УДК: 615.036.8

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ В ОНКОГЕМАТОЛОГИИ КАК ИНСТРУМЕНТ ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ХИМИОПРЕПАРАТОВ: НАКОПЛЕННЫЙ ОПЫТ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

Алимов Тимур Рауфович
Шевченко Лариса Ивановна
Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр гематологии (Ташкент, Узбекистан)

Резюме. *Цель. Осветить основные этапы и методы доклинических исследований в экспериментальной онкогематологии, возможности использования экспериментальных моделей и перспективы развития. В статье кратко освещены различные варианты клеточных линий, применяемых для экспериментальных доклинических исследований in vitro онкогематологических патологий на примере ХМЛ. Также освещены основные варианты проведения исследований in vivo на млекопитающих (на мышах). Освещаются преимущества использования в доклинических исследования рыб Zebrafish Danio Rerio в целом в медико-биологических исследованиях и достижения использования данной модельной системы в области экспериментальной онкогематологии. Выводы. Таким образом, успешность и эффективность проводимых доклинических исследований зависит от возможности применения комплексного подхода в ходе проведения исследований на различных биологических объёктах с отбором наиболее оптимальных методик.*

Ключевые слова: *доклинические исследования, экспериментальная онкогематология, клеточные линии, in vitro, in vivo, мыши, Zebrafish Danio Rerio,*

EXPERIMENTAL MODELS IN ONCOHEMATOLOGY AS A TOOL FOR PRECLINICAL STUDIES OF CHEMOTHERAPY: ACCUMULATED EXPERIENCE AND DEVELOPMENT PROSPECTS (LITERATURE REVIEW)

Alimov Timur Raufovich,
Shevchenko Larisa Ivanovna
Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Hematology (Tashkent, Uzbekistan)

Summary. *Objective. To highlight the main stages and methods of preclinical research in experimental oncohematology, the possibilities of using experimental models and development prospects. The article briefly covers various variants of cell lines used for experimental preclinical studies in vitro of oncohematological pathologies using CML as an example. It also covers the main variants of conducting in vivo studies on mammals (on mice). The advantages of using Zebrafish Danio Rerio in preclinical studies in general in medical and biological research and the achievements of using this model system in the field of experimental oncohematology are covered conclusions. Conclusions. Thus, the success and effectiveness of preclinical studies depends on the possibility of using an integrated approach during studies on various biological objects with the selection of the most optimal methods.*

Keywords: *preclinical studies, experimental oncohematology, cell lines, in vitro, in vivo, mice, Zebrafish Danio Rerio.*

ОНКОГЕМАТОЛОГИЯДА ЭКСПЕРИМЕНТАЛ МОДЕЛЛАР КИМЁТЕРАПИЯНИНГ КЛИНИКАДАН ОЛДИНГИ ТАДҚИҚОТЛАР УЧУН ВОСИТА СИФАТИДА: ТЎПЛАНГАН ТАЖРИБА ВА РИВОЖЛАНИШ ИСТИҚБОЛЛАРИ (ADABIYOT SHARHI)

Алимов Тимур Рауфович
Шевченко Лариса Ивановна
Республика ихтисослаштирилган гематология илмий-амалий тиббиёт маркази (Тошкент, Ўзбекистон)

Хулоса. *Мақсад. Экспериментал онкогематологияда клиникагача тадқиқотнинг асосий босқичлари ва усулларини, экспериментал моделлардан фойдаланиш имкониятларини ва ривожланиш истиқболларини ёритиб бериш. Мақолада мисол сифатида СМЛ ёрдамида онкогематологик патологияларни ин витро экспериментал преклиник тадқиқотлар учун ишлатиладиган ҳужайра линияларининг турли хил вариантлари қисқача ёритилган. Шунингдек, у сутемизувчилар (сичқонлар) устида ин виво тадқиқотлар ўтказишнинг асосий вариантларини қамраб олади. Зебрафиш Данио Рерио-ни клиникадан олдинги тадқиқотларда умуман тиббий ва биологик тадқиқотларда қўллашнинг афзалликлари ва экспериментал онкогематология соҳасида ушбу модел тизимидан фойдаланишнинг*

ютуқлари ёритилган.хулосалар. Хулоса. Шундай қилиб, преклиник тадқиқотларнинг муваффақияти ва самарадорлиги енг мақбул усулларни танлаган ҳолда турли хил биологик объектларни ўрганишда интеграциялашган ёндашувдан фойдаланиш имкониятига боғлиқ.

