

А. Г. Резников

Методология тестирования противоопухолевой активности фармакологических препаратов на нефросубкапсулярных ксенографтах у мышей

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ имени В. П. Комиссаренко НАМН Украины», г. Киев

В истории фармакологии, как и других отраслях науки, известны эпизоды, когда выбор неадекватных методов и недостаточно критическое отношение к полученным результатам приводили к ошибочным выводам. Поэтому валидация методов оценки специфической активности и безопасности потенциальных лекарственных средств имеет первостепенное значение. Этот постулат относится и к поиску средств лечения злокачественных новообразований.

Подобно другим лекарственным средствам, создание противоопухолевых препаратов проходит длительный путь. Как правило, первичный скрининг потенциальной действующей субстанции, предложенной на основании компьютерного моделирования (*in silico*) при помощи программы SAR (structure-activity relationships) или других программ, проводится на культурах клеточных опухолевых линий. Ввиду того, что для роста раковой опухоли значение имеют ее микроокружение, развитие кровеносных сосудов, эпителиально-стромальные взаимоотношения, а стромальные элементы и сосуды в клеточных линиях рака отсутствуют, полученные результаты не могут быть непосредственно приложимы к опухоли, растущей в организме. Поэтому в случае выявления противоопухолевой активности *in vitro* тестирование продолжается в экспериментах *in vivo*.

В экспериментальной онкологии существует множество «животных» моделей спонтанных, индуцированных и перевивных злокачественных опухолей (рак, саркома и др.), на которых можно наблюдать особенности их развития, прогрессирования, метастазирования, динамику неоваскулогенеза, воспаления, гипоксии



Академик НАМН Украины
А. Г. Резников

и прочих факторов микроокружения. Известно, например, что гормонозависимые аденокарциномы – рак простаты, грудной железы, матки – эволюционируют от стадии чувствительности к гормональной терапии до гормон-резистентного состояния, когда возникает необходимость в назначении цитотоксической химиотерапии и других негормональных методов лечения. Однако с целью сокращения сроков фармакологического тестирования и приближения к реальному объекту проводятся исследования на модели ксенографтов первой генерации раковой ткани человека у лабораторных животных, например, мышей [1]. Следует сразу оговориться, что данная модель может рассматриваться лишь как промежуточный этап между тестированием препаратов *in vitro* и исследованиями на долгоживущих опухолях.

С целью предотвращения цитотоксического иммунного ответа на гетеротрансплантацию и увеличения продолжительности жизни опухолевого трансплантата предпочтение отдают бести-

мусным (nude), облученным и другим иммунодефицитным мышам, например, получавшим циклоспорин или циклофосфамид [2, 3]. Сложность содержания таких животных, их дороговизна побудили обратиться к экспериментам на иммунокомпетентных мышах. К тому же утверждалось [4], что первичные хирургические экспланты в нефросубкапсулярном тесте чаще демонстрируют позитивный рост у иммунокомпетентных мышей (через 6 дней – в 82 % подсадок), чем у иммунодефицитных бестимусных мышей (через 11 дней – в 30 % подсадок). Оценка пригодности иммунокомпетентных мышей для изучения противоопухолевой активности препаратов оказалась неоднозначной [3–5], что и побудило нас провести ретроспективный анализ результатов собственных исследований [6–8].

Тестирование противоопухолевой активности препаратов проводили на ксенографтах рака предстательной железы человека, идентифицированного патоморфологом как аденокарцинома. В 80–85 % случаев она проявляет чувствительность к стимулирующему действию андрогенов. В качестве реципиентов ксенографтов использовали самцов иммунокомпетентных мышей линии СВА, которых содержали в виварии института на стандартном пище-

вом рационе. Все манипуляции с ними выполняли с соблюдением норм «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1986), и национальных рекомендаций по биоэтике. Источником раковой ткани служили фрагменты опухоли, полученной после радикальной простатэктомии (д. м. н. В. Н. Григоренко), с обязательным получением информированного согласия пациентов. Для трансплантации нарезали кусочки со средней массой $0,99 \pm 0,01$ мг, под капсулу левой почки подсаживали по два кусочка. Тестируемые препараты начинали вводить ежедневно после трех дней роста ксенографтов, через 24 ч после последнего введения животных декапитировали, ксенографты извлекали, взвешивали и результаты сравнивали со средним приростом массы в контрольной группе, принятым за 100 %. Часть мышей-реципиентов кастрировали до подсадки раковой ткани. Торможение роста ксенографтов у них свидетельствовало о принадлежности опухоли к андрогензависимому варианту.

