



Оригинальная статья

PDX-модель высококодифференцированной нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы на иммунодефицитных мышях линии Balb/c Nude

Трифанов В.С.¹ • Максимов А.Ю.¹ • Гончарова А.С.¹ • Лукбанова Е.А.¹ • Карнаухов Н.С.^{1,2} • Кит С.О.¹ • Волкова А.В.¹ • Протасова Т.П.¹ • Ткачев С.Ю.¹ • Ходакова Д.В.¹ • Заикина Е.В.¹ • Миндарь М.В.¹ • Акульшина И.М.²

Актуальность. Ортотопические ксенографты человеческих опухолей (patient-derived xenograft – PDX) на иммунодефицитных мышях признаны наиболее адекватной моделью опухолевого процесса благодаря способности сохранять после имплантации первоначальные свойства опухоли. Они могут применяться для изучения противоопухолевого действия фармакологических субстанций *in vivo*, а также исследования особенностей и механизмов канцерогенеза. **Результаты** доклинических исследований фармакологических субстанций, полученные на PDX-моделях, практически не разнятся с последующими клиническими испытаниями. **Цель** – создание ортотопической PDX-модели высококодифференцированной нейроэндокринной опухоли (НЭО) поджелудочной железы (ПЖ) человека путем имплантации фрагмента опухоли пациента в ПЖ иммунодефицитных мышей. **Материал и методы.** Фрагмент опухоли был взят от пациента с диагнозом высококодифференцированной НЭО ПЖ, G2 с метастазом в печени. Для создания ортотопической PDX-модели НЭО ПЖ человека было использовано 15 самцов иммунодефицитных мышей линии Balb/c Nude массой 22–24 г. Фрагмент первичной НЭО ПЖ был трансплантирован в ПЖ 10 животным. Фрагмент метастаза НЭО в печени был имплантирован в печень 5 мышей. Наблюдение за животными проводили в течение 45 суток. Прижизненное наблюдение за ростом опухоли выполнялось с использованием визуализации на магнитно-резонансном томографе ClinScan. По окончании эксперимента осуществляли эвтаназию и некропсию. Проводили стандартное

гистологическое и иммуногистохимическое исследование с антителами к хромогранину А, синаптофизину, маркеру пролиферативной активности (Ki-67) человеческой опухоли донора и ортотопических ксенографтов в ПЖ и печени мышей. **Результаты.** Видимые изменения в состоянии мышей были замечены спустя 30 дней после операции. Они выражались в увеличении живота, его припухлости и синюшности в проекции ПЖ. Магнитно-резонансная томография показала однородное новообразование в области ПЖ. При некропии всех исследованных мышей отмечалось приживление опухолевого материала в 73% случаев, при этом в ПЖ желто-розового цвета были обнаружены опухоли желтоватого цвета с четкими контурами объемом около 100 мм³. При морфологическом анализе опухоли донора и реципиентов были гистологически схожи и идентифицированы как высококодифференцированная НЭО ПЖ, G2. При иммуногистохимическом исследовании первичная и метастатическая опухоли пациента экспрессировали антитела к хромогранину А (резко выраженная цитоплазматическая реакция) и синаптофизину (слабо выраженная цитоплазматическая реакция). Ki-67 был позитивен в 5,2% клеток. При иммуногистохимическом исследовании модели первичной опухоли и модели метастатической опухоли была выявлена умеренно выраженная цитоплазматическая окраска с антителами к хромогранину А и синаптофизину. Ki-67 в модели первичной НЭО ПЖ не превышал 5%, а в модели метастаза в печени достигал 8%. **Заключение.** В результате трансплантации опухоли ПЖ человека отмечалось приживление опухолевого материала

в 73% случаев, что следует признать хорошим результатом имплантации для первого пассажа. Согласно результатам морфологических исследований, ортотопический ксенографт, полученный от пациента, является высококодифференцированной НЭО ПЖ, G2, то есть гистологически соответствует опухоли пациента-донора. Полученная в нашем эксперименте модель повторяет гистологические особенности донорской опухоли и может найти свое применение в доклинических исследованиях новых методов лечения высококодифференцированных НЭО ПЖ, в том числе в исследованиях противоопухолевой активности новых фармакологических субстанций.

Ключевые слова: высококодифференцированная нейроэндокринная опухоль поджелудочной железы, ортотопическая PDX-модель, иммунодефицитные мыши, ксенографт, трансплантация

Для цитирования: Трифанов ВС, Максимов АЮ, Гончарова АС, Лукбанова ЕА, Карнаухов НС, Кит СО, Волкова АВ, Протасова ТП, Ткачев СЮ, Ходакова ДВ, Заикина ЕВ, Миндарь МВ, Акульшина ИМ. PDX-модель высококодифференцированной нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы на иммунодефицитных мышях линии Balb/c Nude. Альманах клинической медицины. 2020;48(2):117–24. doi: 10.18786/2072-0505-2020-48-026.

Поступила 05.06.2020; доработана 10.07.2020; принята к публикации 17.07.2020; опубликована онлайн 29.07.2020



Нейроэндокринные опухоли (НЭО) поджелудочной железы (ПЖ) возникают из островков Лангерганса и являются гормонзависимыми [1, 2]. Эти опухоли образуются в результате неконтролируемой пролиферации нейроэндокринных клеток и дальнейших генетических изменений, приводящих к гиперсекреции гормонов, таких как глюкагон, инсулин, гастрин, vasoактивный интестинальный пептид [3].