Калит сўзлар: *преклиник тадқиқотлар, експериментал онкогематология, ҳужайра линиялари, in vitro, in vivo, сичқонлар, Zebrafish Danio Rerio.*

Основные достижения в понимании патофизиологии лейкозов привели к резкому увеличению доступности новых соединений для клинических испытаний. Однако, поскольку количество новых препаратов намного превышает количество клинических испытаний, которые могут быть проведены из-за наличия подходящих пациентов, существует острая необходимость в использовании надежных доклинических моделей для проведения доклинических испытаний новых препаратов и методов лечения онкогематологических патологий. Наиболее широко используемыми в биомедицинской практике доклиническими моделями для воспроизведения экспериментальных лейкозов являются ксенотрансплантаты человеческих опухолей, установленные у иммунодефицитных мышей, и генетически модифицированные штаммы мышей. В этом обзоре суммируются накопленные опыт и последние достижения соображения по использованию онкогематологических моделей.

Цель статьи. Осветить основные этапы и методы доклинических исследований в экспериментальной онкогематологии, возможности использование экспериментальных моделей и перспективы развития.

Обязательными этапами проведения доклинических исследований являются модели in vitro и in vivo. Для эффективного переноса результатов доклинических исследований на пациентов и их адекватной оценки крайне важно иметь эффективные доклинические модели, позволяющие прогнозировать эффективность испытуемых препаратов в клинических условиях.

На первом этапе исследований на моделях in vitro, как правило, используют иммортализированные линии гемопоэтических клеток [11]. Так на примере ХМЛ хотелось бы осветить текущую ситуацию в экспериментальной онкогематологии. В частности для оценки эффективности препаратов применяемых при лечении ХМЛ используют иммортализированные линии гемопоэтических клеток имеющих Ph-хромосому.

Легкость, с которой можно манипулировать клеточными линиями, также позволяет использовать их различными способами, включая скрининги РНК-интерференции по всему геному для идентификации генов, устойчивых к ИТК, и анализы генов-репортеров для предоставления дополнительной информации относительно специфичности задействованных сигнальных путей [11].

Из-за того, что зачастую данные иммортализированные клеточные линии получают из клеток, выделенных от пациентов с раком молочной железы (РМЖ), в них, в дополнение к экспрессии онкогена BCR-ABL, могут присутствовать дополнительные мутации [1]. Притом, что культивирование в различных исследовательских группах в различных лабораториях может привести к появлению нескольких генетически отличных друг от друга культур. Результаты, полученные в данных культурах, не всегда можно будет адекватно сопоставить с реакциями полученными in vivo. Однако, тем не менее работы на клеточных культурах дают ценные результаты на ранней стадии для формирования основы последующих доклинических исследований [2].

Необходимость проведения доклинических испытаний новых поколений препаратов при хроническом миелолейкозе (ХМЛ), в частности препаратов ИТК – несомненна.

Одними из наиболее распространённых объёктов для исследования используемых в доклинических исследованиях на животных (in vivo) являются мыши [12].

Другим способом доклинического экспериментального моделирования ХМЛ in vitro. Использование первичных образцов, полученных от пациентов с ХМЛ, объединяют значимость вариабельной биологии пациента с анализами in vitro. Из-за того, что клетки, полученные от пациента с ХМЛ, не могут быть обработаны в той же степени, что и иммортализированные клеточные линии,

Невозможность проведения столь же тщательной обработки биоматериала, полученного от пациента с ХМЛ, что и клеток иммортализированных клеточных линий накладывает определенные ограничения на проводимые на данном типе культур исследованиях. Несмотря на это, известно значительное число доступных подходов, которые могут предоставить широкий спектр данных. Так, к дополнению проточной цитофлуорометрии, вестерн-блоттингу, ПЦР и др. может быть проведен анализ колониеобразующих клеток и исследование на инициирующих культуру долгоживущих клетках «long-term co-culture». Также в последнее время получили широкое распространение методики позволяющие проводить исследования на ограниченном по объёму биоматериала, вплоть до проведения исследований на изолированных единичных клетках. Все эти достижения открывают широкие перспективы для понимания регеулируемых сетей в лечении заболеваний и испытаний лекарственных препаратов.