Гистологические и гистохимические исследования включали световую микроскопию препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, оценку апоптоза по наличию апоптозных

Таблица 1

Влияние разных доз флутамида на рост нефросубкапсулярных ксенографтов рака простаты человека у самцов мышей СВА

Условия опыта	Кол-во ксенографтов	Прирост массы, (M ± m) мг	Процент прироста в контроле	Гистологические признаки атрофии и деструкции опухоли (баллы)	Эпителиально-стромальное соотношение, (M ± m), (n)
Контроль	49	0,82 ± 0,08	100	1	0,44 ± 0,04 (n = 39)
Флутамид 2,5 мг/кг	12	0,11 ± 0,12*	13,4	2	0,39 ± 0,07 (n = 8)
Флутамид 5 мг/кг	12	0,15 ± 0,07*	18,3	3	0,35 ± 0,03* (n = 13)
Флутамид 10 мг/кг	20	0,35 ± 0,08*	42,7	4	0,32 ± 0,04* (n = 15)
Флутамид 25 мг/кг	6	0,72 ± 0,22	87,8	5	0,22 ± 0,04* (n = 6)

Примечание. Здесь и в табл. 2: *P ≤ 0,05 в сравнении с контрольной группой; n – количество ксенографтов.

телец, разрывам концевых отделов нитей ДНК (метод TUNEL), вычисление соотношения площадей, занятых эпителием и стромой, при помощи компьютерной программы Adobe Photoshop CS3 после окрашивания на выявление соединительной ткани (коллагеновых волокон) по методу Маллори. Степень дегенеративно-атрофических изменений оценивали по пятибалльной шкале.

Весьма показательны результаты тестирования способности флутамида задерживать рост и вызывать деструктивно-атрофические изменения в ксенографтах рака предстательной железы человека (табл. 1). (Флутамид является нестероидным антагонистом андрогенных рецепторов, он широко применяется с целью андрогенной депривации в качестве средства лечения рака простаты и его метастазов [9].)

Мышам-реципиентам ежедневно, в течение трех дней (4–6 дни роста), вводили *per os* при помощи желудочного зонда таблеточную массу препарата Флутафарм (ВАТ «Фармак»), содержащего флутамид, в геле Дорфмана. Доза флутамида в разных группах варьировала от 2,5 до 25,0 мг/кг.

Исследование антиандрогенной активности флутамида на вентральной доле предстательной железы крыс в стандартном тесте Хершбергера и на половозрелых животных демонстрирует отчетливую прямую зависимость степени атрофии органа-мишени от дозы [10]. Поэтому неожиданностью оказалось не только отсутствие прямой зависимости прироста массы ксенографтов от дозы флутамида, но, напротив, обратно пропорциональная зависимость. Однако результаты гистологического и гистохимического исследования ксенографтов привели к противоположным выводам относительно влияния флутамида на рост опухоли.

Прежде всего, следует обратить внимание на то, что в большинстве препаратов в краевой зоне ксенографтов контрольной и опытных групп виден грануляционный вал (лимфоидная инфильтрация). В центральной зоне малигнизированные эпителиоциты выстилают ациноподобные структуры в виде многослойного эпителия. Клетки

имеют преимущественно веретенообразный вид и большие овальные ядра с ядрышком. Визуально иногда определяется увеличение площади соединительной ткани, особенно при максимальной дозе антиандрогена. Обычно при этом имеет место слабая или умеренная лейкоцитарная инфильтрация стромы и эпителия.

По мере увеличения дозы флутамида возрастала выраженность дегенеративно-атрофических изменений эпителиоцитов и количество апоптозных телец, разрыхление многослойного эпителия и его отслойка от базальной мембраны ацинусов, увеличение периацинарных и перичеселлюлярных пространств. Соответственно, эпителиально-стромальное соотношение уменьшалось с увеличением дозы флутамида. Чем большей была доза флутамида, тем сильнее были выражены признаки отека стромы. Вероятной причиной этого является увеличение онкотического давления в тканях вследствие присутствия белковых продуктов клеточного детрита.

