

Моделирование рака молочной железы.

Петрова М.И., Бузулуцкая Е.И., Рябоштан П.Ф.

ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава Российской Федерации, направление подготовки «Биология»,
Россия, Волгоград, e-mail: mashapetrovabk12@mail.ru

Аннотация: Рак молочной железы - это рак, который развивается из ткани молочной железы. Рак молочной железы является одним из наиболее распространенных видов рака среди женщин во всем мире, представляя большинство новых случаев рака и связанных с раком смертей в соответствии с глобальной статистикой, что делает его значительной проблемой общественного здравоохранения в современном обществе. Значительные достижения в лечении рака молочной железы улучшили показатели выживаемости, но метастатическое заболевание продолжает оставаться основной причиной смертности, связанной с раком молочной железы. Разработка новых методов лечения метастатического рака молочной железы требует доклинические модели, которые лучше резюмируют важные клинические особенности заболевания, в том числе метастазирование. Большую роль в усовершенствовании методов лечения рака молочной железы сыграли исследования *in vivo*, испытания потенциально эффективных противоопухолевых воздействий на живом организме, поскольку среда клеточной культуры не может полностью повторить сложные многоклеточные и клеточно-внеклеточные матричные взаимодействия, которые участвуют в инициации и прогрессировании рака молочной железы. Из-за сложности и неоднородности рака молочной железы ни одна отдельная модель не повторяет все аспекты этого заболевания. Таким образом, комплексный и многосистемный подход в настоящее время является самым сильным способом моделирования этого заболевания.

Ключевые слова: рак молочной железы, моделирование, исследования *in vivo*, метастазы.

Modeling of breast cancer.

Petrova M.I., Buzulutsckaya E.I., Ruabostan P.F.

FSBEI HE VolgSMU Of the Ministry of Healthcare of the Russian, direction of preparation «Biology»,
Russia, Volgograd, email: mashapetrovabk12@mail.ru

Abstract: Breast cancer is a cancer that develops from breast tissue. Breast cancer is one of the most common cancers among women worldwide, representing the majority of new cancer cases and cancer-related deaths according to global statistics, making it a significant public health issue in modern society. Significant advances in breast cancer treatment have improved survival rates, but metastatic disease continues to be the leading cause of breast cancer-related mortality. The development of new treatments for metastatic breast cancer requires preclinical models that better summarize important clinical features of the disease, including metastasis. An important role in the improvement of breast cancer treatment methods has been played by *in vivo* studies, trials of potentially effective antitumor effects on a living organism, since the cell culture medium cannot completely repeat the complex multicellular and cellular-extracellular matrix interactions that are involved in the initiation and progression of breast cancer. Due to the complexity and heterogeneity of breast cancer, no single model repeats all aspects of this disease. Thus, an integrated and multi-system approach is currently the strongest way to model this disease.

Key words: breast cancer, modeling, metastases, *in vivo* studies, metastases.

Рак молочной железы остается одним из наиболее распространенных заболеваний среди женского населения. Согласно по статистике, рак молочной железы выявляется у каждой восьмой женщины.

Ранняя диагностика рака молочной железы может значительно улучшить прогноз и шансы на выживание, так как может способствовать своевременному клиническому лечению

пациентов. Дальнейшая точная классификация доброкачественных опухолей может предотвратить пациентов, проходящих ненужное лечение. Таким образом, правильная диагностика рака молочной железы и классификация больных на злокачественные или доброкачественные группы является предметом многих исследований [2].

Разработка новых химиотерапевтических препаратов и таргетной терапии дает реальную надежду на снижение смертности от этого заболевания.

Исследования *in vivo* сыграли значительную роль в совершенствовании методов лечения рака молочной железы, что является промежуточным этапом между системами *in vitro* и клиническими исследованиями. В настоящее время доступно большое количество моделей на животных, которые отражают различные типы и стадии заболевания, и какая из них использовать, зависит от конкретных исследовательских вопросов.