На рисунке 1 представлена классификация для оценки клеточных культур гемопоэтических клеток (рисунок 1).

Следующей ступенью доклинических исследований является исследование на **моделях in vivo.** С одной стороны модели in vivo являются необходимым условием для доклинического испытания препаратов в онкогематологии. С другой стороны основное преимущество данного типа моделей – более релевантная микросреда и возможность воспроизводить взаимодействие между различными типами клеток в более физиологических условиях. Как правило, в качестве лабораторных животных используют – мышей (рис 2). В качестве агентов способных индуцировать хронический миелолейкоз используют различные варианты, представленные на рисунке 2.

Модель ретровирусной трансдукции/трансплантации.

Модель мышиного ретровируса включает инфицирование ретровирусом кодирующим BCR-ABL обработанных 5-фторурацилом мышиных костномозговых клеток, с последующей трансплантацией трансдуцированных клеток облученным сингенным реципиентам (например подопытным мышам) [6]. У мышей-реципиентов после транплантации развиваются онкогематологические заболевания, в том числе и миелопролиферативные заболевания аналогичное человеческому ХМЛ и/или ХМПЗ. Как правило у мышей развивалось более одного типа онкогематологического и/или онкологического заболевания, что зависело от того как проходило кондиционирование костного мозга перед трансплантацией мутантных клеток экспрессирующих BCR-ABL и дополнительные мутации. В настоящее время разработаны модифицированные усовершенствованные ретровирусные конструкции, приводящие в 100% развитию лейкоза (ХМЛ) в течение 2-4 недель после трнаспланта-ции. Развивается экспериментальный ХМЛ-подобное заболевание более агрессивно, чем течение типичной формы ХМЛ в клинике, что имеет определенные преимущества в экспериментальных условиях, поскольку позволяет относительно быстро получить терапевтический ответ или проявление побочных действий на применение лекарственных препаратов и оценить эффективность их действия [5].



