденокарциномы пищевода человека. Исследование провели на самках мышей линии Balb/c nude ($n = 25$). Ортотопическую трансплантацию осуществляли путем имплантации образцов опухоли пациента в шейный отдел пищевода иммунодефицитной мыши. Лучевое воздействие на ортотопические ксенографты исследовали в 3 этапа с кратностью облучения 1 раз в дозах 4, 6, 8 и 10 Гр. По результатам гистологического анализа ксенографты 1-й генерации воспроизводили основные морфологические характеристики опухоли пациента. Оценка динамики роста объемов опухолевых узлов экспериментальных животных позволяет сделать вывод, что у животных, облученных в однократной дозе 6, 8 или 10 Гр, средние значения объемов опухолевых узлов статистически значимо отличались ($p \leq 0,01$) от значений в контрольной группе после каждой из трех процедур лучевого воздействия. По расчетам показателя торможения роста опухоли при суммарной дозе 18 Гр наблюдали значительное подавление роста опухоли. Дальнейшее повышение дозы лучевого воздействия было неэффективно. Установили, что снижение объемов опухолевых узлов в ксенографтах коррелирует с увеличением разовой дозы, при этом суммарная доза более 18 Гр пагубно влияет на систему кроветворения и биохимические показатели крови мышей.

Ключевые слова: аденокарцинома пищевода, ортотопический ксенографт, лучевая терапия, PDX-модель, иммунодефицитная мышь

Вклад авторов: А. А. Киблицкая — обработка материала, написание текста, техническое редактирование, оформление библиографии, подготовка иллюстраций; А. С. Гончарова, А. А. Маслов — концепция и дизайн исследования, подготовка статьи; А. Е. Анисимов — концепция и дизайн исследования, подготовка статьи, сбор, анализ и интерпретация данных, написание текста; А. В. Снежко — научное редактирование, подготовка статьи; С. Н. Димитриади — анализ и интерпретация данных, техническое редактирование; Ю. А. Геворкян — научное редактирование; Е. Н. Колесников — научное редактирование, техническое редактирование

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено с соблюдением требований Хельсинкской декларации; условия содержания животных соответствовали стандартам работы с животными; все хирургические манипуляции в эксперименте были выполнены с соблюдением «Правил проведения работ с использованием лабораторных животных». От пациентов было получено письменное информированное согласие на передачу биологического материала.

✉ **Для корреспонденции:** Александра Андреевна Киблицкая
ул. 14-я линия, д. 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия; kibaleand@gmail.com

Статья получена: 16.09.2021 **Статья принята к печати:** 04.10.2021 **Опубликована онлайн:** 20.10.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.047

ANTITUMOR EFFECT OF RADIATION THERAPY ON ORTHOTOPIC PDX MODELS OF HUMAN ESOPHAGEAL ADENOCARCINOMA

Kiblitckaya AA [✉], Goncharova AS, Anisimov AE, Snezhko AV, Dimitriadi SN, Maslov AA, Gevorkyan YA, Kolesnikov EN

National Medical Research Center for Oncology, Rostov-on-Don, Russia

As a rule, esophageal adenocarcinoma develops in the lower esophagus. Life expectancy and survival rates depend on the cancer stage and the general health of the patient. Chemoradiotherapy is the most successful treatment approach to this type of cancer. The choice of optimal radiation doses for achieving the best possible therapeutic effect is still a challenge. The aim of this paper was to study effective radiation doses and assess response of human esophageal adenocarcinoma to radiation using a PDX model. The study was conducted in female Balb/c nude mice ($n = 25$). Fragments of the donor tumor were implanted into the cervical esophagus of immunodeficient mice. Effects of radiation on the obtained orthotopic xenografts were studied after each of 3 irradiation sessions (4, 6, 8, and 10 Gy in each of the experimental groups, respectively). First-passage xenografts reproduced the morphology of the donor tumor. The mean tumor volume differed significantly between the control group and the experimental groups exposed to 6, 8 or 10 Gy ($p \leq 0.01$) after each irradiation session. Tumor growth delay was significant after exposure to the total dose of 18 Gy. The further radiation dose increase was ineffective. The reduction of tumor volume in the xenografts was correlated to the increase in the one-time radiation dose. The total dose over 18 Gy produced a detrimental effect on the hematopoietic system and blood biochemistry of the experimental mice.

Keywords: esophageal adenocarcinoma, orthotopic xenograft, radiotherapy, PDX-model, immunodeficient mouse

Author contribution: Kiblitckaya AA — data processing, manuscript preparation, technical editing, reference list, figures; Goncharova AS, Maslov AA — study concept and design, manuscript preparation; Anisimov AE — study concept and design, manuscript preparation, data acquisition, analysis and interpretation; Snezhko AV — content editing, manuscript preparation; Dimitriadi SN — data analysis and interpretation, technical editing; Gevorkyan YA — content editing; Kolesnikov EN — content and technical editing.

Ethical standards: the study fully complied with the principles of the Declaration of Helsinki; all requirements for animal housing were met; surgical interventions were conducted following the guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals. The donors provided informed consent for their biological samples to be used in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexandra A. Kiblitckaya
14 Liniya, 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia; kibaleand@gmail.com

Received: 16.09.2021 **Accepted:** 04.10.2021 **Published online:** 20.10.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.047

Рак пищевода (РП) считается одним из наиболее агрессивных злокачественных новообразований и занимает ведущие позиции по заболеваемости и смертности во всем мире [1]. Пятилетняя выживаемость пациентов после момента постановки диагноза РП составляет примерно 10–15%, что объясняется высокой степенью метастазирования данной нозологии в лимфатические узлы [2]. К факторам риска развития РП относятся: употребление очень горячей или холодной пищи и напитков, курение, злоупотребление алкоголем, вдыхание токсических газов, употребление питьевой воды с содержанием тяжелых металлов, проглатывание едких веществ [3].

