

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Краткое сообщение

УДК 616–006.04
doi:10.18499/2225-7357-2022-11-4-53-57
3.3.2 – патологическая анатомия



Морфологическая и иммуногистохимическая валидация персонализированной биологической *in vivo* платформы немелкоклеточного рака легкого человека

А. А. Епишкина^{1✉}, О. Н. Дерябина², О. Н. Тумутолова², Д. С. Блинов³,
А. А. Махрова³, Г. В. Брыкин¹, Д. Н. Шимановский¹, Е. В. Блинова¹

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

²Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

Аннотация. Цель исследования – провести сравнительный морфологический и иммуногистохимический анализ третьей генерации ксенографтной опухоли и опухоли пациента с немелкоклеточным раком легкого, послужившей источником клеток для трансплантации в организм мыши.

Материал и методы. В работе использовано 19 атимичных мышей BALB/c nu/nu, которым после сублечального облучения в соответствии с протоколом гуманизации внутрибрюшинно вводили 1×10^6 CD8+. Перевивку опухоли, полученной от пациента 64 лет, проводили последовательно троекратно. Образцы исходной и ксенографтной опухоли в автоматическом режиме окрашивали гематоксилином и эозином, кроличьими антителами к CK7, TTF и Ki67. Оценку гистологических препаратов осуществляли согласно рекомендациям ВОЗ (2015).

Результаты. Установлено, что опухоль третьей генерации, развивающаяся в организме атимичных гуманизированных мышей, сохраняет морфологические и иммуногистохимические черты исходной опухоли пациента. Описанный подход может быть использован в доклинических и персонализированных исследованиях в фундаментальной фармакологии и молекулярной онкологии.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, ксенографт, морфологическая валидация, иммуногистохимия

Благодарности: Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации НШ-843.2022.3 (соглашение №075-15-2022-842 от 12 мая 2022 г.)

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Епишкина А.А., Дерябина О.Н., Тумутолова О.Н., Блинов Д.С., Махрова А.А., Брыкин Г.В., Шимановский Д.Н., Блинова Е.В. Морфологическая и иммуногистохимическая валидация персонализированной биологической *in vivo* платформы немелкоклеточного рака легкого человека // Журнал анатомии и гистопатологии. 2022. Т. 11, №4. С. 53–57. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2022-11-4-53-57>

BRIEF ARTICLES

Brief article

Morphological and immunohistochemical validation personalized patient-derived xenograft model of non-small cellular lung cancer

А. А. Epishkina^{1✉}, О. Н. Deryabina², О. Н. Tumutolova², D. S. Blinov³, A. A. Makhrova³, G. V. Brykin¹,
D. N. Shimanovskii¹, E. V. Blinova¹

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

²Ogarev National Research Mordovia State University, Saransk, Russia

³Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

Abstract. The aim of the study was to carry out a comparative morphological and immunohistochemical analysis of peripheral non-small cell lung cancer, which served as a source of a xenograft tumor, and tissues of the third generation of a tumor that developed in animals.

Material and methods. We used 19 athymic BALB/c nu/nu mice, which were intraperitoneally injected with 1×10^6 CD8+ after sublethal irradiation in accordance with the humanization protocol. The transplantation of a tumor obtained from a 64-year-old patient was carried out three times consecutively. Samples of the original and xenograft tumors were automatically stained with hematoxylin and eosin, rabbit anti-CK7, anti-TTF, and anti-Ki67 antibodies. The evaluation of histological samples was carried out in accordance with the WHO recommendations (2015).

Results. It has been established that a third-generation tumor developing in the body of athymic humanized mice retains the morphological and immunohistochemical features of the patient's original tumor. The described approach may be used in preclinical and personalized studies in fundamental pharmacology and molecular oncology.

Key words: non-small cellular lung cancer, xenograft, morphological validation, immunohistochemistry

Acknowledgments: The study was supported by the grant of the President of the Russian Federation NSh-843.2022.3 (agreement No. 075-15-2022-842 dated May 12, 2022)

Conflict of interests: the authors declare no conflict of interests.

For citation: Epishkina A.A., Deryabina O.N., Tumutolova O.N., Blinov D.S., Makhrova A.A., Brykin G.V., Shimanovskii D.N., Blinova E.V. Morphological and immunohistochemical validation personalized patient-derived xenograft model of non-small cellular lung cancer // Journal of Anatomy and Histopathology. 2022. V. 11, №4. P. 53–57. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2022-11-4-53-57>