Рис. 1. Оценка культур гемопоэтических стволовых клеток

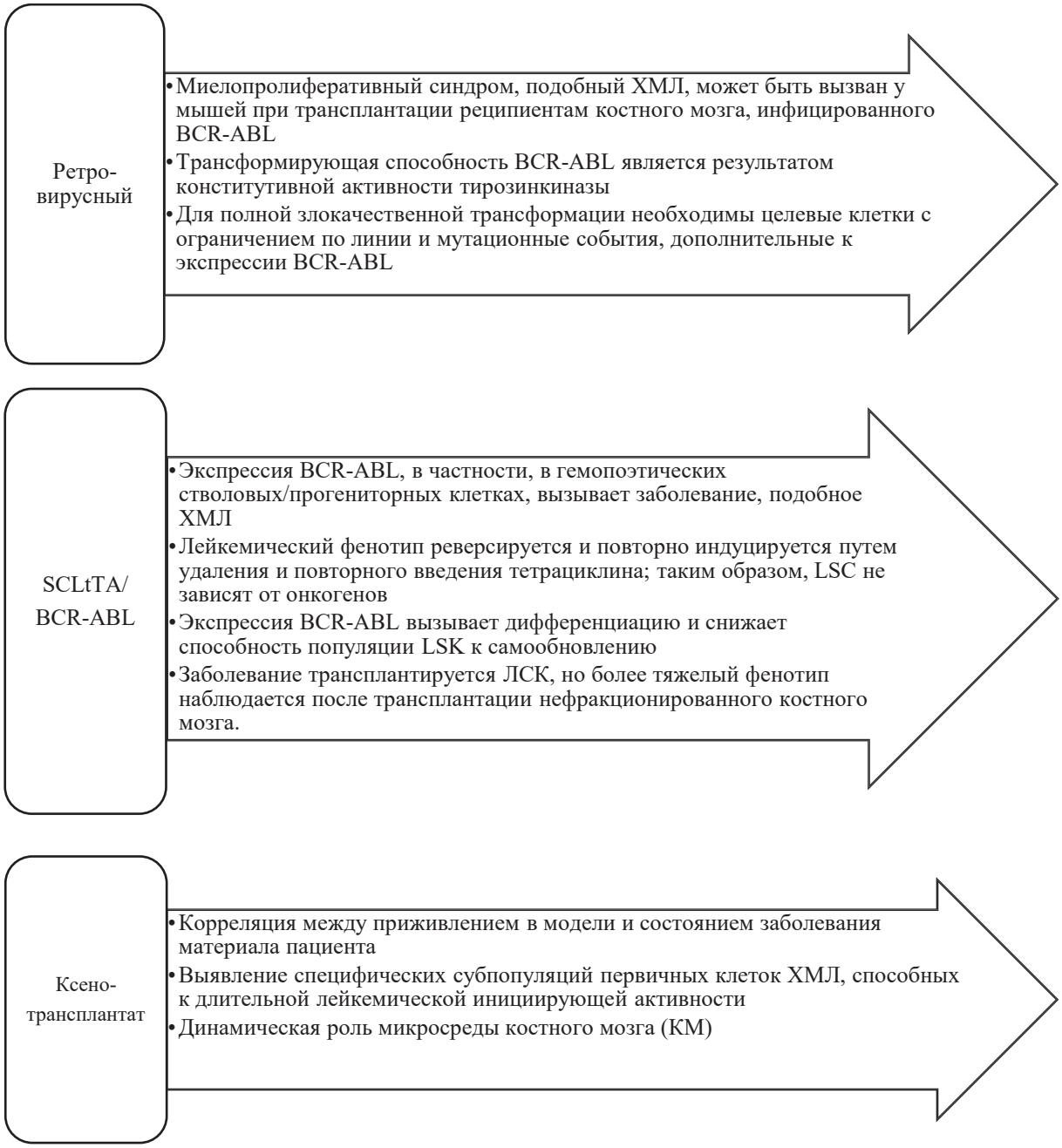


Рис. 2. Основные открытия, сделанные на моделях мышей с ХМЛ, и примеры некоторых основных результатов, полученных в результате использования трех наиболее часто используемых моделей мышей с ХМЛ.

Примечание: *БК = бластный криз; КМ = костный мозг; LSC Lin – Sca-1 + c-Kit +*

Другим способом воспроизведения онкогематологической патологии является **трансгенная модель SCLtTA/BCR-ABL.**

При моделировании лейкоза у трансгенных мышей контроль экспрессии BCR-ABL осуществляется тетрациклин-контролируемым трансактиватором (tTA) под контролем 3'-энхансера гена лейкемии стволовых клеток мышей (SCL) [4]. Уровень экспрессии BCR-ABL p210 в данном случае зависит от содержания тетрациклина в питьевой воде. У мышей развивается ХМЛ-подобное заболевание, сопровождаемое нейтрофилией и инфильтрацией патологическими клетками миелоидного ряда внутренних органов (печень, легкие, лимфоузлы и др.). Сроки выживаемости при использовании этой модели составляют 4-10 недель. По сравнению с ретровирусной моделью прогрессирование ХМЛ-подобной патологии при использовании данной системы имеет более естественный характер.

Модель ксенотрансплантации.

Еще одним способом воспроизведения лейкозов, в частности ХМЛ, в эксперименте является метод приживления иммунологически ослабленным мышам ксенотрансплантанта. Для воспроизведения данной модели подходит ряд различных штаммов мышей обладающих иммунодефицитным статусом, в том числе и мышей NOD Cg-Prkdc ^{scid} /IL2rg ^{tm1Wjl} /SzJ (NSG) и NOD.Cg-Prkdc ^{scid} Il2rg ^{tm1Sug} /JicTac (NOG). Также для исследователей становятся доступными мыши альтернативных штаммов, которые открывают новые возможности исследователям в области экспериментального воспроизведения лейкозов (Н-р ХМЛ).