РП представлен в основном двумя гистологическими подтипами: плоскоклеточный рак и аденокарцинома пищевода (АП) [4]. В России чаще всего диагностируется плоскоклеточный рак пищевода, реже — аденокарцинома. В последние годы наблюдается тенденция к увеличению заболеваемости аденокарциномой, которая локализуется преимущественно в дистальной части пищевода и пищеводно-желудочном переходе [5, 6]. Основной особенностью АП в отличие от плоскоклеточной карциномы является раннее метастазирование в регионарные лимфатические узлы и субсерозное распространение с вовлечением салъниковой сумки. Печеночные метастазы наблюдаются редко [7]. Также АП распространяется в подслизистую оболочку грудного отдела пищевода с инвазией в диафрагму, плевру и перикард. Для АП часто характерен экзофитный рост, что значительно затрудняет хирургическое лечение и делает его малоэффективным [8].

На сегодняшний день наиболее удовлетворительным подходом к лечению рака шейного отдела пищевода является химиолучевая терапия. Хирургическое вмешательство при данной локализации опухоли включает в себя экстирпацию органа с формированием фарингогастроанастомоза, что часто приводит к послеоперационным осложнениям и ухудшению состояния больного. Пятилетняя выживаемость пациентов после курса химиолучевого лечения составляет 27% [9]. В схемы терапии рака пищевода может входить как дистанционная лучевая терапия, так и облучение контактным методом (брахитерапия). Лучевую терапию могут назначать до и после операции или комбинировать с химиотерапией. При этом приборная база, а также сама методология проведения лучевой терапии претерпели значительные усовершенствования. Несмотря на это проблема развития радиорезистентности опухолей, включая РП различных гистотипов, остается нерешенной.

Использование высоких доз лучевого воздействия теоретически подразумевает повышение вероятности цитотоксического эффекта. На практике это приводит к интоксикации организма продуктами распада опухоли и нарушению гомеостаза организма. Поэтому вопрос о способах и оптимальных дозах облучения с целью получения максимального противоопухолевого эффекта с наименьшими побочными осложнениями остается актуальным.

Одним из факторов, препятствующих повышению эффективности лечения АП человека, является отсутствие надежных доклинических моделей для трансляционных исследований [10]. Традиционные экспериментальные модели, такие как ксенотрансплантаты клеточных линий, введенные подкожно либо в стенку пищевода иммунодефицитным мышам, не воспроизводят сложной внутриопухолевой гетерогенности биоматериала донора [11], поэтому ксенотрансплантаты, полученные от пациентов

(patient-derived xenograft, PDX), являются перспективными модельными организмами для исследования новых терапевтических стратегий лечения рака [12].

При создании PDX-модели фрагмент опухоли донора имплантируют в организм иммунодефицитной мыши [13]. В трансляционных исследованиях рака используют специальных бестимусных мышей линии Balb/c nude, характерной особенностью которых является мутация в гене Foxp1 [14, 15]. Ослабление иммунитета по причине дефицита Т-лимфоцитов значительно облегчает приживление и метастазирование опухолевых клеток в ксенотрансплантатах после имплантации [16]. Модели PDX сохраняют морфологические характеристики и гетерогенность первичной опухоли донора и вследствие этого чувствительность к лечению может быть спрогнозирована лучше, чем с помощью ксенотрансплантатов клеточных линий [17]. Несмотря на то что строма человека в ксенографте заменяется стромой мыши, PDX хорошо сохраняют внутриопухолевую гетерогенность, в том числе при многократном пассировании [18].

Применение гетеротопических (подкожных) PDX очень распространено в трансляционных исследованиях рака, что объясняется технической простотой исполнения. Тем не менее подкожные ксенотрансплантаты не воспроизводят исходное микроокружение опухоли донора, опухолевые узлы в организме мыши-реципиента инкапсулируются, вследствие чего имеют локальный экспансивный рост и не метастазируют [19].

Ортоотопическую PDX-модель АП человека создают путем непосредственной имплантации опухолевого фрагмента донора в стенку дистального отдела пищевода мыши. Ксенографт и действие облучения легко обнаружить при разрастании опухолевого узла, однако создание модели рака этого типа чрезвычайно сложно технически из-за анатомического расположения и размера пищевода мыши [20]. Другим преимуществом этого способа трансплантации является специфическое внутриорганное микроокружение опухоли, что способствует воспроизведению патоморфологических и молекулярных параметров опухоли пациента [21]. Поэтому ортоотопические PDX используют в изучении поведения опухоли в отношении различных терапевтических подходов. В ходе нашего эксперимента степень противоопухолевого воздействия лучевой терапии определяли, вычисляя показатель торможения роста опухоли (ТРО) [22].

Цель исследования состояла в изучении эффективных доз и оценки противоопухолевой активности лучевой терапии на ортоотопической PDX-модели АП человека, полученной путем ксенотрансплантации фрагмента опухоли донора в шейный отдел пищевода иммунодефицитных мышей.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование провели на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. Для создания ортоотопических ксенотрансплантатов использовали свежий опухолевый материал от пациента с АП. При создании шестого пассажа PDX-моделей для трансплантации использовали самок мышей линии Balb/c nude ($n = 25$, возраст 6–8 недель, масса тела 21–25 г). На подготовительных этапах исследования использовали 12 самок мышей линии Balb/c nude. Мышей содержали в SPF-виварии при температуре 22–24 °C и относительной влажности воздуха

60%, при световом режиме день–ночь, в искусственно вентилируемых клетках. В конце эксперимента проводили эвтаназию животных в CO₂-камере с последующим отбором опухолевого материала для исследований.

