

Разработка ортотопической модели глиобластомы мыши с использованием клеточной линии GLi-261

А. А. Овсепян*, А. А. Борзов, Е. И. Каторкина, Е. О. Анисимова, М. В. Лыков

Общество с ограниченной ответственностью «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ»,
ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район,
Владимирская область, 601125, Российская Федерация

Глиобластома — наиболее часто встречающийся и наиболее агрессивный тип опухолей головного мозга с почти 100 % смертностью пациентов в течение 5 лет. Для поиска новых эффективных подходов к лечению этого заболевания требуется разработка адекватных экспериментальных моделей. **Цель работы:** отработка и внедрение в практику ортотопической модели глиобластомы мышей. **Материалы и методы:** клетки глиомы мыши GLi-261 ортотопически, с использованием стереотаксического оборудования, инокулировали в область *Putamen* головного мозга мышей линии C57Bl/6. Динамика развития опухоли была исследована с помощью высокопольного магнитно-резонансного томографа Preclinical MRI System 7.0T/17cm (Flexiscan). В качестве «положительного» контроля при лечении экспериментальной глиобластомы использовали Темцитал® (темозоломид). Оценку неврологического статуса животных при протекании опухолевого процесса оценивали по результатам тестов. **Результаты:** отработана ортотопическая модель глиобластомы мыши, разработанная на основе клеточной линии GLi-261, с использованием стереотаксического оборудования для точной инокуляции опухолевых клеток, магнитно-резонансной томографии для неинвазивного определения объема и динамики развития опухоли, специальных тестов для определения неврологического статуса биологических тест-систем. С использованием данной модели показана эффективность темозоломида («золотой стандарт» лечения глиобластомы). **Выводы:** данная модель внедрена в практику ООО «МБЦ «ГЕНЕРИУМ» и может быть использована в качестве *in vivo* тест-системы для доклинической оценки эффективности разрабатываемых новых противоопухолевых препаратов, а также схем лечения онкологических заболеваний головного мозга при комплексной терапии. **Ключевые слова:** глиобластома; стереотаксис; магнитно-резонансная томография; темозоломид; ортотопическая модель

Для цитирования: Овсепян АА, Борзов АА, Каторкина ЕИ, Анисимова ЕО, Лыков МВ. Разработка ортотопической модели глиобластомы мыши с использованием клеточной линии GLi-261. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(4):242–250. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-242-250>
Контактное лицо: Овсепян Армен Александрович; ovsepyan@ibcgenerium.ru

Development of a Mouse Glioblastoma Orthotopic Model Using the GLi-261 Cell Line

A. A. Ovsepyan*, A. A. Borzov, E. I. Katorkina, E. O. Anisimova, M. V. Lykov

International Biotechnology Center «GENERIUM»,
14 Vladimirskaia St., Volginsky town, Petushinsky District,
Vladimir Oblast 601125, Russian Federation

Glioblastoma is the most common and most aggressive type of brain tumor, with an almost 100 % mortality rate over 5 years. The search for new effective approaches to the treatment of this disease requires the development of adequate experimental models. **Objective:** to develop and put into practice an orthotopic model of mouse glioblastoma. **Materials and methods:** GLi-261 mouse glioma cells were orthotopically inoculated into the putamen of C57Bl/6 mice brain. Tumor dynamics was investigated by Preclinical MRI System 7.0T/17cm (Flexiscan) high-field magnetic resonance imager (MR Solutions, UK). Temcitall® (temozolomide) was used as a positive control in the treatment of experimental glioblastoma. The neurological status of animals in the course of tumour development was assessed by specific tests. **Results:** a GLi-261 cell-based mouse glioblastoma orthotopic model was developed using stereotactic equipment for accurate inoculation of tumour cells, magnetic resonance imaging for non-invasive determination of tumour volume and dynamics, and special tests for determination of the neurological status of the biological test systems. This model was used to demonstrate the effectiveness of temozolomide (the «gold standard» for glioblastoma treatment). **Conclusions:** this model has been introduced into practice at the IBC Generium, LLC, and can be used as an *in vivo* test system for preclinical evaluation of efficacy of new antitumour drugs being developed, as well as brain cancer treatment regimens using combination therapy.

Key words: glioblastoma; stereotaxy; magnetic resonance imaging; temozolomide; orthotopic model

For citation: Ovsepyan AA, Borzov AA, Katorkina EI, Anisimova EO, Lykov MV. Development of a mouse glioblastoma orthotopic model using the GLi-261 cell line. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(4):242–250 <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-242-250>

***Corresponding author:** Armen A. Ovsepyan; ovsepyan@ibcgenerium.ru

По данным Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer) при участии Всемирной организации здравоохранения¹, заболеваемость первичными опухолями головного мозга (включая менингиомы) составляет 6–19 случаев на 100 тысяч мужского и 4–18 случаев на 100 тысяч женского населения.

Согласно официальным данным², заболеваемость первичными опухолями центральной нервной системы в Российской Федерации составляет в среднем 4,8 случая на 100 тысяч населения. В 2017 г. общая заболеваемость в России по данной нозологии составила 8844 случая, в том числе 668 — в возрасте до 19 лет. Нейроэпителиальные опухоли составляют до 50 % всех новообразований головного мозга. Глиомы составляют более 3/4 (77 %) всех нейроэпителиальных опухолей.