В ходе проведения исследований было выявлено, что степень приживления ксенотрансплантанта зависела от фазы ХМЛ на который был произведен забор биоматериала.

Объекты доклинических исследований в онкогематологии

Традиционно объектом для проведения доклинических исследований in vivo при воспроизведении онкогематологической патологии или исследований на токсичность исследуемых препаратов являются определенные штаммы лабораторных мышей. На примере ХЛЛ на рисунке 3 приводятся ряд вариантов патогенетических механизмов индукции и развития лейкоза на мышиных моделях [8, 10].

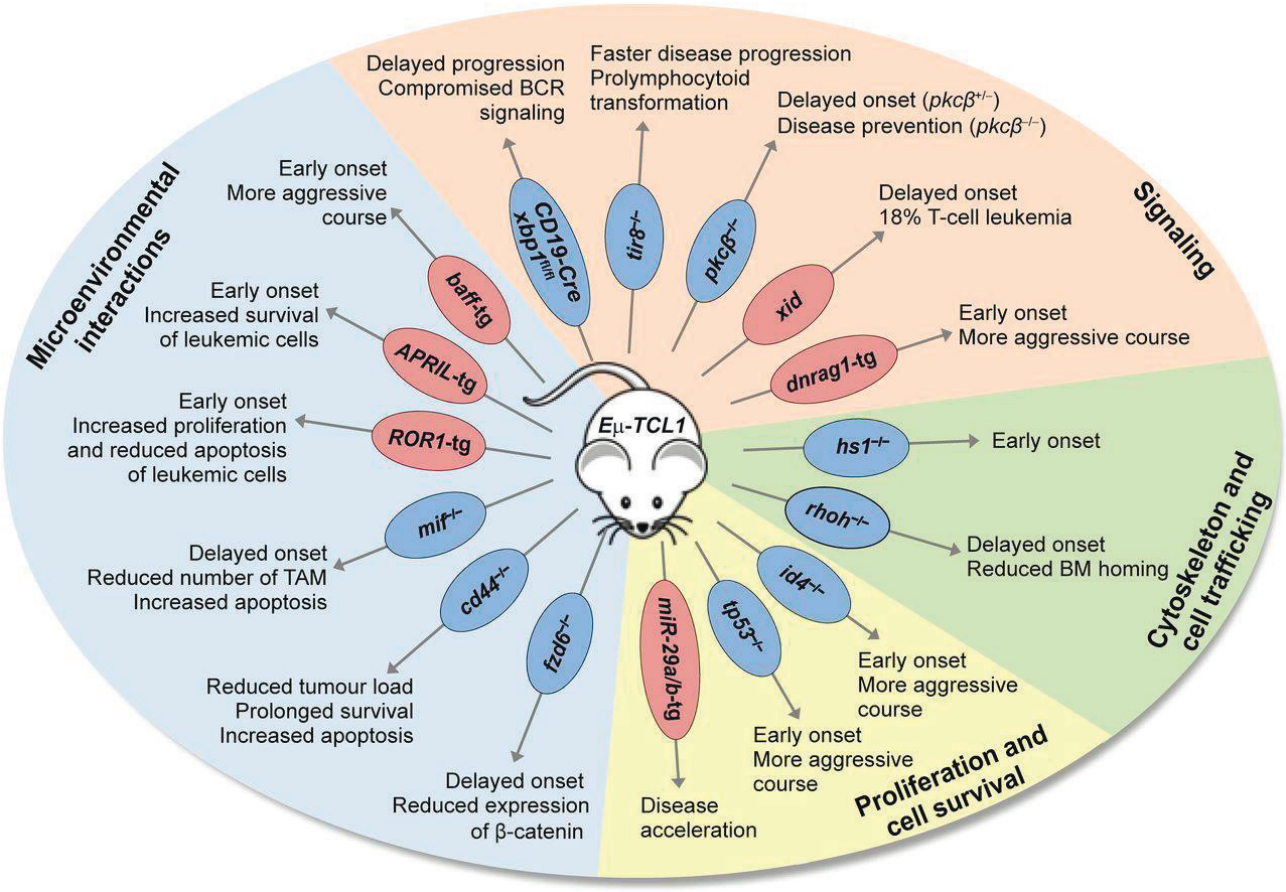


Рис. 3. Патогенетические механизмы ХЛЛ на модели лейкемии, вызванной TCL1 [8]

В то же время имеются и другие альтернативные объекты исследования. В последнее время для воспроизведения онкогематологической патологи в зарубежных научных центрах все чаще используют рыб Danio Rerio Zebrafish (рис. 1). Модели лейкозов, воспроизводимые у Danio Rerio, являются уникальной платформой для проведения доклинических исследований лекарственных препаратов на основе фенотипа (рис. 4, 5).