НЭО ПЖ относятся к редким заболеваниям. Среди всех опухолей ПЖ на их долю приходится от 3 до 5% [4, 5]. Мужчины болеют несколько чаще, чем женщины, – в 55% случаев [2]. По результатам исследований последних лет отмечается рост встречаемости этого заболевания [4, 6], что можно объяснить прогрессом диагностических технологий и методов [7]. Вместе с тем актуальной остается проблема выявления НЭО ПЖ на догоспитальном этапе, так как сегодня точный диагноз устанавливается преимущественно на поздних стадиях злокачественного процесса [8]. Характерная особенность НЭО ПЖ – высокий уровень метастазирования на поздних стадиях. Так, в 65–70% случаев первичного обращения пациентов регистрируют наличие метастазов в печени и других органах [9].

Несмотря на высокую частоту обращений пациентов с диагнозом НЭО ПЖ на IV стадии, прогноз более благоприятный по сравнению с другими злокачественными новообразованиями. А благодаря усовершенствованию методов лечения, улучшается и прогноз для пациентов с высококодифференцированной НЭО ПЖ [4, 10].

Существуют определенные сложности в выборе единой стратегии лечения этого заболевания ввиду его гетерогенности [3]. Сегодня в клинической практике нет единого подхода к терапии НЭО ПЖ [11]. При этом основным методом лечения признан хирургический. Опасность оперативных вмешательств связана с риском повреждения органа, что в дальнейшем может привести к развитию послеоперационной эндокринной и экзокринной недостаточности ПЖ. После выполненной резекции частота рецидивов составляет 27% в течение 3 лет и 40% в течение 5 лет [12].

В настоящее время медицина обладает широким арсеналом химиопрепаратов. Однако проблема эффективного лечения злокачественных новообразований не решена. Современные противоопухолевые лекарственные средства имеют существенные недостатки, а именно узкий диапазон терапевтических доз, тяжелые побочные

Трифанов Владимир Сергеевич – канд. мед. наук, врач-хирург отделения абдоминальной онкологии № 1 с группой рентгенэндоскопических методов диагностики и лечения, вед. науч. сотр.¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1879-6978>

Максимов Алексей Юрьевич – д-р мед. наук, профессор, заместитель генерального директора по перспективным научным разработкам¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1397-837X>

Гончарова Анна Сергеевна – канд. биол. наук, заведующая Испытательным лабораторным центром¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0676-0871>

Лукбанова Екатерина Алексеевна – науч. сотр., Испытательный лабораторный центр¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3036-6199>
✉ 346783, Ростовская обл., г. Азов, ул. Азовская, 163, Российская Федерация.
Тел.: +7 (919) 895 55 63, +7 (928) 191 45 99.
E-mail: katya.samarskaja@yandex.ru

Карнаухов Николай Сергеевич – канд. мед. наук, заведующий патологоанатомическим отделением², ассистент кафедры патологической анатомии²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0889-2720>

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; 344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России; 344022, г. Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29, Российская Федерация

эффекты и высокую стоимость [13]. В этой связи важным представляется разработка более эффективных лекарственных препаратов и изучение этиологии НЭО ПЖ. Для решения этих задач проводятся доклинические исследования с использованием животных моделей, которые должны как можно точнее отражать реальную картину патологического процесса. Такому требованию отвечают ортотопические ксенографты человеческих опухолей (patient-derived xenograft – PDX). Так, PDX-модель НЭО ПЖ имеет гетерогенный клеточный состав подобно опухолям у пациентов, а ортотопическое микроокружение адекватно влияет на онкогенез. Кроме того, в ортотопических опухолевых моделях значительно повышается вероятность метастазирования [14–16].

Цель работы – создание ортотопической PDX-модели высококодифференцированной НЭО ПЖ человека путем имплантации фрагмента опухоли пациента в ПЖ иммунодефицитных мышей.

Материал и методы

Опухолевый материал

Донором опухолевого материала был пациент Ч. с нефункционирующей (бессиндромной) высококодифференцированной НЭО ПЖ (St 4I, T3N1M1, MTS в печень, 2 кл. гр. (C25.8)). При обследовании выявлен метастаз в 5-й сегмент печени. От пациента было получено письменное согласие на передачу биологического материала.

Животные

Реципиентами опухолевого материала были 15 самцов иммунодефицитных мышей линии Balb/c Nude массой 22–24 г, полученные из SPF-вивария ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (г. Новосибирск). Мыши содержались в SPF-виварии в искусственно вентилируемых клетках в помещении с контролируемыми параметрами микроклимата (температура 18–25 °С, влажность 30–60%, световой режим «день – ночь»). Животных содержали в условиях свободного доступа к корму и воде, предварительно стерилизуемым автоклавированием. Экспериментальные работы с участием лабораторных животных проводились в соответствии с этическими правилами (план исследования был одобрен биоэтической комиссией, протокол № 19/79 от 10.01.2020).



Создание ортотопической PDX-модели

Наркоз мышам делали при помощи ксилазина концентрацией 20 мг/мл и раствора тилетамина и золазепамом концентрацией 22,57 мг/мл в дозе 1,13 мг на 20 г веса животного.

Ортотопическую PDX-модель мы получали описанным ранее способом [17]. Для обеспечения доступа к ПЖ рассекали кожу и ткани брюшной стенки перпендикулярно средней линии туловища на протяжении 22 мм. После этого делали рассечение ПЖ мыши глубиной 2 мм, длиной 2 мм. Фрагмент НЭО ПЖ человека подшивали с помощью лигатуры (шовный материал из полипропилена толщиной 5.0) к стенке ПЖ над рассечением. Затем ушивали послеоперационную рану.