Таким образом, результаты гистологического исследования ксенографтов однозначно свидетельствуют, во-первых, о чувствительности ксенографтов рака простаты человека к фармакологической блокаде стимулирующего влияния тестостерона, секретлируемого семенниками мышши-реципиента, и, во-вторых, о прямой зависимости противоопухолевого эффекта флутамида от дозы антиандрогена. Что касается неадекватности полученных результатов измерения массы ксенографтов, то они объясняются тем, что противоопухолевый эффект маскируется отеком и лейкоцитарной инфильтрацией как проявлением иммунной воспалительной реакции.

Отсутствие прямой зависимости уменьшения конечной массы ксенографтов от дозы тестируемого препарата наблюдалось и при введении рекомбинантного белка ЕМАР-II (endothelial monocyte-activating polypeptide-II) – провоспалительного цитокина с ангиогенной активностью.

ЕМАР-II – это мультифункциональный белок, который возникает в злокачественных опухолях млекопитающих

в результате альтернативного сплайсинга и посттрансляционного процессинга из его предшественника – белка р43, являющегося фрагментом тирозил-ТРНК-мультисинтезазного комплекса [11]. При повреждении тканей он выходит из клеток в межклеточное пространство и выступает в роли одного из медиаторов воспаления, привлекая нейтрофилы и моноциты в зону повреждения и повышая чувствительность тканей к фактору некроза опухоли-альфа (ФНО-альфа). Кроме того, цитокин усиливает апоптоз и тормозит неоваскулогенез, что является одним из механизмов его противоопухолевого действия. Имеется синергизм в действии ЕМАР-II и ФНО-альфа на апоптоз, что связано с реализацией эффекта через один и тот же фермент – протеинкиназу JNK, а также с ингибированием в определенных концентрациях экспрессии VEGF в опухолевой ткани. Ранее нами была продемонстрирована способность ЕМАР-II вызывать дегенеративно-воспалительные и проапоптотические эффекты в ксенографтах рака простаты человека, то есть, в отсутствие функционирующих кровеносных сосудов [7].

В опытах использовали рекомбинантный ЕМАР-II, полученный чл.-корр. НАН Украины А. И. Корнелюком (Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины). Схема тестирования была такой же, как и при изучении эффектов флутамида. Раствор ЕМАР-II вводили мышам-реципиентам подкожно, один раз в сутки.

Влияние минимальной дозы белка (1,0 мкг/кг м.т.) в отношении конечной массы ксенографтов намного превосходило эффект кастрации. Фактически при всех изученных дозах, за исключением 200,0 мкг/кг м.т., получено полное или почти полное торможение роста ксенографтов, если судить по конечной массе (табл. 2). Парадоксальным образом максимальная доза не только не снизила прирост массы ксенографтов, но даже превысила его в контрольной группе в процентном выражении. Вероятнее всего, это связано с выраженной лейкоцитарной инфильтрацией тканей.

При гистологическом и гистохимическом исследовании наблюдалась зависимость выраженности дегенеративных изменений малигнизированного ацинарного эпителия от дозы в диапазоне 10,0–200 мкг/кг м.т. Образовавшиеся

Таблица 2

Влияние кастрации и разных доз рекомбинантного цитокина ЕМАР-II на рост нефросубкапсулярных ксенографтов рака простаты человека у самцов мышей СВА

Условия опыта	Кол-во ксенографтов	Прирост массы, (M ± m) мг	Процент от прироста в контроле	Гистологические признаки атрофии и деструкции опухоли, баллы	Эпителиально-стромальное соотношение, (M ± m), (n)
Контроль	81	0,94±0,09	100	1	0,43 ± 0,04 (n = 47)
Кастрация	50	0,32±0,07*	34,0	3	-
ЕМАР-II 1,0 мкг/кг	14	0,06±0,04*	6,4	3	0,31 ± 0,06 (n = 7)
ЕМАР-II 5,0 мкг/кг	36	0,18±0,05*	18,1	3-4	-
ЕМАР-II 10,0 мкг/кг	46	0,22±0,04*	23,4	3-4	0,32 ± 0,06 (n = 17)
ЕМАР-II 100,0 мкг/кг	52	0,37±0,05*	38,3	4	0,30 ± 0,08 (n = 9)
ЕМАР-II 200,0 мкг/кг	8	1,55±0,31	164,9	5	-