Использование Danio-Rerio не только доказывает свою эффективность, но и позволяет сократить число млекопитающих задействованных в экспериментальных исследованиях. В настоящее время имеются высокопроизводительные стандартизированные системы для содержания (рис 5), визуализации и оценки состояния Danio-Rerio, позволяющие адекватно и объективно оценить влияние исследуемых препаратов на биологический объект. Широкий спектр возможностей проведения различных исследований с использованием Danio Rerio представлен на рисунке 4 [9]

Использование наряду с традиционными методами in vivo на млекопитающих (на мышах)

исследований на Danio-Rerio может позволить более объективно оценивать состояние препаратов, поможет избежать ошибок, связанных с оценкой реакции только одного вида организма, и будет способствовать развитию сравнительных межвидовых исследований для выявления фундаментальных молекулярных организмов развития и лечения онкогематологической патологии.



Рис. 4. Возможности использования Zebrafish Danio Rerio в медико-биологических исследованиях

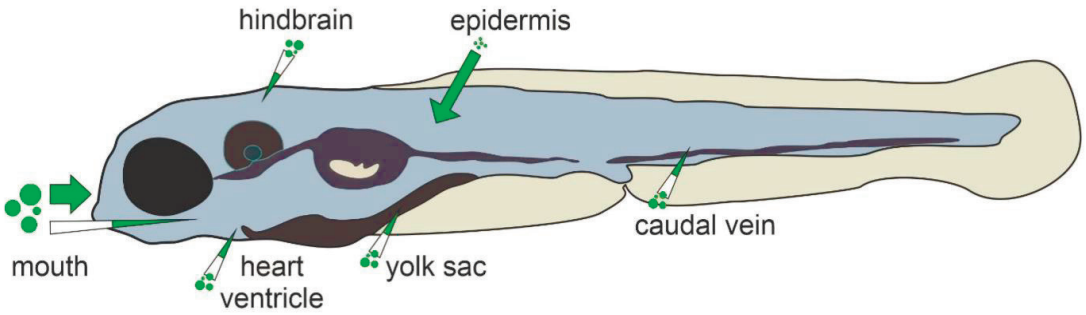


Рис. 5. Возможные пути введения исследуемых соединений на личиночных формах Danio-Rerio.
Примечание: *Пути поглощения, которые преобладают при экспозиции путем погружения, обозначены стрелками, местами для микроинъекции соединений инъекционными иглами [1].*