Существенная поддержка осведомленности о раке молочной железы и финансирование исследований помогли добиться успеха в диагностике и лечении рака молочной железы. Показатели выживаемости при раке молочной железы возросли, а число смертей, связанных с этим заболеванием, неуклонно снижается, главным образом благодаря таким факторам, как более раннее выявление, новый персонализированный подход к лечению и лучшее понимание болезни [2].

Метастазирование представляет собой многоступенчатый процесс, который требует успешного распространения опухолевых клеток из первичного участка, сосудистого входа и транзита в отдаленный участок, выхода (экстравазации) из сосудистой системы во вторичный участок и, наконец, посева и колонизации во вторичный орган. Важно отметить, что выполнение опухолевой клеткой только одной фазы метастатического каскада не обязательно предсказывает успешное выполнение метастазирования в целом. Таким образом, экспериментальные модели и интерпретация механизмов, полученных из этих моделей, необходимы для того, чтобы дифференцировать успешное метастазирование от неудачного и последующие события, диктующие способность опухолевой клетки уклоняться, распространяться и процветать в отдаленном месте от груди. Многоступенчатый характер метастазирования и гетерогенность, проявляемая при раке молочной железы, требуют дальнейшего использования и разработки лабораторных моделей для точного отражения этого сложного процесса с целью обнаружения терапевтических вмешательств.

Механизмы резистентности к терапии при раке молочной железы разнообразны среди подтипов рака молочной железы и механизм действия каждой терапии [4].

Существует два исторических примера, чтобы получить представление о роли экспериментальных исследований на животных в развитии онкологии.

Первый пример заключается в том, что в 1954 году в Соединенных Штатах был принят

законопроект, который предписывал Национальному институту онкологии разработать программу целенаправленного и эффективного поиска препаратов для химиотерапии. Говард Скиппер изучал искусственно вызванную лейкемию у мышей. В этой модели Шкипер впервые описал два важных наблюдения: Химиотерапия убивает определенный процент от общего количества клеток в любой момент, независимо от того, сколько их в организме. Итак, если вы возьмете мышь, у которой сто тысяч лейкозных клеток, и примените вещество, которое убивает девяносто девять процентов этих клеток за раз, то каждая новая методика будет убивать именно эту долю, и в результате после каждого раза таких клеток будет все меньше и меньше. При комбинировании противоопухолевые препараты действуют синергически, усиливая действие друг друга. С помощью нескольких препаратов и нескольких повторных циклов химиотерапии с небольшими интервалами между ними Скипперу удалось добиться полного излечения от лейкемии на своей мышинной модели.

Другим ярким примером использования животных моделей в онкологии является создание лекарств против Her 2. В 1982 году лаборатория Роберта Вайнберга выделила другой онкоген из опухоли крысы, называемой нейробластома.

Летом 1984 года группа исследователей, сотрудничавших с Вайнбергом, обнаружила человеческий гомолог neu. Исследователи назвали новый ген Her 2. Ген Вайнберга был обнаружен в академической лаборатории, а ее 2 - в фармацевтической компании Genintech, и это означало путь к разработке нового препарата.

Летом 1990 года были представлены полностью гуманизированные антитела к Her 2, готовые к клиническим испытаниям. Эти антитела, став потенциальным лекарственным средством, вскоре получили новое название герцептин.

Классическими объектами экспериментальной онкологии являются млекопитающие, в первую очередь мыши и крысы, которые хорошо адаптируются к условиям жизни в неволе и дают многочисленное потомство. Нет ни одной онтологической проблемы, которая не была бы исследована с использованием этих грызунов [4].

Генетически созданные мышинные модели (GEMM) позволяют достаточно точно моделировать спорадические человеческие опухоли за счет контролируемого изменения генома мышей, что обеспечивает развитие конкретной опухоли с определенными свойствами в заданной локализации. Так, создаются линии животных, которые целенаправленно лишены определенного гена, или, напротив, имеют встроенный дополнительный ген.

Первые трансгенные мыши были разработаны после того, как было показано, что клонированные гены могут быть интегрированы в геномы мышей воспроизводимым образом. Первоначально доминантные онкогены экспрессировались в GEMM, что приводит

к спонтанному образованию опухоли. Первая трансгенная мышь была названа «*onc mouse*» и выражала специфическую активированную *oncogene v-HRas* под контролем промотора, специфичного для молочных желез.