Метастатическая опухоль из печени пациента была пересажена в печень иммунодефицитной мыши. Для обеспечения доступа к печени выполняли разрез перпендикулярно средней линии тела длиной 20 мм. Фрагмент опухоли донора фиксировали к печени при помощи лигатуры, после чего ушивали послеоперационную рану.

После ортотопической имплантации PDX животных наблюдали в течение 45 суток. Контролировали вес животных, общее состояние, объем опухолевого узла и распространение опухоли на соседние органы. После эвтаназии мышей путем дислокации шейных позвонков проводили некропсию. Размеры и распространение опухоли оценивали по результатам морфологических исследований.

Магнитно-резонансная томография (МРТ)

Прижизненное наблюдение за ростом опухоли проводилось с использованием визуализации на магнитно-резонансном томографе ClinScan (Bruker Biospin MRI GmbH, Германия).

Гистологический и иммуногистохимический анализ

Фрагменты новообразований фиксировали в 10% формалине в течение 24 ч и заключали в парафин. Затем готовили микросрезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Проводили гистологическое исследование человеческой опухоли – донора и ортотопических ксенографтов.

При иммуногистохимическом исследовании оценивали экспрессию хромогранина А и синоптофизина, а также маркера пролиферативной активности Ki-67. Для наибольшей точности Ki-67 определяли методом ручного подсчета отсканированных и распечатанных гистологических изображений [18].

Кит Сергей

Олегович – мл. науч. сотр., Испытательный лабораторный центр¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1566-8906>

Волкова Анастасия Владимировна

– мл. науч. сотр., Испытательный лабораторный центр¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7823-3865>

Протасова Татьяна

Пантелеевна – науч. сотр., Испытательный лабораторный центр¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6364-1794>

Ткачев Сергей

Юрьевич – мл. науч. сотр., Испытательный лабораторный центр¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8436-7250>

Ходакова Дарья

Владиславовна – мл. науч. сотр., Испытательный лабораторный центр¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3753-4463>

Заикина Екатерина

Владиславовна – мл. науч. сотр., Испытательный лабораторный центр¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0088-2990>

Миндаль Мария

Вадимовна – мл. науч. сотр., Испытательный лабораторный центр¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8734-9210>

Акулишина Инна

Михайловна – студентка²

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; 344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России; 344022, г. Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29, Российская Федерация

Результаты

Фрагменты первичной опухоли ПЖ пациента имплантировали в ПЖ 10 самцов мышей линии Balb/c Nude. Фрагменты метастатической опухоли трансплантировали в печень 5 самцам мышей. Через 5–7 дней после трансплантации произошло заживление операционного шва. Видимые изменения в состоянии части мышей (73%) были замечены спустя 30 дней после операции. При этом наблюдали увеличение живота, его припухлость и синюшность в проекции ПЖ. При проведении

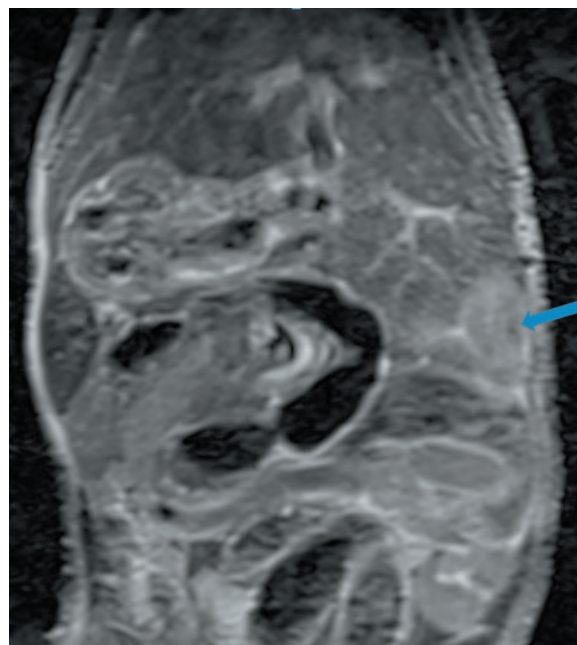


Рис. 1. Новообразование в поджелудочной железе иммунодефицитной мыши Balb/c Nude. Данные магнитно-резонансной томографии. Стрелкой обозначена опухоль в толще поджелудочной железы

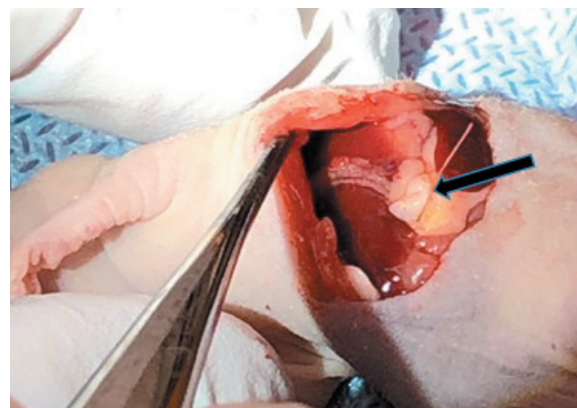


Рис. 2. Нейроэндокринная опухоль поджелудочной железы в поджелудочной железе иммунодефицитной мыши Balb/c Nude (указана стрелкой)