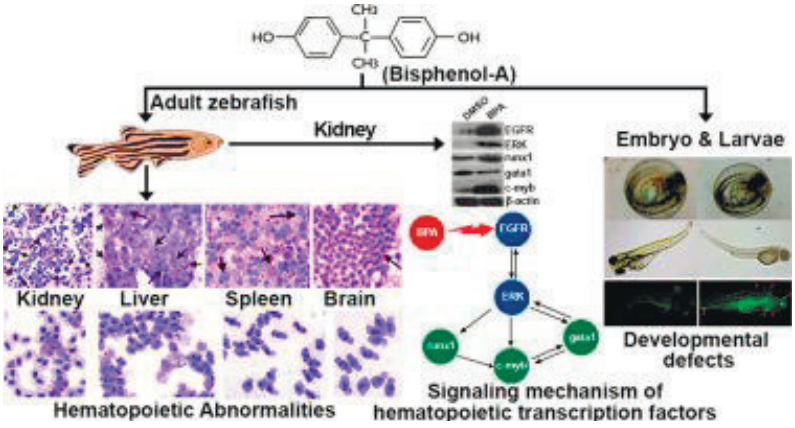


Рис. 6. Доклиническое исследование с использованием Danio Rerio на примере изучения токсичности действия бисфенола [2]

В качестве примера можно привести одно из исследований Ridges S. et al. (2012) в ходе которого с помощью генетически-модифицированных Т-клеточных Danio Rerio была разработана система для обнаружения целевых противолейкозных агентов [7]. Используя сходство между нормальными и злокачественными Т-лимфобластами исследователи произвели скрининг библиотеки малых молекул на выявление активности против незрелых Т-клеток. Так, например, в ходе данного исследования был проведен скрининг 26 400 соединений, в результате которого был идентифицирован Ленальдекар (LDK), способный устранять незрелые Т-клетки, при этом, не затрагивая клеточный цикл других типов клеток. Данная работа демонстрирует перспективность доклинических исследований с использованием Danio Rerio и на других видах онкогематологических патологий [7].

Вывод. Таким образом, успешность и эффективность проводимых доклинических исследований зависит от возможности применения комплексного подхода в ходе проведения исследований на различных биологических объёктах с отбором наиболее оптимальных методик.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дубовская В. И. Компьютерный поиск веществ, обладающих цитотоксичностью по отношению к клеточным линиям рака молочной железы: дис. – Науч.-исслед. ин-т биомед. химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 2016.

2. Arranz L. The hematology of tomorrow is here—preclinical models are not: cell therapy for hematological malignancies //Cancers. – 2022. – Т. 14. – №. 3. – С. 580.

3. Bauer B., Mally A., Liedtke D. Zebrafish embryos and larvae as alternative animal models for toxicity testing //International journal of molecular sciences. – 2021. – Т. 22. – №. 24. – С. 13417.

4. Koschmieder S. et al. Inducible chronic phase of myeloid leukemia with expansion of hematopoietic stem cells in a transgenic model of BCR-ABL leukemogenesis //Blood. – 2005. – Т. 105. – №. 1. – С. 324-334.

5. Liu H. et al. Improved retroviral transduction of hematopoietic progenitors by combining methods to enhance virus–cell interaction //Leukemia. – 2000. – Т. 14. – №. 2. – С. 307-311.

6. Nguyen T. K., Morse S. J., Fleischman A. G. Transduction-transplantation mouse model of myeloproliferative neoplasm //Journal of visualized experiments: JoVE. – 2016. – №. 118. – С. 54624.

7. Ridges S. et al. Zebrafish screen identifies novel compound with selective toxicity against leukemia //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2012. – Т. 119. – №. 24. – С. 5621-5631.

8. Simonetti G. et al. Mouse models in the study of chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and therapy //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2014. – Т. 124. – №. 7. – С. 1010-1019.

9. Sundarraj S. et al. Bisphenol-A alters hematopoiesis through EGFR/ERK signaling to induce myeloblastic condition in zebrafish model //Science of the Total Environment. – 2021. – Т. 787. – С. 147530.

10. Vick B. et al. An advanced preclinical mouse model for acute myeloid leukemia using patients' cells of various genetic subgroups and in vivo bioluminescence imaging //PloS one. – 2015. – Т. 10. – №. 3. – С. e0120925.

11. Voloshin N. et al. Practical use of immortalized cells in medicine: current advances and future perspectives //International journal of molecular sciences. – 2023. – Т. 24. – №. 16. – С. 12716.

12. Zitvogel L. et al. Mouse models in oncoimmunology //Nature Reviews Cancer. – 2016. – Т. 16. – №. 12. – С. 759-773. [9b]