Прогноз излечения и выживаемости при первичных опухолях головного мозга (в онкологии принято оценивать пятилетнюю выживаемость) напрямую зависит от возраста пациента, его общего состояния, типа раковых клеток, а также ряда других факторов. Статистика выживаемости в течение пяти лет варьирует от 66 % для молодых (от новорожденности до 19 лет) и до 5 % для пожилых людей (75 лет и старше)³. Прогноз менее благоприятный при мультиформной глиобластоме: в течение пяти лет выживает 13 % пациентов в возрасте 20–44 лет и 1 % пациентов в возрасте 55–64 лет.

Большинство существующих в настоящее время экспериментальных моделей ориентированы на использование клеток глиобластомы человека и иммунодефицитных мышей. Данный подход не позволяет с точностью воспроизвести патологические процессы из-за отсутствия воздействия иммунной системы макроорганизма на клеточное микроокружение опухоли [1].

Таким образом, поиск эффективных средств лечения глиом и глиобластом человека является актуальной проблемой как в России, так и во всем мире. Одной из задач, которая стоит перед исследователями для решения данной проблемы, является разработка релевантных экспериментальных моделей для их использования в ходе доклинических исследований.

Одним из этапов разработки лекарственных средств является доказательство их эффективности на экспериментальных моделях. Одним из направлений деятельности ООО «МБЦ «ГЕНЕРИУМ» является разработка противоопухолевых лекарственных препаратов, включая доклиническую оценку их эффективности и безопасности.

Цель работы — отработка и внедрение в практику ортотопической модели глиобластомы мышей.

Задачи исследования:

1. Разработать ортотопическую модель глиобластомы мышей, включая отработку:
 - хирургического подхода для инокуляции опухолевых клеток с использованием стереотаксического оборудования;
 - методов оценки клинического состояния биологических тест-систем (БТС);
 - метода прижизненной оценки динамики роста опухоли с использованием метода магнитно-резонансной томографии (МРТ).
2. Исследовать динамику роста опухоли после инокуляции клеток GLi-261 (Murine glioma 261) в различных дозах.
3. Оценить эффективность «положительного» контроля (терапия темозоломидом) для последующего изучения эффективности новых противоопухолевых препаратов.

4. Разработать и апробировать метод комплексной оценки глубины и тяжести протекания опухолевого процесса (МРТ-исследование, клинический осмотр, медиана выживаемости).

Материалы и методы

Культура клеток

Для моделирования глиобластомы была использована культура клеток Murine glioma 261 (Gli-261), полученная из National Institutes of Health (NIH), США. В исследованиях указанные клетки использовали в концентрациях $1,67 \cdot 10^6$, $8,33 \cdot 10^6$ и $5,0 \cdot 10^7$ клеток/мл (соответственно $5,0 \cdot 10^2$, $1,5 \cdot 10^3$ и $5,0 \cdot 10^3$ клеток/БТС). Объем инокулируемой клеточной суспензии — 3 мкл.

Животные

В качестве БТС в эксперименте использовали мышей линии C57Bl/6 SPF-категории (specified pathogen free), самки в возрасте 10–12 недель (получены из НПП «Питомник лабораторных животных» Филиала ИБХ РАН, г. Пушкино). Содержание и уход за БТС проводили в соответствии с нормами и правилами, указанными в «Политике работы с животными ООО «МБЦ «ГЕНЕРИУМ» и Руководстве по содержанию и использованию лабораторных животных⁴. В каждой группе было использовано по 10 БТС. Исследование одобрено на заседании Комиссии по биоэтике ООО «МБЦ «ГЕНЕРИУМ» (протокол № 41 от 20.10.2017).

Терапия

В качестве «положительного» контроля при лечении экспериментальной глиобластомы у мышей использовали Темцитал® (темозоломид) (Monte Verde S.A., Аргентина), вводя его в дозе 60 мг/кг перорально со вторых суток после ортотопической трансплантации клеток глиобластомы по схеме 5+2+2 введения с трехсуточными интервалами (2–6; 10–11; 15–16 сут) [2].

Ортотопическая трансплантация клеток глиобластомы

При подготовке БТС к работе для общей анестезии использовали инъекционный золетил-ксилазиновый наркоз (7–9 мкл/г живой массы БТС), что соответствует 50–60 мг/кг по золетилу (ВИРБАК, Франция) и 20–25 мг/кг по ксилазину (Bioveta a.s. Ivanovice na Hame, Czech Republic). Пред- и послеоперационную анальгезию проводили с помощью кетопрофена путем подкожной инъекции в дозе 2–5 мг/кг.

После наступления хирургического наркоза, используя ушные фиксаторы и фиксатор челюсти, закрепляли голову мыши в адаптере для мышей (Stoelting Co., США) в горизонтальном положении таким образом, чтобы исключить возможные смещения при операции и подготовке операционного поля (рис. 1).

Производили кожный разрез стерильным скальпелем от уровня глаз вдоль сагиттального шва черепа в сторону затылка длиной 15 мм таким образом, чтобы иметь свободный доступ к брегме.

С помощью скальпеля удаляли надкостницу с предполагаемого места трепанации. Стерильными ушными палочками высушивали операционную рану и обрабатывали черепную кость раствором перекиси водорода (3 %) для обеззараживания места трепанации и визуализации брегмы.

¹ Информационный портал об опухолях мозга. http://oncobrain.ru/brain_tumors/statistics_disease_brain_tumors.html

² Каприн АД, Старинский ВВ, Петрова ГВ, ред. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2018.