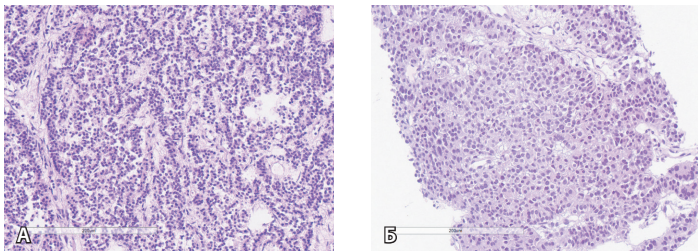


Рис. 3. Высокодифференцированная нейроэндокринная опухоль поджелудочной железы пациента Ч., G2, с метастазом в печени. Окраска гематоксилин-эозином. **А** – опухоль поджелудочной железы; $\times 100$. **Б** – метастаз в печени; $\times 200$

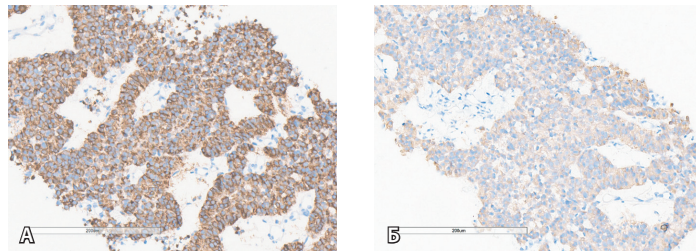


Рис. 4. Высокодифференцированная нейроэндокринная опухоль поджелудочной железы, G2, с метастазом в печени. Иммуногистохимическая реакция с антителами к хромогранину А (**А**) и синаптофизину (**Б**); $\times 200$



Рис. 5. Пroliferативная активность высокодифференцированной нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы, G2, с метастазом в печени. Для наибольшей точности использован метод ручного подсчета Ki-67 в отсканированных и распечатанных гистологических препаратах. Иммуногистохимическая реакция с антителами к Ki-67; $\times 200$

визуализации методом МРТ наблюдали однородное образование в области ПЖ (рис. 1).

Через 45 дней после трансплантации опухолевого материала животных подвергли эвтаназии и некропсии. При вскрытии мышей в ПЖ желто-розового цвета была обнаружена опухоль желтоватого цвета с четким контуром объемом около 100 мм³ (рис. 2).

При морфологическом анализе опухоль донора идентифицировали как высокодифференцированную НЭО ПЖ трабекулярного и альвеолярного строения. При обследовании выявлен метастаз в печени, имеющий схожее морфологическое строение (рис. 3).

При иммуногистохимическом исследовании первичная и метастатическая опухоли

экспрессировали антитела к хромогранину А (резко выраженная цитоплазматическая реакция) и синаптофизину (слабо выраженная цитоплазматическая реакция) (рис. 4).

Маркер пролиферативной активности (Ki-67) был позитивен в 5,2% клеток в «горячих точках» – участках скопления наибольшего количества позитивно окрашенных опухолевых клеток (рис. 5).

Ортопический ксенотрансплантат, имплантированный в ПЖ иммунодефицитных мышей, характеризовался выраженным фиброзом с сохранением небольшого количества комплексов высокодифференцированной НЭО альвеолярного строения (рис. 6А). Ксенотрансплантат, полученный при пересадке метастатической опухоли из печени пациента Ч. в печень иммунодефицитных мышей, гистологически был схож с метастазом высокодифференцированной НЭО донора (рис. 6Б).

Несмотря на иммунодефицитный статус мышей-реципиентов, модель метастаза в печени на 70% была некротизирована. Участки некроза были ограничены гигантскими многоядерными клетками типа инородных тел, сегментоядерными лейкоцитами. На отдельных участках визуализировались отложения солей кальция (рис. 7).

При иммуногистохимическом исследовании модели первичной опухоли (рис. 8) и модели метастатической опухоли (рис. 9) наблюдалась умеренно выраженная цитоплазматическая окраска с антителами к хромогранину А и синаптофизину. Ki-67 в модели первичной опухоли и модели метастаза в печень не превышал 5 и 8% соответственно.

Обсуждение

PDX-модели опухолей представляются наиболее адекватными ввиду их гетерогенного клеточного состава и значительной схожести



с человеческими опухолями по гистологическим, генетическим и физиологическим свойствам [19]. Несомненное преимущество подобных моделей – развитие опухоли в свойственном ей микроокружении, благодаря чему сохраняются особенности, присущие опухоли пациента-донора. Одним из существенных недостатков следует признать сложность наблюдения за развитием трансплантата. В нашем эксперименте мы преодолели это препятствие с помощью визуализации на магнитно-резонансном томографе. В результате исследования была получена PDX-модель высокодифференцированной НЭО ПЖ, G2, на иммунодефицитных мышцах Balb/c Nude, которая, по данным морфологических исследований, оказалась гистологически и иммунофенотипически схожей с опухолью пациента.

Приживление опухолевого материала наблюдалось в 73% случаев (11 мышей из 15), что является хорошим результатом имплантации для первого пассажа.

Необходимо отметить, что использование ортотопической PDX-модели НЭО ПЖ в доклинических исследованиях имеет ряд ограничений. Прежде всего это техническая сложность создания ортотопического ксенографта, так как исследователь должен иметь опыт проведения наркоза и микрохирургии мышей, имеющих мелкие размеры. Еще одним препятствием в использовании таких моделей служит отсутствие у некоторых лабораторий доступа к донорским резцированным опухолям. Время от момента изъятия опухолевого материала из организма пациента до имплантации в иммунодефицитную мышцу должно составлять 15–20 минут. Криоконсервация значительно уменьшает приживаемость трансплантата. Именно поэтому успешность создания ортотопической PDX-модели зависит от близости исследовательской лаборатории к клинической операционной. PDX-модель обладает

более низкой скоростью роста и более низкими показателями приживления в сравнении с подкожными ксенографтами опухолевых культур клеток, что вносит существенные коррективы в планирование исследований [20]. Тем не менее PDX-модели характеризуются значительными преимуществами, позволяющими считать их перспективными в доклинических исследованиях новых противоопухолевых препаратов, изучении особенностей канцерогенеза и реализации персонализированного подхода в клинической практике.