Исследование лучевого воздействия проводили на ортотопических PDX АП человека 6-го пассажа (рис. 1). Облучение начинали проводить при размерах ксенографтов не менее 100 мм³, на 30-е сутки после трансплантации. Животных разделили на 5 групп (контроль, 1, 2, 3 и 4 группа) с различными режимами воздействия, по 5 особей в каждой группе. В первой группе разовая доза облучения мышей составила 4 Гр (суммарная доза 12 Гр), во 2, 3 и 4 группах режимы облучения составили 6 (18), 8 (24) и 10 (30) Гр соответственно. Эксперимент выполняли в течение 7 дней, облучение проводили в 3 приема с кратностью 1 раз. Однократное облучение проводили с использованием аппарата Xstrahl 150 (Xstrahl; UK) с фильтром 1 (Al 0,2) и аппликаторами 1,5 и 2 см.

Измерение размеров опухолевых узлов проводили с помощью штангенциркуля. Расчет объемов опухолевых узлов осуществляли по формуле Шрека для эллипсоида:

$$V = a \times b \times c \times \pi/6,$$

где V — объем опухоли (мм³); a, b, c — максимальные диаметры эллипсоида в трех плоскостях (мм).

Степень торможения роста опухоли рассчитывали с применением показателя ТРО по формуле:

$$\text{ТРО, \%} = (V_{\text{контроль}} - V_{\text{опыт}}) / V_{\text{контроль}} \times 100.$$

Гематологический анализ крови выполняли с помощью ветеринарного анализатора Exigo (BouleMedical; USA). Анализ биохимических показателей проводили на анализаторе VETSCANVS2 (Zoetis; USA).

Статистический анализ данных проводили с помощью программного пакета STATISTICA 10. Количественные переменные приводятся в виде средних величин и стандартных отклонений от среднего $M \pm SD$. Для исследования достоверности различий средних величин для двух независимых выборок использовали критерий Манна–Уитни и критерий Уилкоксона–Манна–Уитни.

Ортотопическая трансплантация образцов опухоли в пищевод иммунодефицитной мыши

Перед хирургическим вмешательством проводили премедикацию животных препаратом на основе ксилазина гидрохлорида в дозе 20 мг/г внутримышечно. Затем через 15 мин мышей наркотизировали внутримышечно препаратом, содержащим в качестве действующих веществ тилетамин гидрохлорид и золазепам гидрохлорид, в дозе 22,57 мг/г.

Образцы опухоли донора перед трансплантацией разделяли на фрагменты объемом примерно 27 мм³, участки некротизированной ткани заранее удаляли. Опухолевый материал трансплантировали через 30 мин после резекции. Непосредственно перед операцией кожу мыши в области рассечения обрабатывали 10% раствором повидон-йода.

Для обеспечения доступа к пищеводу выполняли рассечение кожи шеи от основания правого уха до основания левого уха. Затем тупым способом проводили выделение трахеи и лежащего под ней пищевода. С помощью скальпеля рассекали адвентициально-мышечный слой пищевода. Над выполненным разрезом к стенке пищевода подшивали фрагмент опухоли с использованием лигатуры Пролен 5-0. Далее скорняжным



Рис. 1. Ортотопическая PDX-модель аденокарциномы пищевода человека (6-й пассаж)

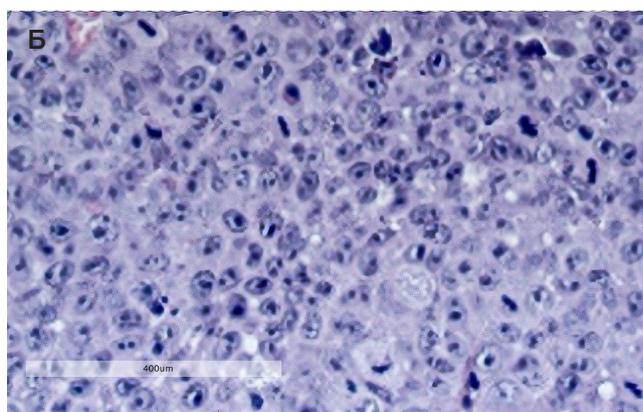
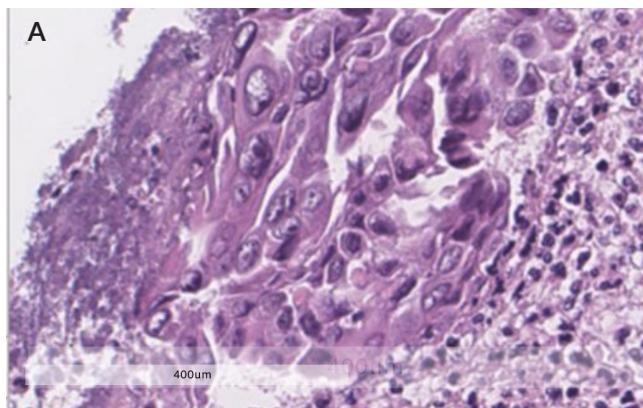


Рис. 2. Гистологические препараты умеренно дифференцированной АП человека. А. Опухоль пациента-донора. Б. Ортотопический ксенографт 1-го пассажа. Окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$

Таблица 1. Средние объемы ксенографтов аденокарциномы человека и вес мышей в контрольной и опытных группах