Введение

Рак легкого занимает второе место по распространенности в структуре онкологической заболеваемости и уровню смертности как у мужчин, так и у женщин [1]. На мелкоклочный рак легкого приходится 10–15% случаев рака легкого и до 85% – на немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), основными подтипами которого являются аденокарцинома, плоскоклеточный рак и крупноклеточная карцинома [2]. С молекулярной точки зрения интерес представляет идентификация молекулярных драйверов НМРЛ, активируемых соматическими мутациями в генах TP53, KRAS, KEAP1, STK11 и EGFR [3]. Для проведения доклинических исследований потенциальных кандидатов в противоопухолевые лекарственные средства важную роль играет создание адекватных *in vivo* и *in vitro* моделей для определения их специфической активности, позволяющих транслировать результаты в реальную клиническую практику. В последние годы были предложены различные клеточные и животные модели, среди которых наиболее активно обсуждаются органоидные модели рака легкого из тканей пациента [4], введение опухолевых клеток в хвостовую вену мышей [5], создание ксенографтных моделей у иммунодефицитных животных и т.д. Настоящее исследование посвящено морфологической и иммуногистохимической валидации ксенографтной модели НМРЛ, созданной у атимичных мышей линии BALB/c nu/nu.

Цель исследования – провести сравнительный морфологический и иммуногистохимический анализ третьей генерации ксенографтной опухоли и опухоли пациента с НМРЛ, послужившей источником клеток для трансплантации в организм мыши.

Материал и методы исследования

При формировании базовой модели воспользовались методом, описанным Morton

и Houghton [6, 7] в нашей модификации. Моделирование ксенографтного туморигенеза проводили на 4–6-недельных иммунодефицитных мышах BALB/c nu/nu ($n=19$), полученных из специального питомника «Пушино» – филиала ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков Шемякина и Овчинникова Российской академии наук. Все животные содержались в виварии Сеченовского Университета в индивидуальных вентилируемых клетках на стандартной диете. Исследование выполнено в строгом соответствии с приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. №199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и одобрено локальным этическим комитетом Сеченовского Университета (протокол №199-н от 01.04.2021 г.). Опухолевая ткань немелкоклеточного рака легкого (гистологически подтвержденная аденокарцинома) была получена интраоперационно в онкологической клинике Сеченовского Университета от 64-летнего мужчины, давшего добровольное информированное согласие и ранее не получавшего химиотерапевтического лечения. Перед перевивкой опухоли подвергшимся сублетальному рентгеновскому облучению в суммарной дозе 3,12 Гр (аппарат для рентгенотерапии Рентген-ТА 150/10, СпектрАП, ООО, Россия) мышам внутрибрюшинно трансплантировали 1×10^6 лимфоцитов субпопуляции CD8+, полученных методом градиентного осаждения и последующего цитофлуориметрического подтверждения из пакетов с лейкоцитарной массой здоровых доноров. Через трое суток после трансплантации лимфоцитов подкожно в область бедра слева вводили фрагменты свежих образцов опухолевой ткани, предварительно механически размельченных до размера 0,5–1 мм³ в матригеле (1×10^6 опухолевых клеток на 100 мкл). Размер опухоли определяли с помощью электронного штангенциркуля (производство Ugo Basil, Италия). Измеряли три размера: длину, ширину, глубину и вычисляли объем опухолевого узла. После