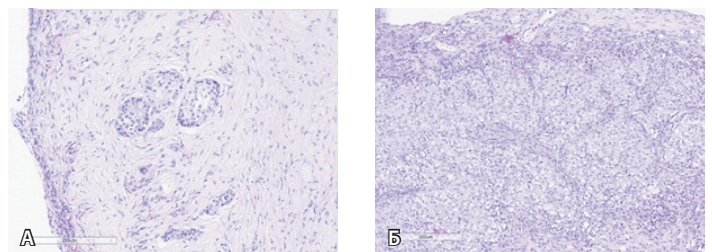


Рис. 6. Морфологическое строение первичной ортотопической модели высокодифференцированной нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы (А) и модели метастаза в печени (Б). Окраска гематоксилин-эозином; $\times 200$

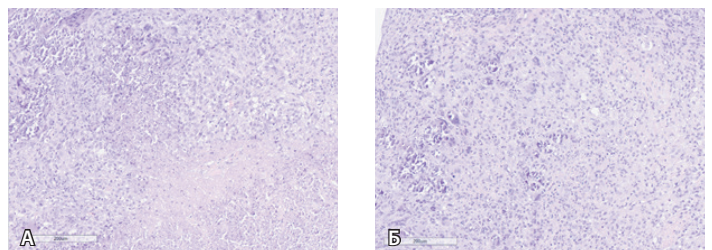


Рис. 7. Морфологическое строение модели метастаза высокодифференцированной нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы в печени. А – обширные очаги некроза в опухоли, отграниченные гигантскими многоядерными клетками инородных тел. Б – очаговое отложение солей кальция. Окраска гематоксилин-эозином; $\times 200$

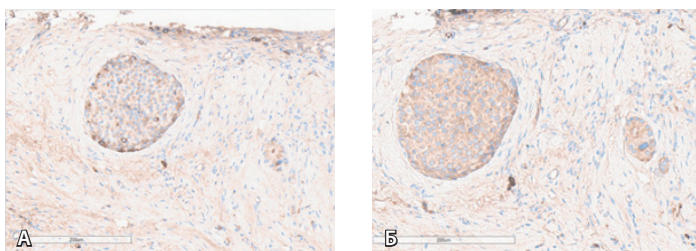


Рис. 8. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к хромогранину А (А) и синаптофизину (Б) в ортотопической модели высокодифференцированной нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы; $\times 200$

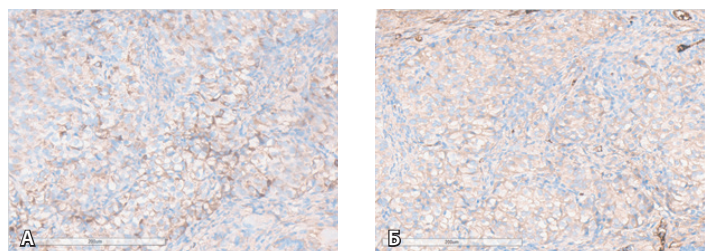


Рис. 9. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к хромогранину А (А) и синаптофизину (Б) в модели метастаза высокодифференцированной нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы; $\times 200$



Заключение

Высокодифференцированные НЭО ПЖ человека, несмотря на редкость, нуждаются в особом внимании ученых и врачей-онкологов, так как нередко обнаруживаются у пациентов уже на поздних стадиях, когда обладают высоким потенциалом метастазирования. Современные методы лечения данного заболевания имеют ряд недостатков, поэтому актуальным остается изучение этиологии НЭО ПЖ и разработка новых более эффективных терапевтических методов. Для реализации подобных задач используют

ортотопические ксенографты опухолей человека.

В результате нашего эксперимента получены ортотопические PDX-модели высокодифференцированной НЭО ПЖ человека на иммунодефицитных мышах, сохранившие гистологические особенности опухоли пациента-донора. При этом наблюдали высокий процент приживления опухолевого материала – в 73% случаев. Полученная модель может использоваться для доклинических исследований новых терапевтических подходов к лечению высокодифференцированной НЭО ПЖ. ☞

Дополнительная информация

Финансирование

Работа выполнена в рамках госзадания «Разработка и применение новых методов клеточных технологий для иммунотерапии опухолей».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов, связанных с данной работой.