В начале 1990-х годов нокаут генов был усовершенствован, что позволило создание GEMM, в котором отсутствовали гены-супрессоры опухолей что также приводит к развитию опухоли.

На протяжении многих лет GEMM предоставила множество знаний как для фундаментальных исследований рака, так и для трансляционной онкологии. В этом блоге рассматриваются основные сильные и слабые стороны GEMM, а также основные применения в растущем числе моделей ввода-вывода.

Очевидной ключевой особенностью GEMM для использования в оценке иммунотерапии является их полностью компетентный мышиный иммунитет и комплексная мышинная строма. Еще одной полезной особенностью является то, как развиваются опухоли, возникающие спонтанно у мыши, а не вводимые в мышь.

Это означает, что рост опухоли имитирует первичный рост опухоли человека, сопровождающийся такими особенностями, как глубокое подавление иммунитета и уход от иммунного надзора. Поэтому GEMM может быть использован для опроса полного процесса прогрессирования рака и оценки того, где стимуляция иммунной системы может быть наиболее полезной.

Основное использование GEMM неразрывно связано с тем, как развиваются опухоли, и ограничениями платформы. Спонтанная природа опухолей позволяет модели быть идеальной для исследований механизма действия, но менее полезной для оценки эффективности. У каждой отдельной мыши болезнь будет прогрессировать с разной скоростью, и 100% пенетрантность не может быть достигнута. Существует также латентный период до развития опухоли, который может быть чрезвычайно длительным [5].

Ярким примером трансгенных мышей является линия мышей с повышенной экспрессией онкогена HER 2. У этих животных в возрасте от 2 месяцев появляются опухоли молочных желез (HER 2/*neu*-положительных).

Ограничения: несмотря на гистологическое и генетическое сходство со злокачественными новообразованиями у человека, для большинства генетически созданных мышинных моделей характерно асинхронное развитие опухолей в организме-хозяине. Такие модели, как правило, гетерогенны с точки зрения частоты развития опухолей, времени задержки в развитии опухолей и характеристик роста [4].

Моделирование рака молочной железы на иммунодефицитных мышях. Несмотря на неоспоримую значимость исследований, проведенных на клеточных культурах, результаты

экспериментов *in vitro* не всегда можно транслировать на живой организм, тем более человеческий. Многие биологически активные средства, которые при испытаниях *in vitro* позволяли надеяться на заметный лечебный эффект, по результатам весьма затратных дальнейших клинических испытаний оказываются неэффективными, что подчеркивает значимость выбора оптимальной экспериментальной модели заболевания у человека при исследованиях *in vivo*.

Несмотря на то что идеальная модель *in vivo*, которая точно повторяла бы клинические особенности онкозаболеваний человека, отсутствует, создание и изучение ксенографтов человеческих опухолей является одним из самых адекватных способов решения многих актуальных задач в современной экспериментальной онкологии.

Для получения этих моделей традиционно используют иммунодефицитных животных, таких как мыши SCID, NOD-SCID, NSG, Balb/c Nude, так как вследствие их иммунодефицитного статуса не происходит отторжения чужеродного биологического материала, тем самым обеспечивается успех процедуры ксенотрансплантации. Перечисленные линии мышей отличаются степенью выраженности дефектов иммунной системы. Таких животных получают не только путем близкородственного скрещивания особей с имеющейся спонтанной мутацией гена, обуславливающей иммунодефицитный статус, но и возможен вариант целенаправленного повреждение гена – создание «нокаутных мышей».

В многочисленных работах по созданию и использованию ксеногенных опухолевых моделей продемонстрированы примеры применения как гетеротопического варианта трансплантации опухолевого материала, так и ортотопического [2].