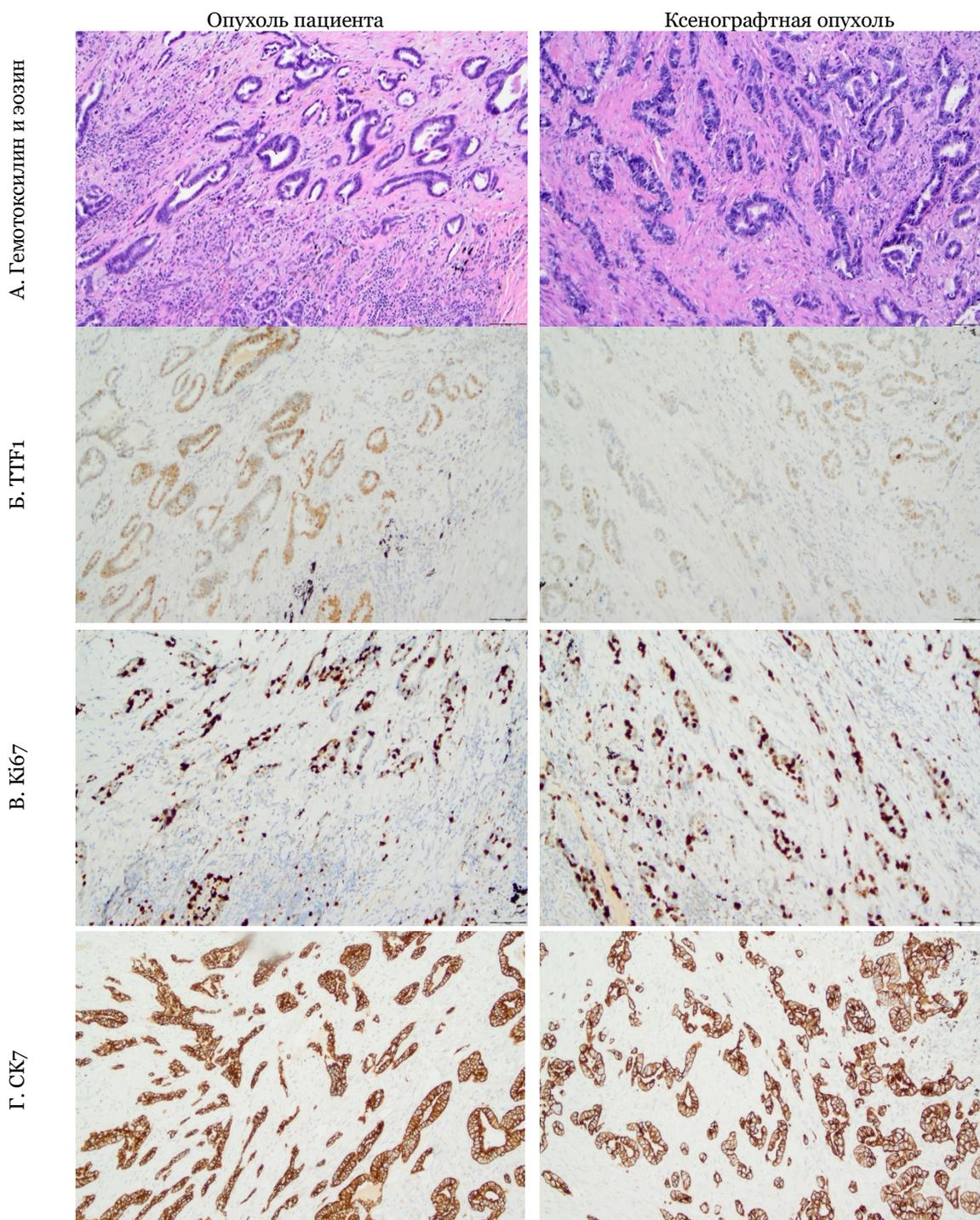


Рис. 1. Микропрепараты опухоли пациента и ксенографтной опухоли третьей генерации, развивающейся в организме гуманизированных мышей BALB/c nu/nu, ув. 200; пояснения в тексте.

достижения узлом размера 200 мм³ животное-носитель выводили из эксперимента под ингаляционным наркозом севофлураном, опухолевый узел извлекали, вновь измельчали и перевивали как описано выше следующей группе мышей. Процедуру повторяли трижды, после чего гетеротопический опухолевый узел извлекали для гистологического исследования. После фиксации забуференным 10% раствором формалина в течение 48 часов, кусочки, полученные при макроскопическом исследовании и вырезке операционного материала, направлялись на этап ав-

томатической проводки, включавший заливку в парафин с монтированием блоков, изготовлением гистологических срезов толщиной 3–5 мкм и последующим окрашиванием гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование также осуществлялось в автоматическом режиме с использованием кроличьих анти-Ki67, анти-CK7 и анти-TTF1 антител (Abcam, Великобритания). Оценка гистологических препаратов осуществлялась согласно рекомендациям ВОЗ (WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart, 4th Edition, 2015).

В работе использовался микроскоп OLYMPUS BX53 (Япония). С целью осуществления микрорентгеновской съемки использовалась фотонасадка OLYMPUS SC180 (Япония).

Результаты и их обсуждение

При окрашивании гематоксилином и эозином опухолевый узел, забранный от пациента с периферическим раком легкого, имел строение аденокарциномы, состоящей из ацинарных структур, выстланных эпителием, с признаками умеренной пролиферации и атипии. Вокруг опухолевых комплексов отмечалась умеренная десмопластическая реакция стромы (по Tils до 15%). Морфологическая картина опухолевого узла третьей генерации животных при окраске гематоксилином и эозином соответствовала аденокарциноме ацинарного строения, G II (рис. 1). Десмопластическая реакция карциномы слабая, Tils менее 5%. Для определения иммунофенотипа и гистогенеза карциномы легкого использован ядерный маркер TTF1 и субмембранный маркер СК7. При сличении контрольной опухоли и опухолевых узлов животных отмечалась сходная иммуногистохимическая картина, диффузное позитивное ядерное анти-TTF1 окрашивание 90% клеток карциномы опухоли пациента и ксенографной карциномы (рис. 1Б), что доказывает иммунофенотипическую принадлежность к карциноме легкого (рис. 1Г). Диффузное позитивное субмембранное окрашивание 90% клеток карциномы пациента анти-СК7 антителами и 75% клеток ксенографной опухоли доказывает аденогенный генез карциномы. Индекс пролиферации Ki67 в контрольной опухоли был равен 73%, в ксенографной опухоли – 85% (рис. 1В).