Участие авторов

В.С. Трифанов – разработка дизайна исследования, анализ и интерпретация результатов, написание и редактирование текста; А.Ю. Максимов – концепция и дизайн статьи, редактирование текста, утверждение итогового варианта текста рукописи; А.С. Гончарова, С.О. Кит и С.Ю. Ткачев – анализ и интерпретация результатов

исследования, написание текста статьи; Е.А. Лукбанова – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, анализ полученных данных, написание текста, отправка рукописи; Н.С. Карнаухов – анализ результатов, написание текста, статистическая обработка данных, редактирование рукописи; А.В. Волкова, Д.В. Ходакова и И.М. Акульшина – создание ксенографтов нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы, проведение комплексного обследования животных, написание текста; Т.П. Протасова и Е.В. Заикина – уход и наблюдение за лабораторными животными, проведение комплексного обследования животных, написание текста; М.В. Миндарь – дизайн экспериментальной части исследования, анализ результатов, написание текста. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Литература

- Ehehalt F, Saeger HD, Schmidt CM, Grützmann R. Neuroendocrine tumors of the pancreas. *Oncologist*. 2009;14(5):456–67. doi: 10.1634/theoncologist.2008-0259.
- Halfdanarson TR, Rabe KG, Rubin J, Petersen GM. Pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs): incidence, prognosis and recent trend toward improved survival. *Ann Oncol*. 2008;19(10):1727–33. doi: 10.1093/annonc/mdn351.
- Jeune F, Taibi A, Gaujoux S. Update on the Surgical Treatment of Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Scand J Surg*. 2020;109(1):42–52. doi: 10.1177/1457496919900417.
- Dasari A, Shen C, Halperin D, Zhao B, Zhou S, Xu Y, Shih T, Yao JC. Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncol*. 2017;3(10):1335–42. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.0589.
- Майстренко НА, Ромащенко ПН, Лысанюк МВ. Диагностика и хирургическое лечение нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы и желудочно-кишечного тракта. *Анналы хирургической гепатологии*. 2016;21(1):13–20. doi: 10.16931/1995-5464.2016113-20.
- Hallet J, Law CH, Cukier M, Saskin R, Liu N, Singh S. Exploring the rising incidence of neuroendocrine tumors: a population-based analysis of epidemiology, metastatic presentation, and outcomes. *Cancer*. 2015;121(4):589–97. doi: 10.1002/cncr.29099.
- Lawrence B, Gustafsson BI, Chan A, Svejda B, Kidd M, Modlin IM. The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2011;40(1):1–18, vii. doi: 10.1016/j.ecl.2010.12.005.
- Пинский СБ, Белобородов ВА, Батороев ЮК, Дворниченко ВВ. Нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2013;120(5):12–7.
- Янкин АВ. Нейроэндокринные опухоли желудочно-кишечного тракта. *Практическая онкология*. 2005;6(4):227–33.
- Vaghaiwalla T, Keutgen XM. Surgical management of pancreatic neuroendocrine tumors. *Surg Oncol Clin N Am*. 2020;29(2):243–52. doi: 10.1016/j.soc.2019.11.008.
- Черноусов АФ, Егоров АВ, Мусаев ГХ, Фоминных ЕВ, Кондрашин СА, Васильев ИА, Парнова ВА, Анисимова ОВ. Нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы: 30-летний опыт клиники факультетской хирургии им. Н.Н. Бурденко. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2013;(7):13–9.
- Singh S, Chan DL, Moody L, Liu N, Fischer HD, Austin PC, Segelov E. Recurrence in Resected Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *JAMA Oncol*. 2018;4(4):583–5. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.0024.
- Имянитов ЕН, Моисеенко ВМ. Применение молекулярно-генетического анализа для выбора противоопухолевой цитостатической терапии. *Онкогематология*. 2007;2(3):4–8.
- Холоденко РВ, Холоденко ИВ, Доронин ИИ. Опухолевые модели в изучении онкологических заболеваний. *Иммунология*. 2013;34(5):282–6.
- Wang Y, Cui J, Wang L. Patient-derived xenografts: a valuable platform for clinical and preclinical research in pancreatic cancer. *Chin Clin Oncol*. 2019;8(2):17. doi: 10.21037/cco.2019.02.04.
- Qiu W, Su GH. Challenges and advances in mouse modeling for human pancreatic tumorigenesis and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2013;32(1–2):83–107. doi: 10.1007/s10555-012-9408-2.



17. Трифанов ВС, Максимов АЮ, Кит СО, Гончарова АС, Волкова АВ, Лукбанова ЕА, Миндарь МВ, Ходакова ДВ, Ткачев СЮ, Заикина ЕВ, Протасова ТП, авторы; ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России, патентообладатель. Способ трансплантации фрагмента нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы человека в поджелудочную железу иммунодефицитных мы-

шей. Пат. RU 2 725 273 C1 Рос. Федерация. Оpubл. 05.11.2019.

18. Кит ОИ, Дерижанова ИС, Карнаухов НС. Вопросы классификации нейроэндокринных опухолей желудка. Вопросы онкологии. 2016;62(5):573–9.

19. Lee NP, Chan CM, Tung LN, Wang HK, Law S. Tumor xenograft animal models for esophageal squamous cell carcinoma. J Biomed Sci. 2018;25(1):66. doi: 10.1186/s12929-018-0468-7.

20. Кит ОИ, Колесников ЕН, Максимов АЮ, Протасова ТП, Гончарова АС, Лукбанова ЕА. Методы создания ортотопических моделей рака пищевода и их применение в доклинических исследованиях. Современные проблемы науки и образования. 2019;(2):96 [Интернет]. Доступно на: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=28606>.