Группа	Показатель	0-е сутки		1-е сутки		5-е сутки		7-е сутки	
		V, мм ³	Вес, г						
Контроль	Среднее	86	21	626	22,7	1250,7	22,3	2136,6	22,3
	Стандартное отклонение	2,8	0,5	4,9	0,3	148,5	0,8	74,5	0,8
1 (4) Гр	Среднее	91,1*	21,7	554,8*	23	1052,0*	21,1	1145,9*	21,1
	Стандартное отклонение	2,4	0,6	9	0,4	72,9	1,2	120,7	1
2 (6) Гр	Среднее	88	20,5	235,1*	22,2	249,3*	22,7	248,1*	22,5
	Стандартное отклонение	1,6	0,5	2,7	0,8	2	0,8	1,3	1,2
3 (8) Гр	Среднее	80,9*	22,2	210,8*	23,5	228,9*	23,5	227,8*	23,5
	Стандартное отклонение	2	0,4	5,8	0,4	14	0,5	8,2	0,5
4 (10) Гр	Среднее	89,5	21,5	195,2*	22,7	200,1*	19,7	198,9*	19,8
	Стандартное отклонение	2,8	0,8	6	1,3	3,3	3	4,4	0,9

Примечание: * — статистически значимые различия между показателями животных в контрольной и экспериментальных группах 1 (4 Гр), 2 (6 Гр), 3 (8 Гр) и 4 (10 Гр) по критерию Манна–Уитни ($p < 0,05$); * — статистически значимые различия между показателями животных в контрольной и экспериментальных группах 1 (4 Гр), 2 (6 Гр), 3 (8 Гр) и 4 (10 Гр) по критерию Манна–Уитни ($p \leq 0,01$).

швом при помощи лигатуры Пролен 4–0 ушивали операционную рану [23].

После того как опухолевый узел ортотопической модели достигал объема 150–250 мм³, выполняли перевивку ксенографта до 6-го пассажа описанным выше способом.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Зарегистрировали увеличение степени приживления опухолевого материала у иммунодефицитных мышей с каждым последующим пассажем. При 1, 2 и 3 пассаже наблюдали 55, 70 и 80% приживления соответственно. Начиная с 4-го и до 6-го пассажа у ортотопических ксенографтов прививаемость биоматериала донора достигла 100%.

Гистологическая верификация PDX-моделей АП человека

Опухоль пациента гистологически идентифицировали как умеренно дифференцированную аденокарциному. Наряду с типичными клетками аденокарциномы в препарате

обнаружили атипичные клетки веретенообразной формы с кариопикнозом и кариорексисом клеточного ядра. Гистотип ксенографтов 1-го пассажа в достаточной степени точно повторял основные характеристики опухоли-донора и был представлен также умеренно дифференцированной аденокарциномой, значительная доля клеток которой была типичной формы с дегенеративно измененными ядрами или патологическими митозами (рис. 2).

Влияние лучевого воздействия на ортотопические ксенографты АП человека

Средние объемы ксенографтов и средний вес мышей контрольной и опытных групп представлены в табл. 1. В группе 1 (4 Гр) после первого и третьего сеансов облучения наблюдали статистически значимые отличия показателей ($p \leq 0,01$) средних объемов ксенографтов от показателей животных контрольной группы, не подвергавшейся облучению. При этом в опытных группах с разовой дозой облучения 6, 8 и 10 Гр средние объемы опухолевых узлов мышей статистически значимо отличались ($p \leq 0,01$) от аналогичных показателей животных контрольной группы после каждой из трех процедур лучевого воздействия. В

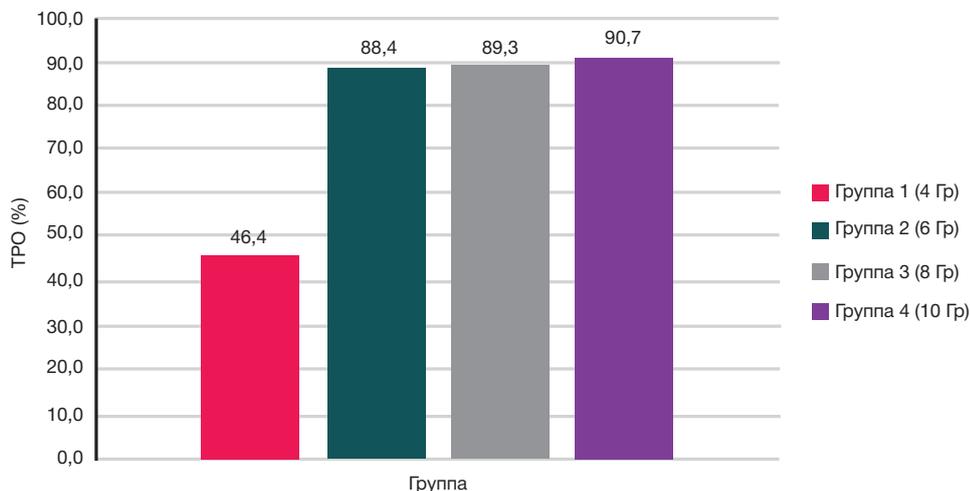


Рис. 3. Показатели TPO мышей с PDX АП человека для экспериментальных групп с дозами облучения 1 (4 Гр), 2 (6 Гр), 3 (8 Гр) и 4 (10 Гр)

группах с разовой долей излучения в 6, 8 и 10 Гр на 7-е сутки эксперимента зафиксировали остановку роста опухоли до объемов 248,1, 227,8 и 198,9 мм³ соответственно, что существенно отличалось от объема опухолевых узлов у животных контрольной группы.

При оценке динамики веса мышей с имплантированными PDX АП человека достоверных различий во всех группах в течение всего эксперимента не зарегистрировали. Средняя масса тела животных составила от 19,7 ± 3,0 до 23,5 ± 0,5 г. Можно сделать вывод, что исследуемые дозы лучевого воздействия не повлияли на изменение массы тела мышей.

Показатель ТРО на момент окончания эксперимента в четырех опытных группах ортотопических PDX-моделей АП человека составил 46,4, 88,4, 89,3 и 90,7% соответственно (рис. 3). По результатам расчетов можно сделать вывод, что уже при суммарной дозе в 18 Гр наблюдается значительное торможение роста опухоли на моделях у мышей, и дальнейшее повышение дозы лучевого воздействия может быть неэффективным в связи с наносимым негативным воздействием на общее состояние организма животного.