Химически индуцированные опухоли. По сравнению с трансплантированными моделями опухолей или генетически модифицированными моделями рака, химически индуцированные первичные злокачественные новообразования у экспериментальных животных могут имитировать прогресс клинического рака с ранней стадии. Рак, вызванный химическими канцерогенами, обычно развивается через три фазы, а именно инициацию, продвижение и прогрессирование. Исходя из разных механизмов, химические канцерогены можно разделить на генотоксические и негенотоксические, или полные и неполные, обычно с органоспецифическим свойством. Химические канцерогены могут быть классифицированы по их происхождению, такие как загрязнители окружающей среды, канцерогены, полученные из вареного мяса, соединения N-нитрозо, пищевые добавки, противоопухолевые агенты, природные вещества и синтетические канцерогены и т. д. Канцероген-индуцированные модели первичных раковых заболеваний могут использоваться для оценки диагностических / терапевтических эффектов препаратов-кандидатов, исследования биологических влиятельных факторов, изучения профилактических мер канцерогенности и

лучшего понимания молекулярных механизмов, участвующих в иницировании, продвижении и прогрессировании опухоли. Помимо трудоемкого процесса, основным недостатком химического канцерогенеза для трансляционных исследований является сложность оценки неинвазивной опухолевой нагрузки у мелких животных. Как и рак человека, опухоли возникают непредсказуемо также среди животных с точки зрения сроков, местоположения и количества поражений. Благодаря наличию магнитно-резонансной томографии (МРТ) с различными преимуществами, можно решить проблему с применением МРТ для неинвазивного обнаружения, диагностики и терапевтического мониторинга на тех в противном случае неконтролируемых животных моделях с первичным раком. Кроме того, можно предвидеть, что совместное использование химически индуцированных первичных моделей рака и методов молекулярной визуализации может помочь в разработке новых противоопухолевых диагностических и терапевтических средств [5].

Пациентоподобные модели. Новым инструментом для решения проблем геномики и гетерогенности опухолей, а также для переноса результатов трансляционных исследований в клиническую практику стали пациентоподобные модели или так называемые Patient-derived Xenograft (PDX). Их создают путем трансплантации фрагментов опухолевой ткани пациентов иммунодефицитным мышам; ксенотрансплантат, сформированный в первом поколении животных, может быть перенесен на следующие поколения мышей.

Предпосылкой для создания PDX стала проблема гетерогенности заболевания, характеризующаяся разнообразием на гистологическом и молекулярном уровнях, а также различия метастатического поведения и ответов на лечение. Помимо гетерогенности между опухолями в популяции пациентов, последние данные также продемонстрировали значительную внутриопухолевую гетерогенность. Эта неоднородность является существенным препятствием для принятия эффективных решений о тактике лечения и требует разработки персонализированных подходов к терапии, основанных на данных об уникальных особенностях опухоли [2].

Накопленные данные показали, что модели PDX превосходят традиционные модели ксенотрансплантатов клеточных линий, потому что они сохраняют больше сходства с опухолями, обнаруженными у реальных пациентов. Например, детальный цитогенетический анализ моделей PDX выявил сильную сохранность хромосомной архитектуры, наблюдаемой у пациентов. Кроме того, другие исследования показали сильную точность в гистологии, транскриптом, полиморфизм и копировать варианты номеров. В некоторых случаях определенная онкогенная амплификация генов может быть обнаружена в клеточных линиях на уровнях, которые на несколько раз выше, чем в слухах пациентов, артефакт, полученный из клеточной культуры, который может привести к чрезмерному

прогнозированию лекарственного ответа в клинике. С другой стороны, новые данные начали показывать, что модели PDX могут более точно отражать клинический ответ при лечении терапевтическими агентами в клинически значимых дозах.