References

- Ehehalt F, Saeger HD, Schmidt CM, Grützmann R. Neuroendocrine tumors of the pancreas. *Oncologist*. 2009;14(5):456–67. doi: 10.1634/theoncologist.2008-0259.
- Halfdanarson TR, Rabe KG, Rubin J, Petersen GM. Pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs): incidence, prognosis and recent trend toward improved survival. *Ann Oncol*. 2008;19(10):1727–33. doi: 10.1093/annonc/mdn351.
- Jeune F, Taibi A, Gaujoux S. Update on the Surgical Treatment of Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Scand J Surg*. 2020;109(1):42–52. doi: 10.1177/1457496919900417.
- Dasari A, Shen C, Halperin D, Zhao B, Zhou S, Xu Y, Shih T, Yao JC. Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncol*. 2017;3(10):1335–42. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.0589.
- Maystrenko NA, Romashchenko PN, Ly-sanyuk MV. [Diagnosis and surgical treatment of neuroendocrine tumors of the pancreas and gastrointestinal tract]. *Annals of HPB Surgery*. 2016;21(1):13–20. Russian. doi: 10.16931/1995-5464.2016113-20.
- Hallet J, Law CH, Cukier M, Saskin R, Liu N, Singh S. Exploring the rising incidence of neuroendocrine tumors: a population-based analysis of epidemiology, metastatic presentation, and outcomes. *Cancer*. 2015;121(4):589–97. doi: 10.1002/cncr.29099.
- Lawrence B, Gustafsson BI, Chan A, Svejda B, Kidd M, Modlin IM. The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2011;40(1): 1–18, vii. doi: 10.1016/j.ecl.2010.12.005.
- Pinsky SB, Beloborodov VA, Batoroiev JK, Dvornichenko VV. [Pancreatic neuroendocrine tumors]. *Siberian Medical Journal (Irkutsk)*. 2013;120(5):12–7. Russian.
- Yankin AV. [Gastrointestinal neuroendocrine tumors]. *Practical Oncology*. 2005;6(4):227–33. Russian.
- Vaghaiwalla T, Keutgen XM. Surgical management of pancreatic neuroendocrine tumors. *Surg Oncol Clin N Am*. 2020;29(2):243–52. doi: 10.1016/j.soc.2019.11.008.
- Chernousov AF, Egorov AV, Musaev GK, Fominykh EV, Kondrashin SA, Vasil'ev IA, Parnova VA, Anisimova OV. [Neuroendocrine tumors of a pancreas: 30 year's experience of clinic of faculty surgery of N.N. Burdenko]. *Pirogov Russian Journal of Surgery*. 2013;(7):13–9. Russian.
- Singh S, Chan DL, Moody L, Liu N, Fischer HD, Austin PC, Segelov E. Recurrence in Resected Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *JAMA Oncol*. 2018;4(4):583–5. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.0024.
- Imyanitov EN, Moiseyenko VM. [Molecular-based choice of cytotoxic therapy for cancer]. *Oncohematology*. 2007;2(3):4–8. Russian.
- Kholodenko RV, Kholodenko IV, Doronin II. [Tumor models in the study of cancer diseases]. *Immunologiya*. 2013;34(5):282–6. Russian.
- Wang Y, Cui J, Wang L. Patient-derived xenografts: a valuable platform for clinical and preclinical research in pancreatic cancer. *Chin Clin Oncol*. 2019;8(2):17. doi: 10.21037/cco.2019.02.04.
- Qiu W, Su GH. Challenges and advances in mouse modeling for human pancreatic tu-

Patient-derived xenograft model of well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumor in immunodeficient Balb/c Nude mice

V.S. Trifanov¹ • A.Yu. Maksimov¹ • A.S. Goncharova¹ • E.A. Lukbanova¹ • N.S. Karnaukhov^{1,2} • S.O. Kit¹ • A.V. Volkova¹ • T.P. Protasova¹ • S.Yu. Tkachev¹ • D.V. Khodakova¹ • E.V. Zaikina¹ • M.V. Mindar¹ • I.M. Akulshina²

Background: Orthotopic patient-derived xenografts (PDX) in immunodeficient mice are recognized as the most adequate neoplastic model due to their ability to maintain primary tumor properties after implantation. They can be used to study anti-neoplastic effects of pharmacological substances *in vivo* and to investigate characteristics and mechanisms of carcinogenesis.

Results of preclinical studies of pharmacological substances obtained with PDX models are virtually no different from those of subsequent clinical trials. **Aim:** To develop an orthotopic PDX model of a highly differentiated human pancreatic neuroendocrine tumor (pNET) by implanting a fragment of the patient's tumor into the pancreas of immunodeficient mice. **Materials and methods:**

A tumor fragment was obtained from a patient with a highly differentiated pNET G2 and liver metastasis. Fifteen (15) male immunodeficient Balb/c Nude mice with a mass of 22–24 grams were used to establish the orthotopic PDX model of human well-differentiated pNET. A fragment of primary pNET was orthotopically transplanted into the pancreas of 10 animals. A fragment of the



morigenesis and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2013;32(1–2):83–107. doi: 10.1007/s10555-012-9408-2.

17. Trifanov VS, Maksimov AYU, Kit SO, Goncharova AS, Volkova AV, Lukbanova EA, Mindar MV, Khodakova DV, Tkachev SYu, Zaikina EV, Protasova TP, inventors; National Medical Research Centre for Oncology, assignee. Method of human pancreatic neuroendocrine tumor fragment transplantation into immu-

nodeficiency mice pancreatic gland. Russian Federation patent RU 2 725 273 C1. 2019 Nov 05.

18. Kit OI, Derizhanova IS, Karnaukhov NS. [Issues on classification of gastric neuroendocrine tumors]. *Problems in Oncology.* 2016;62(5): 573–9. Russian.

19. Lee NP, Chan CM, Tung LN, Wang HK, Law S. Tumor xenograft animal models for esophageal squamous cell carcinoma. *J Biomed*

Sci. 2018;25(1):66. doi: 10.1186/s12929-018-0468-7.