некротические массы скапливались в просвете ацинусов и протоков. Методом TUNEL обнаружено множество эпителиальных клеток в состоянии апоптоза. Уменьшение эпителиально-стромальных соотношений близко к уровню статистической достоверности, хотя и не демонстрировало зависимости от дозы ЕМАР-II в исследованном диапазоне 1,0–100 мкг/кг м.т.

Таким образом, при использовании иммунокомпетентных мышей-реципиентов для тестирования противоопухолевой активности фармпрепаратов суще-

ствует вероятность ошибочного заключения из-за возможного несоответствия изменений массы ксенографтов и их гистологического строения. Это предопределяет необходимость проведения гистологических исследований, что увеличивает продолжительность исследования и снижает ценность метода для экспресс-оценки противоопухолевой активности. Однако доступность и дешевизна иммунокомпетентных мышей, в сравнении с бестимусными животными, делают оправданным их использование.

1. Voskoglou-Nomikos T. Clinical predictive value of the *in vitro* cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models / Voskoglou-Nomikos T., Pater J. L., Seymour L. // Clin. Cancer Res. – 2003. – V. 9. – P. 4227–4239.
2. Van Weerden W. M. Animal models in the study of progression of prostate and breast cancer to endocrine independency / Van Weerden W. M. // Mechanisms of progression to hormone-independent growth of breast and prostatic cancer. Ed. by Berns P. M. J. J., Romijn J. C., Schroder F. H. – New Jersey: Parthenon, 1991. – P. 55–70.
3. Bennett J. A. Evaluation of growth and histology of human tumor xenografts implanted under the renal capsule of immunocompetent and immunodeficient mice / Bennett J. A., Pilon V. A., MacDowell R. T. // Cancer Res. – 1985. – V. 45. – P. 4963–4969.
4. Growth of human tumor xenografts implanted under the renal capsule of normal immunocompetent mice / Bogden A. E., Haskell P. M., LePage D. J. [et al.] // Exp. Cell Biol. – 1979. – V. 47, № 4. – P. 281–293.
5. Characteristics of human tumour xenografts transplanted under the renal capsule of immunocompetent mice / Aamdall S., Fodstad Q., Nesland J. M., Pihl A. // Br. J. Cancer. – 1985. – V. 51. – P. 347–356.
6. Динамика роста и патогистологическая характеристика опухолевых ксенографтов как объекта тестирования противоопухолевой активности препаратов / Полякова Л. И., Пристопок В. С., Чайковская Л. В., Резников А. Г. // Патология. – 2011. – Т. 8, № 3. – С. 51–54.
7. Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcinoma in mouse xenograft model / Reznikov A. G., Chaykovskaya L. V., Polyakova L. I., Kornelyuk A. I. // Exper. Oncol. – 2007. – V. 29, № 4. – P. 267–271.
8. Cooperative antitumor effect of endothelial-monocyte activating polypeptide II and flutamide on human prostate cancer xenografts / Reznikov A. G., Chaykovskaya L. V., Polyakova L. I. [et al.] // Exp. Oncol. – 2011. – V. 33, № 4. – P. 231–234.
9. Vozianov O. Androgen deprivation strategy in prostate cancer / O. Vozianov, A. Reznikov, I. Klimenko. – К.: Naukova Dumka, Ternopil: Ukrmedknyga, 2001. – 240 p.
10. Резников А. Г. Антиандрогены / А. Г. Резников, С. В. Варга – М.: Медицина, 1988. – 208 с.
11. Резников А. Г. Аминоацил-тРНК-синтетазы: новая перспектива иммуномодуляции, регенерации и противоопухолевой терапии / Резников А. Г., Корнелюк А. И. // Вісник фармакол. фармації. – 2008. – № 9. – С. 2–8.