³ Информационный портал об опухолях мозга. http://oncobrain.ru/brain_tumors/statistics_disease_brain_tumors.html

⁴ Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington D.C.: The National Academies Press; 2011.

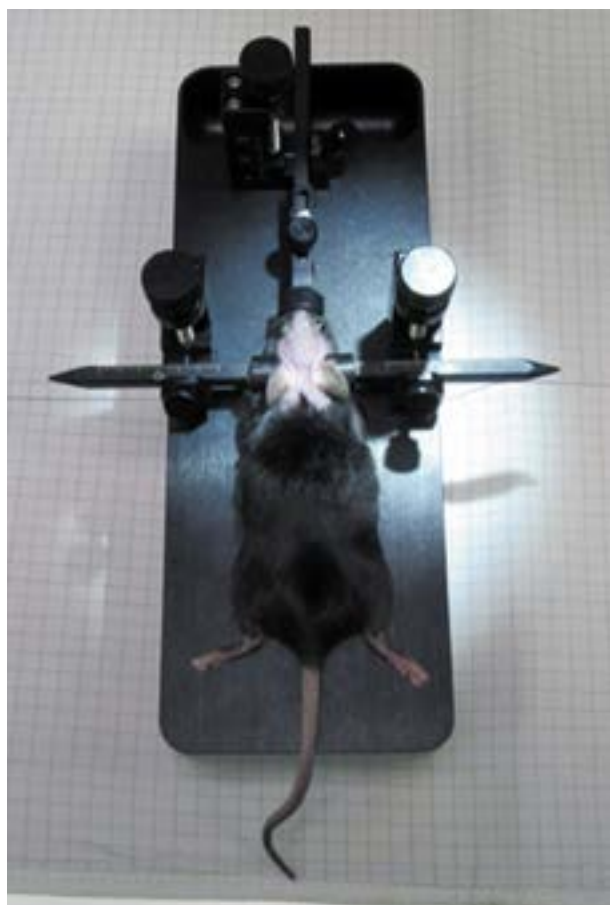


Рис. 1. Биологическая тест-система с подготовленным операционным полем, зафиксированная в адаптере.

Fig. 1. A biological test system with a prepared surgical field, fixed in the adapter.



Рис. 2. Визуализация брегмы.

Fig. 2. Bregma visualisation.

С помощью стереотаксиса (Stoelting Co., США) выставляли кончик иглы шприца (Hamilton, Швейцария) на брегму (точка «0») (рис. 2), передвигали вправо. В этой точке ($X = 0$, $Y = 2,3$) другой иглой проделывали трепанационное отверстие, применяя легкое надавливание, совмещенное с круговыми движениями.

После осуществления трепанации с помощью стереотаксиса вводили инъекционную иглу шприца на требуемую глубину (рис. 3).

Место инъекции подбирали из соображений наличия минимального количества жизненно важных центров и исключения возможности попадания в один из желудочков мозга. Инокуляцию проводили в область *Putamen* (лат.).

После введения клеток иглу оставляли в месте инъекции на 2 мин для сбалансирования внутричерепного давления и уменьшения дальнейшего вытекания клеток вместе с черепно-мозговой жидкостью. Далее иглу медленно вынимали из головного мозга. Высушивали рабочую поверхность стерильной фильтровальной бумагой. Трепанационное отверстие «пломбировали» костным воском Bone Wax (Ethicon, США). Кожную рану заклеивали тканевым клеем Dermabond (Ethicon, США).

После завершения операции БТС переносили в блок подогрева TAILHEATB (BioracSystems Inc., США) с принудительной подачей кислорода (при помощи медицинского кислородного концентратора NewLife (AirSep, США)) до выхода животного из наркоза (рис. 4).

Оценка состояния БТС

В течение эксперимента состояние БТС оценивали с помощью специальных тестов, представленных в таблице 1 [3–7]. В начале развития опухолевого процесса клинический осмотр проводили 2 раза в неделю, затем ежедневно.

1. Парапарез (Tail suspension test) — мышь подвешивали за хвост и наблюдали за синхронностью движения задних конечностей [4].

2. Гемипарез (Neurological deficits) — мышь поднимали с помощью пинцета за хвост и следили за поворотами мыши



Рис. 3. Инокуляция опухолевых клеток.

Fig. 3. Inoculation of tumour cells.



Рис. 4. Оборудование для послеоперационных мероприятий (пояснения в тексте).
Fig. 4. Equipment for postoperative procedures (explanations are provided in the text).

в разные стороны, а также за ее движением по кругу во время теста «Походка» [5].

3. Ходжение по краю (Ledge test) — мышь ставили на край клетки и следили за ее движением по краю и спуском в клетку [6].

4. Походка (Gait test) — мышь устанавливали на горизонтальную поверхность и следили за ее передвижениями [7].

5. Висячий тест на 4 лапах (Four limb hanging test) — мышь прицепляли 4 конечностями за решетку клетки и переворачивали вниз головой, следили за временем удержания мыши на решетке [7].

Комплексную оценку неврологического статуса (КОНС) проводили по балльной системе с учетом вышеописанных параметров. Каждый параметр оценивали по 3-балльной шкале, где 0 — отклонения параметра отсутствуют, 3 — нарушения по данному параметру ярко выражены. Суммирование баллов по каждому оцениваемому параметру давало обобщенную клиническую картину в числовом эквиваленте, где минимальное значение (0) сопоставимо с клинически здоровым животным, а максимальное значение (15) означало ярко выраженную неврологическую симптоматику (предагональное состояние). Данное состояние БТС являлось критерием вывода его из эксперимента, БТС подвергали эвтаназии гуманным способом.