Рак легких остается одной из основных причин смертей во всем мире. Идентификация вовлеченных внутриклеточных сигнальных путей в дебюте и прогрессировании заболевания с развитием новых терапевтических направлений резко изменили подходы к персонализированному лечению пациента [8]. Тем не менее, молекулярная и генетическая изменчивость и чрезвычайная сила мутации помогает опухоли избежать строгого фармакологического контроля [9]. В связи с этим создание персонализированной *in vivo* платформы может позволить решить проблему химиорезистентности рака в каждом конкретном случае.

Информация об авторах

✉ Епишкина Анна Алексеевна – аспирант кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова; ул. Большая Пироговская, 2, стр. 4, Москва, 119435, Россия; afina-nn@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7824-7949>

Заключение

Опухоль третьей генерации, развивающаяся в организме атимичных гуманизированных мышей, сохраняет морфологические и иммуногистохимические черты исходной опухоли пациента. Описанный подход может быть использован в доклинических и персонализированных исследованиях в фундаментальной фармакологии и молекулярной онкологии.

Список источников / References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2019 Jan;69(1):7–34. doi: 10.3322/caac.21551
2. Dong Q, Chen ES, Zhao C, Jin C. Host-Microbiome Interaction in Lung Cancer. *Frontiers in Immunology*. 2021 May 24;12. doi: 10.3389/fimmu.2021.679829
3. Campbell JD, Alexandrov A, Kim J, Wala J, Berger AH, Pedamallu CS, et al. Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nature Genetics*. 2016 May 9;48(6):607–16. doi: 10.1038/ng.3564
4. Kim M, Mun H, Sung CO, Cho EJ, Jeon H-J, Chun S-M, et al. Patient-derived lung cancer organoids as *in vitro* cancer models for therapeutic screening. *Nature Communications*. 2019 Sep 5;10(1):3991. doi: 10.1038/s41467-019-11867-6
5. Chijiwa T, Kawai K, Noguchi A, Sato H, Hayashi A, Cho H, et al. Establishment of patient-derived cancer xenografts in immunodeficient NOG mice. *International Journal of Oncology*. 2015 May 11;47(1):61–70. doi: 10.3892/ijo.2015.2997
6. Morton CL, Houghton PJ. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nature Protocols*. 2007 Feb;2(2):247–50. doi: 10.1038/nprot.2007.25
7. Blinov D, Blinova E, Dudina M, Suslova I, Samishina E, Roshchin D. Novel aminochromone derivative inhibits tumor growth on xenograft model of lung cancer in mice. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 2018;9(4):130–4. doi: 10.4103/japtr.japtr_313_18
8. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. 2018 Jan;553(7689):446–54. doi: 10.1038/nature25183
9. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018 Sep 12;68(6):394–424. doi: 10.3322/caac.21492

Information about the authors

✉ Anna A. Epishkina – P.G. stud. of operative surgery and topographic anatomy department of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; ul. Bol'shaya Pirogovskaya, 2, str. 4, Moscow, 119435, Russia; afina-nn@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7824-7949>

Дерябина Ольга Николаевна – канд. мед. наук, доцент;
dr.deryabina@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-8814-3369>
Тумутолова Оксана Николаевна – канд. мед. наук, доцент;
tumutolov@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8809-6507>
Блинов Дмитрий Сергеевич – д-р мед. наук, доцент;
blinov-pharm@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8385-4356>
Махрова Анна Александровна;
anna.machrova@fchmoscow.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3572-0625>
Брыкин Гордей Вадимович – студент; sechagord@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9985-8880>
Шимановский Денис Николаевич – студент;
denisshimmm@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8716-7377>
Блинова Екатерина Валериевна – д-р мед. наук, профес-
сор; bev-sechenov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0050-0251>

Ol'ga N. Deryabina – Cand. Med. Sci., Assoc. Prof.;
dr.deryabina@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-8814-3369>
Oksana N. Tumutolova – Cand. Med. Sci., Assoc. Prof.;
tumutolov@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8809-6507>
Dmitrii S. Blinov – Doct. Med. Sci., Assoc. Prof.;
blinov-pharm@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8385-4356>
Anna A. Makhrova; anna.machrova@fchmoscow.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3572-0625>
Gordei V. Brykin – student, sechagord@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9985-8880>
Denis N. Shimanovskii – student, denisshimmm@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8716-7377>
Ekaterina V. Blinova – Doct. Med. Sci., Prof.;
bev-sechenov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0050-0251>

Статья поступила в редакцию 26.07.2022; одобрена после рецензирования 5.09.2022; принята к публикации 26.12.2022.
The article was submitted 26.07.2022; approved after reviewing 5.09.2022; accepted for publication 26.12.2022.