Хотя модели PDX предоставляют захватывающую возможность для повышения прогностической ценности доклинических и трансляционных исследований и предлагают ряд преимуществ по сравнению с обычными моделями ксенотрансплантатов клеточных линий, как и любые другие доклинические модельные платформы, существует несколько ограничений, о которых необходимо знать. Во-первых, использование штаммов мышей-хозяев с серьезным ослабленным иммунитетом, особенно без ожирения диабетических тяжелых комбинированных иммунодефицитов гамма-мышей, обеспечивая при этом более высокую скорость приема и более последовательный рост ксенотрансплантированных опухолей человека, по своей сути недостаточно для моделирования иммунных реакций. Хотя компоненты стромы человека, включая иммунные клетки, первоначально присутствующие в биопсии опухоли, могут быть пересажены вместе с опухолевой тканью, они, как правило, не могут выжить после первого прохода и будут полностью потеряны при последующем расширении. Другие компоненты стромы, включая фибробласты и сосуды, быстро заменяются мышинными аналогами. Отсутствие функциональной иммунной системы ограничивает полезность этих моделей в исследованиях, где требуются иммунные реакции. Хорошо документировано и принято, что иммунная система является важной частью опухолевой стромы и значительно способствует инициации, прогрессированию, метастазированию и терапевтическому ответу опухоли. Введение мышей с частично или полностью гуманизированной иммунной системой может потенциально улучшить эту проблему, но значительные технические проблемы все еще существуют.

Во-вторых, хотя технические достижения постепенно улучшают прием опухоли, различные типы опухолей и различные подтипы в пределах одного и того же типа опухоли имеют разные показатели успеха. Это привело к несбалансированному представлению типов / подтипов опухолей, которое в большей степени определяется частотой взятия, а не частотой клинической заболеваемости. Хотя модели PDX могут избежать искусственного отбора в расширенной культуре на пластике, процесс отбора *in vivo* существует, как только опухоли имплантируются. Например, высокосортные, быстро размножающиеся опухоли, как правило, легче установить в качестве моделей PDX, чем низкосортные, медленно растущие, но прогрессирующие опухоли.

Кроме того, по сравнению с клеточными линиями, моделями PDX трудно манипулировать генетически. Большинство моделей PDX устанавливаются и проходят в виде фрагментов опухоли, а обычная трансфекция или трансдукция не эффективны для генетической

модификации опухолей или введения маркеров обнаружения. Поэтому опухоли PDX редко устанавливаются в качестве ортотопических моделей, если нет суррогатного биомаркера, который можно легко использовать для измерения опухолевой нагрузки неинвазивно [1].

Активно развивается направление, посвященное изучению опухолевого процесса у животных. Модели рака молочной железы *in vivo* доказали свою полезность во многих различных контекстах, и дальнейшая работа в этой области повысит клиническую значимость исследований, а также будет способствовать более глубокому пониманию природы заболевания, терапевтического ответа и механизмов развития резистентности.

В настоящее время доступно большое количество моделей, отражающих различные типы и стадии заболевания, однако каждая из них имеет свои преимущества и ограничения, которые необходимо учитывать при планировании исследования. Несмотря на то, что на данный момент не существует идеальной модели рака молочной железы человека, накопленные знания и стремительное развитие современных технологий позволяют надеяться на успешное изучение актуальных вопросов онкологии.

Список литературы:

1. Модели опухолей в экспериментальной онкологии // НМИЦ онкологии URL: <https://www.niioncologii.ru/highlights/index?id=661&ysclid=lcxfkrqz3q481613409> (дата обращения: 10.01.2023).
2. Building a Simple Machine Learning Model on Breast Cancer Data // Towardsdatascience URL: <https://towardsdatascience.com/building-a-simple-machine-learning-model-on-breast-cancer-data-eca4b3b99fa3> (дата обращения: 10.01.2023).
3. Genetically Engineered Mouse Models (GEMM) for I/O Studies // Crownbio URL: <https://blog.crownbio.com/gemm-immuno-oncology-models> (дата обращения: 10.01.2023).
4. Laboratory Models for Investigating Breast Cancer Therapy Resistance and Metastasis // .frontiers URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.645698/full> (дата обращения: 10.01.2023).
- 5 Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research // Qims URL: <https://qims.amegroups.com/article/view/7044/8821> (дата обращения: 10.01.2023).
6. XENOGRAFT MODELS OF HUMAN BREAST CANCER IN EXPERIMENTAL STUDIES // Scientific journal URL: <https://science-education.ru/en/article/view?id=29229&ysclid=lcxfdlgehr435264333> (дата обращения: 10.01.2023).