Оценка объема опухоли

Динамика развития опухоли была исследована с помощью высокопольного магнитно-резонансного томографа Preclinical MRI System 7.0T/17cm (Flexiscan) (MR Solutions, Великобритания). Все исследования проводили на наркотизированных золетил-ксилазином (7–9 мкл/г живой массы БТС, что соответствует 50–60 мг/кг по золетиллу (ВИРБАК, Франция) и 20–25 мг/кг по ксилазину (Bioveta. a.s. Ivanovice na Hame, Czech Republic)) животных.

Перед МРТ-исследованием в ретроорбитальный синус мыши вводили 2 мкл контрастного вещества (Омнискан, ДжиИ Хэлскеа Ирланд Корк, Ирландия), разведенного в 150 мкл 0,9 % раствора NaCl для лучшей визуализации опухоли.

МРТ-исследование проводили с помощью импульсной последовательности: FSE T1 axial (Fast Spin Echo T1, аксиальная проекция) со следующими параметрами: время повторения (TR) — 720 мс, время появления эхо-сигнала (TE) — 11 мс, количество срезов — 12, толщина среза (Thk) — 1 мм, расстояние между срезами — 0,1 мм, поле зрения (FOV) — 20×20, размер матрицы (Image Size) — 256×256, количество повторе-

ний (NEX) — 3, угол поворота (FA) — 90°. Время сканирования — 2 мин 25 с.

Площадь опухоли на срезе определяли полуавтоматическим путем с помощью программного обеспечения MultiVox Dicom.

Результаты и обсуждение

Ортотопическая имплантация клеток Gli-261 в головной мозг БТС привела к формированию объемных новообразований. На МРТ-сканах определялась объемная опухоль, имеющая гетероинтенсивный сигнал на T1, с участками некроза, проявляющегося снижением интенсивности сигнала опухолевой ткани, и кровоизлияний, проявляющихся увеличением интенсивности сигнала, явлениями отека и сдавления прилежащих тканей, дислокацией срединных структур головного мозга (рис. 5).

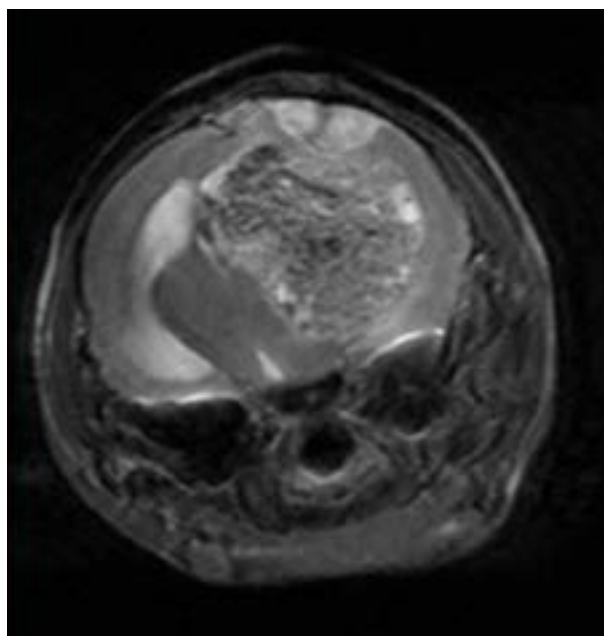


Рис. 5. МРТ-изображение головы мыши с глиобластомой.
Fig. 5. MRI image of the head of a mouse with glioblastoma.

Таблица 1. Комплексная оценка неврологического статуса биологической тест-системы
Table 1. Comprehensive assessment of BTS neurological status

Оцениваемый параметр Parameter	Оценка параметра в баллах Score			
	0	1	2	3
Походка Gait test	Быстрые, плавные, направленные движения Quick, smooth, directional movements	Тремор или хромота при ходьбе, поникший хвост, время от времени наблюдается «сгорбленная» поза Tremor or lameness when walking, a drooping tail, and occasionally a hunched posture	Сильный тремор, пониженный таз и «утиная походка», периодически наблюдается «сгорбленная» поза Severe tremor, low-lying pelvis, waddling gait, and occasionally a hunched posture	Задние лапы не двигаются, передвигаются с помощью передних лап, постоянно наблюдается «сгорбленная» поза, постоянный тремор Immobility of hind paws, only forepaws are used for movement, a permanent hunched posture, permanent tremor
Парапарез (тест с поднятием за хвост) Paraparesis (Tail suspension test)	Задние конечности растопырены наружу, подальше от живота Hind limbs are spread outwards, away from the abdomen	Задние конечности подтягиваются к животу менее чем 50 % времени подвешивания Hind limbs are retracted inwards towards the abdomen for less than 50 % of the suspension period	Задние конечности подтягиваются к животу более чем 50 % времени подвешивания Hind limbs are retracted inwards towards the abdomen for more than 50 % of the suspension period	Задние конечности касаются живота Hind limbs touch the abdomen
Гемипарез Hemiparesis (Neurological deficits)	При поднятии за хвост равное количество попыток поворота в обе стороны When lifted by the tail the BTS makes an equal number of attempts to turn in both directions	Слабые, периодические циркулярные движения. При поднятии за хвост немного больше попыток поворота на противоположную от повреждения сторону Weak, periodic circular movements. When lifted by the tail the BTS makes a little more attempts to turn to the side opposite to the one which is damaged	Слабые, но постоянные циркулярные движения (движение по большому радиусу). При поднятии за хвост больше попыток поворотов на противоположную от повреждения сторону Weak, but persistent circular movements (movement over a large radius). When lifted by the tail the BTS makes more attempts to turn to the side opposite to the one which is damaged	Движение по кругу (по малому радиусу). Потеря рефлекса выпрямления и опоры Circular movements (over a small radius). Loss of the righting and support reflexes
Координация (ходьба по краю клетки) Coordination (Ledge test)	БТС ходит по краю, не теряя равновесие, и плавно опускается в клетку The BTS walks along the edge without losing balance and slowly descends into the cage	БТС теряет почву под ногами во время прогулки вдоль выступа (по верхнему краю клетки), но в остальном выглядит скоординированно The BTS loses balance while walking along the ledge (along the upper edge of the cage), but otherwise seems well-coordinated	БТС неэффективно использует лапы, при спуске приземляется не на лапы, а на голову The BTS inefficiently uses its paws, when descending it lands not on its paws, but on its head	БТС падает с уступа или отказывается двигаться даже при действии сильного внешнего раздражителя The BTS falls off the ledge or refuses to move, even when exposed to a strong external stimulus
Выносливость (висячий тест на 4 лапах) Endurance (Four limb hanging test)	>5 мин с передвижением по поверхности сетки >5 min and moving on the grid surface	>5 мин (на одном месте) >5 min (in the same place)	>5 мин за две попытки >5 min in two attempts	<5 мин за две попытки <5 min in two attempts

Примечание. БТС — биологическая тест-система.
Note. BTS — biological test system.

Результаты еженедельного МРТ-исследования головного мозга у мышей после ортотопической инокуляции клеток GLI-261 показали, что первые признаки новообразования появляются через 2 недели после интрацеребральной инъекции. Дальнейший рост опухоли сопровождался экспоненциальным увеличением ее объема (рис. 6).

При оценке зависимости продолжительности жизни от количества вводимых клеток (рис. 7) было обнаружено, что уменьшение количества клеток в 10 раз увеличивает медиану выживаемости на 33 % (9 суток), а также уменьшает средний

объем опухоли в 8 раз к 21 суткам по данным МРТ с $77,4 \pm 19,2$ до $9,5 \pm 1,77$ мм³ (рис. 8).

В ходе оценки неврологической симптоматики при помощи поведенческих тестов было показано, что объем опухоли (по данным МРТ) коррелирует с выраженностью клинических симптомов: чем больше опухоль, тем более выражены нарушения (рис. 9).

По итогам проведенных экспериментов для дальнейших исследований наиболее перспективной была признана концентрация $8,33 \cdot 10^6$ клеток GLI-261 в 1 мл.

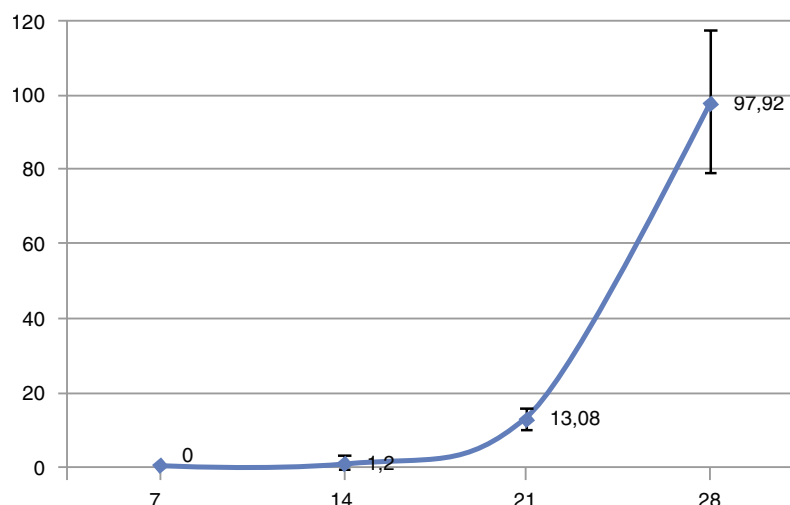


Рис. 6. Динамика изменения объема опухоли. Ось абсцисс — время после инокуляции, сут; ось ординат — объем опухоли, мм³.
Fig. 6. Dynamics of tumour volume. X axis — time after inoculation, days; Y axis — tumour volume, mm³.

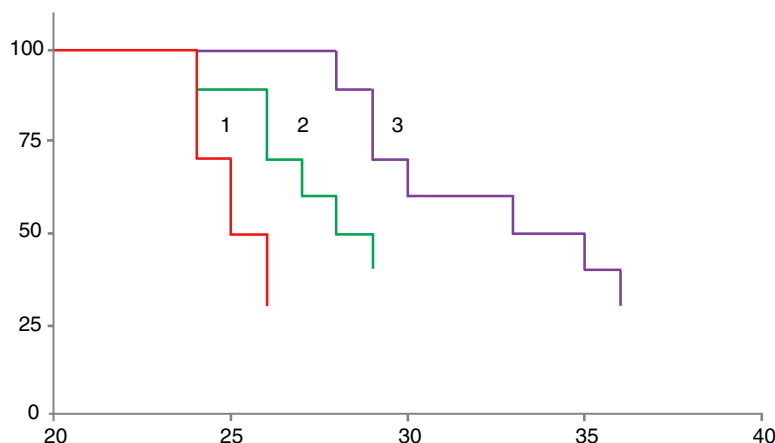


Рис. 7. Кривые выживаемости биологической тест-системы. Дозозависимый эффект. Ось абсцисс — время после инокуляции, сут; ось ординат — выживаемость, %. 1 — $5.0 \cdot 10^3$, 2 — $1.5 \cdot 10^3$, 3 — $5.0 \cdot 10^2$ клеток/БТС.
Fig. 7. BTS survival curves. Dose dependent effect. X axis — time after inoculation, days; Y axis — survival, %. 1 — $5.0 \cdot 10^3$, 2 — $1.5 \cdot 10^3$, 3 — $5.0 \cdot 10^2$ cells/BTS.

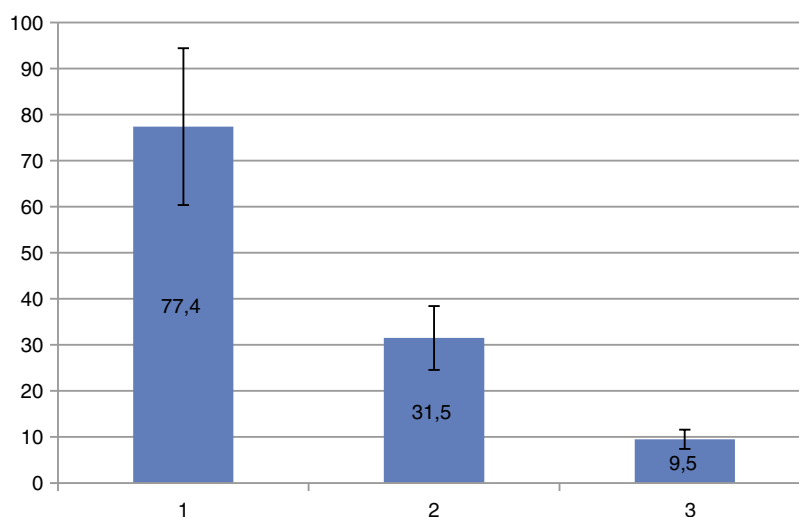


Рис. 8. Объем опухоли на 21 сутки после инокуляции опухолевых клеток. Ось абсцисс — доза инокулированных опухолевых клеток; ось ординат — объем опухоли, мм³. 1 — $5.0 \cdot 10^3$, 2 — $1.5 \cdot 10^3$, 3 — $5.0 \cdot 10^2$ клеток/БТС.
Fig. 8. Tumour volume on day 21 after tumour cell inoculation. X axis — the dose of inoculated tumour cells; Y axis — tumour volume, mm³. 1 — $5.0 \cdot 10^3$, 2 — $1.5 \cdot 10^3$, 3 — $5.0 \cdot 10^2$ cells/BTS.

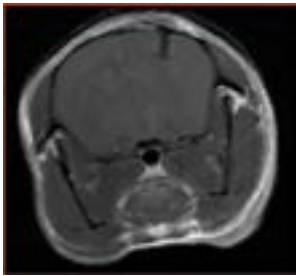
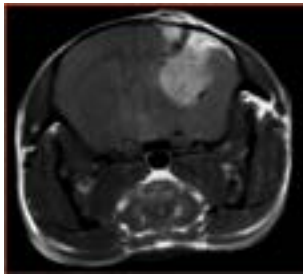
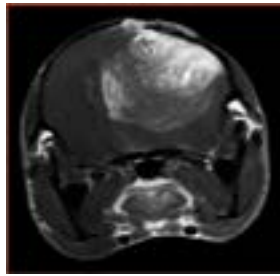
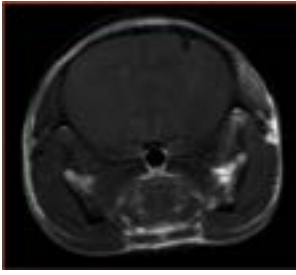
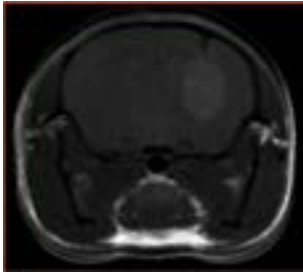
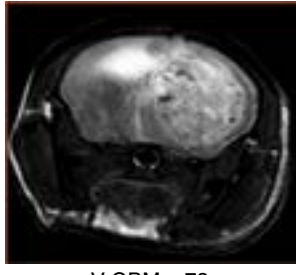
17 сутки Day 17	31 сутки Day 31	38 сутки Day 38
		
V GBM = 0, КОНС = 0	V GBM = 12, КОНС = 2	V GBM = 109, КОНС = 13
		
V GBM = 1, КОНС = 0	V GBM = 9, КОНС = 1	V GBM = 73, КОНС = 10

Рис. 9. Сравнение размера (МРТ-визуализация) опухоли и клинической картины у биологической тест-системы. V GBM — объем глиобластомы мыши по данным МРТ, мм³; КОНС — комплексная оценка неврологического статуса, балл.

Fig. 9. Comparison of the tumour volume (MRI-visualisation) and clinical presentation. V GBM — tumour volume, mm³; КОНС — comprehensive assessment of the neurological status, score.

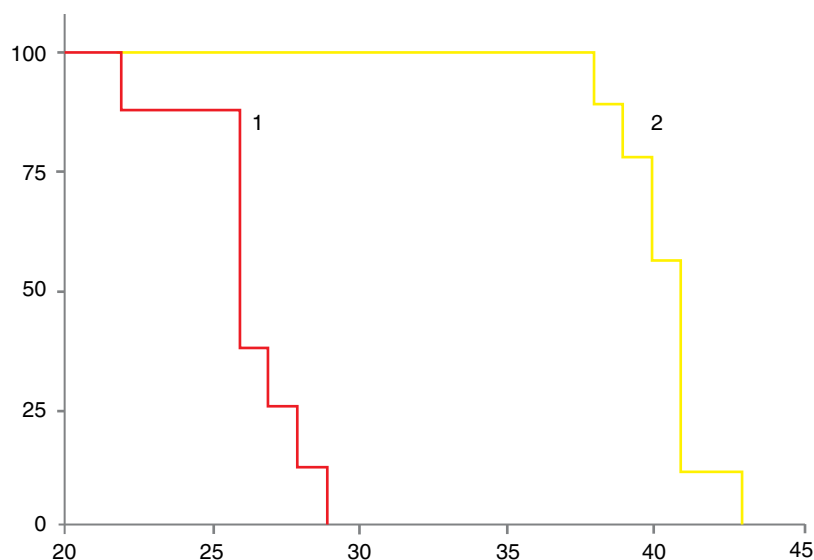


Рис. 10. Выживаемость биологической тест-системы на фоне применения темозоломида. Ось абсцисс — время после инокуляции опухолевых клеток, сут; ось ординат — выживаемость, %. 1 — введение фосфатно-буферного раствора в объеме, равном объему введенного темозоломида, и по той же схеме; 2 — введение темозоломида.

Fig. 10. BTS survival with Temozolomide. X axis — time after tumour cell inoculation, days; Y axis — survival, %. 1 — administration of the phosphate-buffered saline in a volume equal to the volume of the administered temozolomide and following the same regimen; 2 — administration of temozolomide.

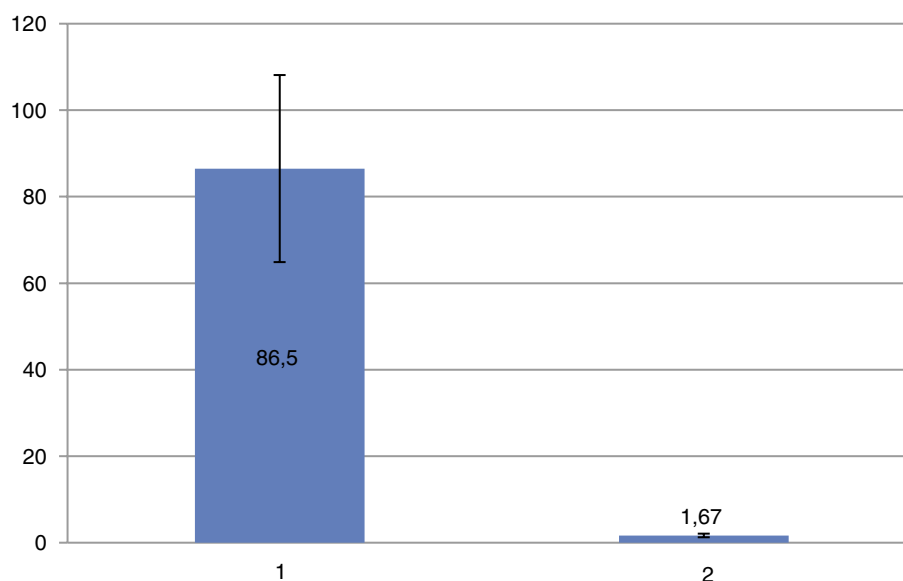


Рис. 11. Средний объем опухоли на 24 сутки после инокуляции опухолевых клеток. Ось абсцисс — группы БТС; ось ординат — объем опухоли, мм³. 1 — введение фосфатно-буферного раствора в объеме, равном объему введенного темозоломида, и по той же схеме; 2 — введение темозоломида.

Fig. 11. Comparison of the tumour volume and clinical presentation. X axis — BTS groups; Y axis — tumour volume, mm³. 1 — administration of the phosphate-buffered saline in a volume equal to the volume of the administered temozolomide and following the same regimen; 2 — administration of temozolomide.

На следующем этапе была проведена серия экспериментов с лечением опухоли темозоломидом («золотой стандарт» при лечении глиобластом).

Применение темозоломида привело к увеличению продолжительности и качества жизни БТС. Медиана выживаемости в группе с темозоломидом (рис. 10) была в 1,5 раза выше, чем в контрольной группе (41,5 суток против 26 суток соответственно и объем опухоли на 24 сутки после операции, оцениваемый при помощи МРТ, был значительно меньше: $1,67 \pm 1,5$ против $86,5 \pm 41,4$ мм³ (рис. 11). Клиническая картина также кардинально отличалась: в группе контроля все БТС пали или были в агональном состоянии (15 баллов по данным клинического осмотра), в то время как в группе с лечением темозоломидом все БТС были клинически здоровы (0–3 балла по КОНС), что подтверждает результаты исследования других авторов [8].

Заключение

Полученные в результате исследования данные свидетельствуют о дозозависимом развитии опухолевого процесса при экспериментальном моделировании глиобластомы мышей на основе линии клеток GLi-261. Важно, что дозозависимый эффект наблюдается практически по всем наиболее значимым параметрам оценки опухолевого процесса, а именно по:

- медиане выживаемости;
- динамике развития опухоли;
- клиническому состоянию биологической тест-системы.

В процессе исследования отработана комплексная оценка тяжести протекания опухолевого процесса, включающая в себя:

- МРТ-исследование (для неинвазивного прижизненного определения наличия и динамики развития опухоли, а также процессов, протекающих в развивающейся опухоли (некроз, кровоизлияние));

- клинический осмотр (адаптирован и внедрен в практику перечень неврологических проявлений глиобластомы, определена корреляция с размером опухоли);

- оценку медианы выживаемости.

Показано, что темозоломид, примененный в отношении разработанной модели экспериментальной глиобластомы, эффективно замедляет динамику развития опухоли, увеличивает медиану выживаемости животных, а также снижает выраженность клинических симптомов.

Таким образом, полученные результаты позволяют говорить о разработанной впервые в России хирургической экспериментальной модели ортотопической глиобластомы мышей на основе линии клеток GLi-261, с использованием стереотаксического и МРТ-оборудования, оценкой клинического состояния экспериментальных животных. Данная экспериментальная модель может быть использована в качестве *in vivo* тест-системы для доклинической оценки эффективности новых противоопухолевых препаратов, а также отработки схем лечения онкологических заболеваний головного мозга при комплексной терапии.

Благодарности. Коллектив авторов выражает благодарность компании ООО «Селлтера Фарм» и лично ее генеральному директору С.В. Ручко за любезно предоставленную возможность использования материалов МРТ-исследования.

Acknowledgments. The authors express gratitude to «Selltera Farm», ООО and to Sergey Ruchko, General Director, in particular, for their kind permission to use MRI materials.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература/References

1. Yi L, Zhou C, Wang B, Chen T, Xu M, Xu L, Feng H. Implantation of GL261 neurospheres into C57/BL6 mice: a more reliable syngeneic graft model for research on glioma-initiating cells. *Int J Oncol*. 2013;43(2):477–84. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1962>
2. Arias-Ramos N, Ferrer-Font L, Lope-Piedrafita S, Mocioiu V, Julià-Sapé M, Pumarola M, et al. Metabolomics of therapy response in preclinical glioblastoma: a multi-slice MRSI-based volumetric analysis for noninvasive assessment of temozolomide treatment. *Metabolites*. 2017;7(2). <https://doi.org/10.3390/metabo7020020>
3. Завьялов ЕЛ, Разумов ИА, Герлинская ЛА, Ромашенко АВ. *In vivo* МРТ-визуализация динамики развития глиобластомы U87 в модели ортотопической ксенотрансплантации мышам линии SCID. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015;19(4):460–5. [Zavjalov EL, Razumov IA, Gerlinskaya LA, Romashchenko AV. *In vivo* MRI visualization of growth and morphology in the orthotopic xenotransplantation U87 glioblastoma mouse SCID model. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(4):460–5 (In Russ.)]
4. Hatzipetros T, Kidd JD, Moreno AJ, Thompson K, Gill A, Vieira FG. A quick phenotypic neurological scoring system for evaluating disease progression in the SOD1-G93A mouse model of ALS. *J Vis Exp*. 2015;(104):e53257. <https://doi.org/10.3791/53257>
5. Shen W, Hu JA, Zheng JS. Mechanism of temozolomide-induced antitumor effects on glioma cells. *J Int Med Res*. 2014;42(1):164–72. <https://doi.org/10.1177/0300060513501753>
6. Guyenet SJ, Furrer SA, Damian VM, Baughan TD, La Spada AR, Garden GA. A simple composite phenotype scoring system for evaluating mouse models of cerebellar ataxia. *J Vis Exp*. 2010;(39):e1787. <https://doi.org/10.3791/1787>
7. Aartsma-Rus A, van Putten M. Assessing functional performance in the Mdx mouse model. *J Vis Exp*. 2014;(85):e51303. <https://doi.org/10.3791/51303>
8. Брюховецкий ИС. Эффективность применения препарата стволовых клеток в эксперименте *in vivo* после курса химиотерапии на модели глиобластомы у крыс. *Российский биотерапевтический журнал*. 2014;13(4):51–7. [Bryukhovetskiy IS. Efficiency of stem cell preparation in the experiment *in vivo* after a course of chemotherapy on the experimental model of glioblastoma in rats. *Rossiiskij bioterapevticheskij Zhurnal* = *Russian Journal of Biotherapy*. 2014;13(4):51–7 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Овсепян Армен Алексанович. Armen A. Ovsepyan. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0628-5513>

Борзов Антон Александрович. Anton A. Borzov. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9199-8464>

Каторкина Елена Ивановна. Elena I. Katorkina. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-3329-0182>

Анисимова Екатерина Олеговна, канд. вет. наук. *Ekaterina O. Anisimova*, Cand. Sci. (Vet.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-5457-3072>

Лыков Максим Валерьевич, канд. мед. наук. *Maksim V. Lykov*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-5740-6664>

Поступила 20.09.2019

После доработки 25.10.2019

Принята к публикации 22.11.2019

Received 20 September 2019

Revised 25 October 2019

Accepted 22 November 2019