На момент клинического осмотра животных из 4-й группы с суммарно полученной дозой излучения 30 Гр был замечен некроз опухоли с выделениями молочного цвета и изъязвлением поверхности опухолевого узла. При этом опухолевые узлы мышей контрольной группы были значительно крупнее, бордово-синего цвета с ярко выраженной кровеносной сетью, без некротизации ткани и изъязвлений.

С помощью гистологического анализа опухолевого материала ортотопической PDX-модели АП человека после суммарной дозы облучения 30 Гр зарегистрировали трансформацию железистых опухолевых клеток без ороговений, сопровождающуюся значительной некротизацией ткани (около 50% препарата) и очагами патологического митоза. Обнаружили также клетки с карио- и цитоллизом (рис. 4).

Гематологический и биохимический профиль крови ортотопических PDX АП человека после лучевого воздействия

В ходе эксперимента мы исследовали гематологические показатели у мышей всех групп после завершения лучевой терапии (табл. 2).

Среднее содержание гемоглобина в крови животных уменьшалось по мере увеличения дозы радиации, при этом наблюдали статистически значимое отличие показателей животных групп 1–4 от показателей животных контрольной группы ($p < 0,01$). Общее содержание эритроцитов, лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов и тромбоцитов в крови также уменьшилось во всех исследуемых группах. В группах 2, 3 и 4 число лимфоцитов, моноцитов и тромбоцитов статистически

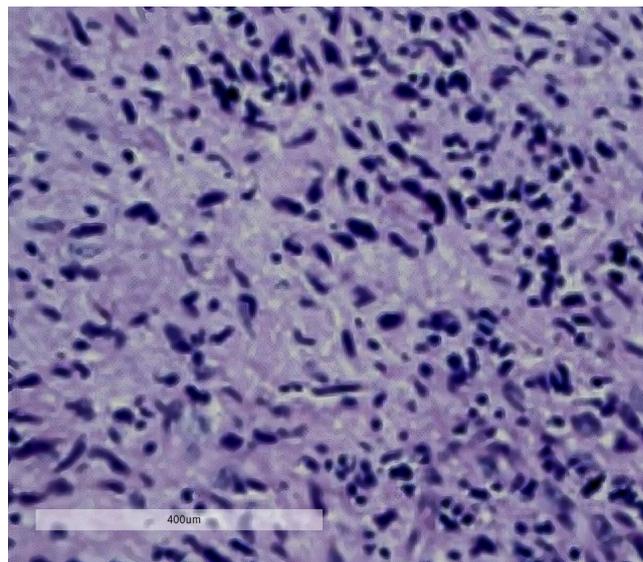


Рис. 4. Гистологический препарат PDX-модели АП человека на иммунодефицитных мышьях линии Balb/cNude после лучевого воздействия в суммарной дозе 30 Гр. Окраска гематоксилином и эозином (ув. ×400)

значимо отличалось ($p < 0,01$) от аналогичных показателей животных группы контроля. Содержание эритроцитов и лейкоцитов у мышей всех опытных групп статистически значимо отличалось ($p < 0,01$) от контрольных животных.

Также мы провели биохимический анализ крови иммунодефицитных мышей с ксенографтами РП (табл. 3). Концентрация белка в крови мышей 2, 3, 4 групп статистически значимо отличалась от аналогичных показателей животных контрольной группы ($p < 0,01$). После увеличения дозы радиации у животных наблюдали плавное повышение содержания в крови мочевины, креатинина и аланинаминотрансферазы, при этом облучение в дозе 8 и 10 Гр привело к появлению статистически значимых отличий ($p < 0,01$) от показателей группы мышей, не подвергшихся облучению. Данные сдвиги в биохимическом профиле крови животных опытных групп можно объяснить процессами активной некротизации опухолевых узлов под воздействием лучевой терапии. При мониторинге уровня глюкозы в крови животных статистически значимых отличий не выявлено. Содержание щелочной фосфатазы в крови мышей 1, 2, 3, и 4 групп статистически значимо отличалось ($p < 0,01$) от аналогичных показателей животных контрольной группы по мере увеличения дозы радиации. Снижение активности щелочной фосфатазы в данном случае можно объяснить параллельным снижением концентрации гемоглобина в крови опытных групп животных. После воздействия радиации в суммарной дозе 24 Гр изменения жизненно важных параметров крови у экспериментальных животных сопровождались снижением их активности и сутулой позой.

Таблица 2. Значения гематологических показателей крови PDX аденокарциномы пищевода человека на 25-е сутки эксперимента

Группа	Гемоглобин	Тромбоциты	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	Лимфоциты, 10 ⁹ /л	Моноциты, 10 ⁹ /л	Эритроциты, 10 ⁹ /л
Контроль	118 ± 4,9	481 ± 79	3,7 ± 0,6	1,6 ± 0,4	0,9 ± 0,2	6,8 ± 0,5
1 (4 Гр)	115 ± 4,3*	477 ± 60*	3,3 ± 0,5*	1,4 ± 0,4	0,85 ± 0,2	6,6 ± 0,4
2 (6 Гр)	111 ± 4,4*	474 ± 55*	3,0 ± 0,4*	1,2 ± 0,3*	0,7 ± 0,3	6,0 ± 0,4*
3 (8 Гр)	99 ± 5,8*	470 ± 58*	2,7 ± 0,4*	1,0 ± 0,4*	0,5 ± 0,2*	5,7 ± 0,4*
4 (10 Гр)	93 ± 3,9*	464 ± 52*	2,5 ± 0,3*	0,7 ± 0,1*	0,4 ± 0,1*	5,2 ± 0,3*

Примечание: * — отличается от значений в контрольной группе, $p < 0,01$; критерий Уилкоксона–Манна–Уитни.

Таблица 3. Значения биохимических показателей крови PDX аденокарциномы пищевода человека на 25-е сутки эксперимента

Группа	Белок, мг/дл	Мочевина, мг/дл	Креатинин, мг/дл	Глюкоза, мг/дл	АЛТ, ед./л	ЩФТ, ед./л
Контроль	5,4 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,05	190 ± 14	51 ± 6,7	65 ± 8,2
1 (4 Гр)	5,5 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,75 ± 0,1	185 ± 15	53 ± 7	62 ± 4,8*
2 (6 Гр)	5,7 ± 0,5*	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,1*	189 ± 10	58 ± 6,5*	63 ± 4*
3 (8 Гр)	6,1 ± 0,4*	0,8 ± 0,1*	1,2 ± 0,2*	192 ± 16	59 ± 8,6*	61 ± 5,5*
4 (10 Гр)	6,3 ± 0,4*	1,1 ± 0,3*	1,3 ± 0,1*	191 ± 12	62 ± 6,7*	55 ± 7,5*

Примечание: * — отличается от значений в контрольной группе, $p < 0,01$; критерий Уилкоксона–Манна–Уитни; АЛТ — аланинаминотрансфераза; ЩФТ — щелочная фосфатаза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Особый интерес из ранее опубликованных исследований вызывает работа, в которой изучили противоопухолевый эффект фракционированной лучевой терапии (3×2 Гр) в сочетании с препаратом ТН-302 (50 мг/кг, внутривенное введение) в отношении подкожных ксенографтов клеточных культур плоскоклеточного РП ОЕ21 и АП ОЕ19 [24]. Показана значительная задержка роста опухоли в карциномах ОЕ19 ($p = 0,02$) и ОЕ21 ($p = 0,03$) при комбинированном лечении ТН-302 с лучевой терапией по сравнению только с лучевой терапией. Модели, полученные путем подкожной имплантации раковых клеточных линий, не обладали интратуморальной гетерогенностью клонов клеток, свойственной опухоли человека, по причине чего данные доклинических исследований могут значительно расходиться с результатами последующих клинических испытаний [12].

В другой работе показано, что комбинация Р3К α -селективного ингибитора СУН33 и радиационного излучения синергически подавляла рост подкожных ксенотрансплантатов, полученных от пациентов с плоскоклеточным РП [25]. Несмотря на то, что подкожные ксенографты, созданные с использованием фрагментов человеческой опухоли, сохраняли гетерогенность клеточного состава биоматериала донора, гетеротопический сайт имплантации не позволял имитировать микроокружение опухоли человека, что препятствовало метастазированию и не воспроизводило основные сигнальные пути, задействованные в онкогенезе.

В нашей работе по исследованию эффективных доз радиационного воздействия в качестве объекта впервые была использована ортотопическая пациенто-подобная

модель АП человека как наиболее приближенная к клиническому ответу донорской опухоли [26]. Это позволило нам изучить влияние лучевого воздействия на рост ксенографтов и определить его дозозависимый эффект. В ранее опубликованных исследованиях PDX-модели различных опухолей человека изучали как модели метастазирования и не использовали для оценки лучевого воздействия [27].

ВЫВОДЫ

Средние объемы опухолевых узлов PDX-моделей опытных групп с разовой дозой облучения 6, 8 и 10 Гр статистически значимо отличались ($p \leq 0,01$) от аналогичных показателей группы контроля после каждой из трех процедур лучевого воздействия. При этом показатель ТРО на момент окончания эксперимента в четырех опытных группах ортотопических PDX-моделей АП человека составил 46,4, 88,4, 89,3 и 90,7% соответственно. Несмотря на отсутствие изменений веса мышей на протяжении эксперимента, общий анализ крови и анализ биохимических показателей позволяет сделать вывод о негативном дозозависимом эффекте лучевой терапии на организм животного. Суммарная доза, превышающая 18 Гр, приводила к снижению содержания гемоглобина, количества эритроцитов и лейкоцитов в крови и повышению деградации белковых молекул в процессе некротизации опухоли. Таким образом, для дальнейших исследований лучевой терапии и ее комбинации с различными противоопухолевыми субстанциями в эксперименте *in vivo* на мышинных моделях АП человека применение суммарных доз радиации, превышающих 18 Гр, нецелесообразно с точки зрения вреда, наносимого организму животного.

Литература

1. Гладилина И. А., Трякин А. А., Захидова Ф. О., Малихова О. А., Иванов С. М., Кравец О. А. и др. Рак пищевода: эпидемиология, факторы риска и методы диагностики. Онкологический журнал: лучевая диагностика, лучевая терапия. 2020; 3 (1): 69–76.
2. Ho ALK, Smyth EC. A global perspective on esophageal cancer: two diseases in one. The Lancet Gastroenterology & Hepatology. 2020; 5 (6): 521–2. DOI: 10.1016/S2468-1253(20)30047-9.
3. Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. New England Journal of Medicine. 2003; 349 (23): 2241–52.
4. Lin EW, Karakasheva TA, Hicks PD, Bass AJ, Rustgi AK. The tumor microenvironment in esophageal cancer. Oncogene. 2016; 35 (41): 5337–49.
5. Аксель Е. М. Статистика злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта. Сибирский онкологический журнал. 2017; 16 (3): 5–11. DOI: 10.21294/1814-4861-2017-3-5-11
6. Кит О. И. Нейроэндокринные, клинические и морфологические аспекты рака желудка. Новочеркасск: Лик, 2014; 221 с.
7. Ishihara R, Oyama T, Abe S, Takahashi H, Ono H, Fujisaki J et al. Risk of metastasis in adenocarcinoma of the esophagus: a multicenter retrospective study in a Japanese population. Journal of gastroenterology. 2017; 52 (7): 800–8. DOI: 10.1007/s00535-016-1275-0.
8. Mahoney JL, Condon R. E. Adenocarcinoma of the esophagus. Annals of surgery. 1987; 205 (5): 557.
9. Урмонов У. Б., Добродеев А. Ю., Афанасьев С. Г., Августиневич А. В., Черемисина О. В. Современные аспекты лечения рака пищевода. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (4): 78–84. DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-4-78-84.
10. Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinská E, Byrne AT, Caldas C, et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for

- translational cancer research. *Cancer Discov.* 2014; 4: 998–1013. DOI: 10.1158/2159-8290.
11. Wilding JL, Bodmer WF. Cancer Cell Lines for Drug Discovery and Development. *Cancer Res.* 2014; 74 (9): 2377–84. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2971.
 12. Sung-Yup Cho. Patient-derived xenografts as compatible models for precision oncology. *Laboratory Animal Research.* 2020; 36: 14. DOI: 10.1186/s42826-020-00045-1.
 13. Zhuo J, Su R, Tan W, Lian Z, Lu D, Xu X. The ongoing trends of patient-derived xenograft models in oncology. *Cancer Commun (Lond).* 2020; 40 (11): 559–63. DOI: 10.1002/cac2.12096.
 14. Fernandes DP, Pimentel MML, Santos FAD, Praxedes ÉA, Brito PD, Lima MA, Leles ICNG, Macedo MF, Bezerra MB. Hematological and biochemical profile of BALB/c nude and C57BL/6 SCID female mice after ovarian xenograft. *An Acad Bras Cienc.* 2018; 90 (4): 3941–48. DOI: 10.1590/0001-3765201820180586.
 15. Жукова Г. В., Шихлярова А. И., Сагакянц А. Б., Протасова Т. П. О расширении вариантов использования мышей BALB/c nude для экспериментального изучения злокачественных опухолей человека in vivo. *Южно-Российский онкологический журнал.* 2020; 1 (2): 28–35.
 16. Szadvari I, Krizanova O, Babula P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. *Physiol Res.* 2016; 65 (Suppl 4): S441–53. DOI: 10.33549/physiolres.933526.
 17. Pompili L, Porru M, Caruso C, Biroccio A, Leonetti C. Patient-derived xenografts: a relevant preclinical model for drug development. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016; 35 (1): 189. DOI: 10.1186/s13046-016-0462-4.
 18. Choi YY, Lee JE, Kim H, Sim MH, Kim K.-K., Lee G, et al. Establishment and characterisation of patient-derived xenografts as paraclinical models for gastric cancer. *Sci Rep.* 2016; 6: 22172. DOI: 10.1038/srep22172.
 19. Hoffman RM. Patient-derived orthotopic xenografts: better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. *Nat Rev Cancer.* 2015; 15: 451–2. DOI: 10.1038/nrc3972.
 20. Tétreault MP. Esophageal cancer: insights from mouse models. *Cancer growth and metastasis.* 2015; 8: 37–46. DOI: 10.4137/CGM.S21218.
 21. 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; 24: 31–9. DOI: 10.1007/s00384-008-0584-z.
 22. Ростовцев Н. М., Котляров Н. А. Сравнительный анализ эффективности лучевого и фотодинамического лечения экспериментальной опухоли. *Педиатрический вестник Южного Урала.* 2015; 1: 29–32.
 23. Колесников Е. Н., Кит С. О., Лукбанова Е. А., Гончарова А. С., Максимов А. Ю., авторы. Федеральное государственное бюджетное учреждение "Ростовский научно-исследовательский онкологический институт" Министерства здравоохранения Российской Федерации, патентообладатель. Способ ортотопической трансплантации культуры опухолевых клеток пищевода человека в шейный отдел пищевода иммунодефицитных мышей. Патент РФ 2713798. G09B 23/28. Заявка № 2019113616 от 30.04.19.
 24. Spiegelberg L, van Hoof SJ, Biemans R, Lieuwes NG, Marcus D, Niemans R, et al. Evofosfamide sensitizes esophageal carcinomas to radiation without increasing normal tissue toxicity. *Radiother Oncol.* 2019; 141: 247–55. DOI: 10.1016/j.radonc.2019.06.034.
 25. Shi J-J, Xing H, Wang Y-X, Zhang X, Zhan Q-M, Geng M-Y, et al. PI3K α inhibitors sensitize esophageal squamous cell carcinoma to radiation by abrogating survival signals in tumor cells and tumor microenvironment. *Cancer Letters.* 2019; 459: 145–55. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.05.040.
 26. Teicher BA, Andrews PA, editors. *Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and approval.* 2nd ed. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2004. DOI: 10.1007/978-1-59259-739-0.
 27. Трещалина Е. М. Иммунодефицитные мыши Balb/c nude и моделирование различных вариантов опухолевого роста для доклинических исследований. *РБЖ.* 2017; 16 (3): 6–13. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-6-13.

References

1. Gladilina IA, Tryakin AA, Zahidova FO, Malihova OA, Ivanov SM, Kravec OA, i dr. Rak pishhevoda: jepidemiologija, faktory riska i metody diagnostiki. *Onkologicheskij zhurnal: luchevojaja diagnostika, luchevojaja terapija.* 2020; 3 (1): 69–76. Russian.
2. Ho ALK, Smyth EC. A global perspective on esophageal cancer: two diseases in one. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology.* 2020; 5 (6): 521–2. DOI: 10.1016/S2468-1253(20)30047-9.
3. Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. *New England Journal of Medicine.* 2003; 349 (23): 2241–52.
4. Lin EW, Karakasheva TA, Hicks PD, Bass AJ, Rustgi AK. The tumor microenvironment in esophageal cancer. *Oncogene.* 2016; 35 (41): 5337–49.
5. Aksel EM. Statistika zlokachestvennyh novoobrazovanij zheludochno-kishechnogo trakta. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2017; 16 (3): 5–11. DOI: 10.21294/1814-4861-2017-3-5-11. Russian.
6. Kit OI. Nejrojendokrinnye, klinicheskie i morfologicheskie aspekty raka zheludka. *Novocherkassk: Lik,* 2014; 221 s. Russian.
7. Ishihara R, Oyama T, Abe S, Takahashi H, Ono H, Fujisaki J et al. Risk of metastasis in adenocarcinoma of the esophagus: a multicenter retrospective study in a Japanese population. *Journal of gastroenterology.* 2017; 52 (7): 800–8. DOI: 10.1007/s00535-016-1275-0.
8. Mahoney JL, Condon R. E. Adenocarcinoma of the esophagus. *Annals of surgery.* 1987; 205 (5): 557.
9. Urmonov UB, Dobrodeev AYú, Afanasev SG, Avgustinovich AV, Cheremisina OV. Sovremennye aspekty lechenija raka pishhevoda. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2019; 18 (4): 78–84. DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-4-78-84. Russian.
10. Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinská E, Byrne AT, Caldas C, et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov.* 2014; 4: 998–1013. DOI: 10.1158/2159-8290.
11. Wilding JL, Bodmer WF. Cancer Cell Lines for Drug Discovery and Development. *Cancer Res.* 2014; 74 (9): 2377–84. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2971.
12. Sung-Yup Cho. Patient-derived xenografts as compatible models for precision oncology. *Laboratory Animal Research.* 2020; 36: 14. DOI: 10.1186/s42826-020-00045-1.
13. Zhuo J, Su R, Tan W, Lian Z, Lu D, Xu X. The ongoing trends of patient-derived xenograft models in oncology. *Cancer Commun (Lond).* 2020; 40 (11): 559–63. DOI: 10.1002/cac2.12096.
14. Fernandes DP, Pimentel MML, Santos FAD, Praxedes ÉA, Brito PD, Lima MA, Leles ICNG, Macedo MF, Bezerra MB. Hematological and biochemical profile of BALB/c nude and C57BL/6 SCID female mice after ovarian xenograft. *An Acad Bras Cienc.* 2018; 90 (4): 3941–48. DOI: 10.1590/0001-3765201820180586.
15. Zhukova GV, Shihlyarova AI, Sagakyanc AB, Protasova TP. O rasshirenii variantov ispol'zovaniya myshej BALB/c nude dlja jeksperimental'nogo izuchenija zlokachestvennyh opuholej cheloveka in vivo. *Juzhno-Rossijskij onkologicheskij zhurnal.* 2020; 1 (2): 28–35. Russian.
16. Szadvari I, Krizanova O, Babula P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. *Physiol Res.* 2016; 65 (Suppl 4): S441–53. DOI: 10.33549/physiolres.933526.
17. Pompili L, Porru M, Caruso C, Biroccio A, Leonetti C. Patient-derived xenografts: a relevant preclinical model for drug development. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016; 35 (1): 189. DOI: 10.1186/s13046-016-0462-4.
18. Choi YY, Lee JE, Kim H, Sim MH, Kim K.-K., Lee G, et al. Establishment and characterisation of patient-derived xenografts as paraclinical models for gastric cancer. *Sci Rep.* 2016; 6: 22172. DOI: 10.1038/srep22172.
19. Hoffman RM. Patient-derived orthotopic xenografts: better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. *Nat Rev Cancer.* 2015; 15: 451–2. DOI: 10.1038/nrc3972.

20. Tétreault MP. Esophageal cancer: insights from mouse models. *Cancer growth and metastasis*. 2015; 8: 37–46. DOI: 10.4137/CGM.S21218.
21. 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; 24: 31–9. DOI: 10.1007/s00384-008-0584-z.
22. Rostovcev NM, Kotljarov NA. Sravnitel'nyj analiz jeffektivnosti lucheвого i fotodinamicheskogo lechenija jeksperimental'noj opuholi. *Pediatricheskij vestnik Juzhnogo Urala*. 2015; 1: 29–32. Russian.
23. Kolesnikov EN, Kit SO, Lukbanova EA, Goncharova AS, Maksimov AYu, avtory. Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe uchrezhdenie "Rostovskij nauchno-issledovatel'skij onkologicheskij institut" Ministerstva zdravoohraneniya Rossijskoj Federacii, patentoobladatel'. Sposob ortotopicheskoy transplantacii kul'tury opuholevyh kletok pishhevoda cheloveka v shejnyj otdel pishhevoda immunodeficitnyh myshej. Patent RF 2713798. G09B 23/28. Zajavka # 2019113616 ot 30.04.19. Russian.
24. Spiegelberg L, van Hoof SJ, Biemans R, Lieuwes NG, Marcus D, Niemans R, et al. Evofosfamide sensitizes esophageal carcinomas to radiation without increasing normal tissue toxicity. *Radiother Oncol*. 2019; 141: 247–55. DOI: 10.1016/j.radonc.2019.06.034.
25. Shi J-J, Xing H, Wang Y-X, Zhang X, Zhan Q-M, Geng M-Y, et al. PI3K α inhibitors sensitize esophageal squamous cell carcinoma to radiation by abrogating survival signals in tumor cells and tumor microenvironment. *Cancer Letters*. 2019; 459: 145–55. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.05.040.
26. Teicher BA, Andrews PA, editors. *Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and approval*. 2nd ed. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2004. DOI: 10.1007/978-1-59259-739-0.
27. Treshhalina EM. Immunodeficitnye myshi Balb/c nude i modelirovanie razlichnyh variantov opuholevogo rosta dlja doklinicheskikh issledovanij. *RBZh*. 2017; 16 (3): 6–13. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-6-13. Russian.