20. Kit OI, Kolesnikov EN, Maksimov AYU, Protasova TP, Goncharova AS, Lukbanova EA. [Methods of creation and application of orthotopic models of esophageal cancer in preclinical studies]. *Modern Problems of Science and Education.* 2019;(2):96 [Internet]. Russian. Available from: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=28606>.

metastatic lesion was transplanted into the liver of 5 animals. The animals were followed for up to 45 days. *In vivo* monitoring of the tumor growth was performed with a magnetic resonance imaging (MRI) system (ClinScan, Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany). At the end of the experiment, animals were euthanized and autopsies were performed, with routine histopathological examination and immunohistochemical study with antibodies to human chromogranin A, synaptophysin, and the marker of proliferative activity (Ki-67) of both original donor tumor and orthotopic pancreatic and liver xenografts. **Results:** Obvious changes in the mice condition were noticed at 30 days after surgery. They manifested as an increase in abdominal distension, swelling, and cyanosis in the projection of the pancreas. MRI showed a homogeneous neoplasm in the pancreas. At autopsy, the engraftment rate was 73% of all study animals, with yellow masses with even contours and a volume of about 100 cm³ present within the yellow-pink pancreatic tissues. The morphological assessment showed histological similarity between the original patient's tumor and patient-derived xenografts, which were identified as highly differentiated G2 pNETs. At immunohistochemical assessment, the patient's primary and metastatic tumor tissue specimens expressed anti-chromogranin A (full-blown cytoplasmic reaction) and anti-synaptophysin (mild cytoplasmic reaction) antibodies. Ki-67 was positive in 5.2% of the cells. An immunohistochemical study of the orthotopic tumor fragments and

heterotopic tumor fragments showed moderate cytoplasmic staining with antibodies to chromogranin A and synaptophysin. The rate of Ki-67 in the orthotopic pNET model and metastatic model does not exceed 5% and 8%, respectively. **Conclusion:** Engraftment of tumor material after transplantation of human pancreatic cancer was observed in 73% of the cases, which should be considered a good first passage implantation result. The morphological studies confirmed that the orthotopic PDX was a well-differentiated pNET, histologically corresponding to the donor tumor. The model created in the experiment mirrors the histological characteristics of the donor tumor and can be used in preclinical studies of new treatments for well-differentiated pNETs, including those of antitumor activity of new pharmacological substances.

Key words: pancreatic neuroendocrine tumor (pNET), orthotopic PDX model, immunodeficient mice, xenograft, transplantation

For citation: Trifanov VS, Maksimov AYU, Goncharova AS, Lukbanova EA, Karnaukhov NS, Kit SO, Volkova AV, Protasova TP, Tkachev SYu, Khodakova DV, Zaikina EV, Mindar MV, Akulshina IM. Patient-derived xenograft model of well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumor in immunodeficient Balb/c Nude mice. *Almanac of Clinical Medicine.* 2020;48(2):117–24. doi: 10.18786/2072-0505-2020-48-026.

Received 5 June 2020; revised 10 July 2020; accepted 17 July 2020; published online 29 July 2020

Funding

The study was performed within a state-funded project "Development and application of new cell technology methods for immunotherapy of neoplasms".

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Authors' contributions

V.S. Trifanov, the study design, analysis and interpretation of the results, text writing and editing; A.Yu. Maksimov, the study concept and design, text editing, approval of the final version of the manuscript; A.S. Goncharova, S.O. Kit and S.Yu. Tkachev, analysis and interpretation of the study results, text writing; E.A. Lukbanova, the study concept and design, data collection, management and analysis, text writing, sending of the manuscript; N.S. Karnaukhov, analysis of the study results, text writing, statistical analysis, text editing; A.V. Volkova, D.V. Khodakova and I.M. Akulshina, establishment of patient-derived xenografts, of laboratory animals, text writing; T.P. Protasova and E.V. Zaikina, care, follow-up, examination of laboratory animals, text writing; M.V. Mindar, experimental part of the study design, analysis of the results, text writing. All the authors made their significant contributions to the research and preparation of the article, have read and approved the final version before submission.

Vladimir S. Trifanov – MD, PhD, Surgical Oncologist, Department of Abdominal Oncology No. 1 with a Group of Roentgen Endovascular Methods of Diagnostics and Treatment, Leading Research Fellow¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1879-6978>

Aleksey Yu. Maksimov – MD, PhD, Professor, Deputy General Director for Prospective Scientific Research¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1397-837X>

Anna S. Goncharova – PhD (in Biology), Head of Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0676-0871>

Ekaterina A. Lukbanova – Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3036-6199>

✉ 163 Azovskaya ul., Azov, 346783, Rostov Region, Russian Federation.
Tel.: +7 (919) 895 55 63, +7 (928) 191 45 99.
E-mail: katya.samarskaja@yandex.ru

Nikolay S. Karnaukhov – MD, PhD, Head of Pathology Department¹; Assistant of the Pathologic Anatomy Chair²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0889-2720>

Sergey O. Kit – Junior Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1566-8906>

Anastasia V. Volkova – Junior Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7823-3865>

Tatiana P. Protasova – Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6364-1794>

Sergey Yu. Tkachev – Junior Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8436-7250>

Darya V. Khodakova – Junior Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3753-4463>

Ekaterina V. Zaikina – Junior Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0088-2990>

Mariya V. Mindar – Junior Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8734-9210>

Inna M. Akulshina – Student²

¹ National Medical Research Centre for Oncology; 63 14th Liniya, Rostov-on-Don, 344037, Russian Federation

² Rostov State Medical University; 29 Nakhichevskiy per., Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation