#### Клиническая онкогематология. 2021;14(4):414-25

# ОН Клиническая ГЕМАТОЛОГИЯ

Clinical oncohematology. 2021;14(4):414-25



# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

# Создание ксенографтных моделей от больных острыми миелоидными лейкозами с использованием иммунодефицитных мышей линии NSG-SGM3

Е.В. Байдюк<sup>1</sup>, Е.В. Белоцерковская<sup>1</sup>, Л.Л. Гиршова<sup>1,2</sup>, В.А. Голотин<sup>1</sup>, К.А. Левчук<sup>2</sup>, М.Л. Васютина<sup>2</sup>, Я.А. Портная<sup>1</sup>, Е.В. Щелина<sup>2</sup>, О.Г. Бреднева<sup>2</sup>, А.В. Петухов<sup>1,2,3</sup>, А.Ю. Зарицкий<sup>2</sup>, О.Н. Демидов<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт цитологии РАН», Тихорецкий пр-т, д. 4, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194064

<sup>2</sup> ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341

<sup>3</sup> НТУ «Сириус», Олимпийский пр-т, д. 1, Сочи, Российская Федерация, 354340

#### ΡΕΦΕΡΑΤ

Актуальность. До настоящего времени показатели выживаемости пациентов с острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ) остаются неудовлетворительными. Для успешного лечения ОМЛ необходимо создание персонализированных моделей этого заболевания. Наиболее перспективным направлением в данной области является разработка ксенографтных моделей от больных ОМЛ с использованием наиболее современной линии иммунодефицитных «гуманизированных» мышей NSG-SGM3.

**Цель.** Создание ксенографтных моделей от больных ОМЛ с использованием иммунодефицитных мышей линии NSG-SGM3.

Материалы и методы. Для создания PDX-моделей использовались образцы аспирата костного мозга 4 пациентов с впервые диагностированным ОМЛ, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ. Опухолевые клетки от пациентов трансплантировали мышам линии NSG-SGM3. Для проведения контрольного эксперимента мышам NSG-SGM3 вводили клетки линий ОМЛ: OCI-AML2 и HL60. Эффективность приживления образцов опухоли оценивалась на основе физического состояния животных и лабораторных исследований (формула крови, мазок крови, ПЦР, проточная цитофлюориметрия).

Результаты. Приживление введенных опухолевых клеток от пациентов с ОМЛ достигнуто у половины (2 из 4) трансплантированных образцов опухоли. У мышей с успешной трансплантацией имел место лейкоцитоз. Бластные клетки обнаруживались в периферической крови на 30-й день после трансплантации. У мышей с инъецированными клеточными линиями ОМЛ OCI-AML2 и HL60 наблюдалось более агрессивное течение заболевания. Среди протестированных подходов для оценки приживления опухоли у мышей-реципиентов метод ПЦР отличался наибольшей чувствительностью.

#### **EXPERIMENTAL STUDIES**

# Acute Myeloid Leukemia Patient-Derived Xenograft Models Generated with the Use of Immunodeficient NSG-SGM3 Mice

EV Baidyuk<sup>1</sup>, EV Belotserkovskaya<sup>1</sup>, LL Girshova<sup>1,2</sup>, VA Golotin<sup>1</sup>, KA Levchuk<sup>2</sup>, ML Vasyutina<sup>2</sup>, YaA Portnaya<sup>1</sup>, EV Shchelina<sup>2</sup>, OG Bredneva<sup>2</sup>, AV Petukhov<sup>1,2,3</sup>, AYu Zaritskey<sup>2</sup>, ON Demidov<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology, 4 Tikhoretskii pr-t, Saint Petersburg, Russian Federation, 194064

<sup>2</sup> VA Almazov National Medical Research Center, 2 Akkuratova str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341

<sup>3</sup> Sirius University of Science and Technology, 1 Olimpiiskii pr-t, Sochi, Russian Federation, 354340

#### ABSTRACT

**Background.** Up to the present the survival rates of acute myeloid leukemia (AML) patients have remained low. A successful AML management presupposes generating personalized models of the disease. The most promising research activity in this field is creation of AML patient-derived xeno-graft models using the advanced strain of immunodeficient humanized NSG-SGM3 mice.

**Aim.** To generate AML patient-derived xenograft models using immunodeficient NSG-SGM3 mice.

**Materials & Methods.** The creation of PDX models was based on bone marrow aspirates taken from 4 patients with newly diagnosed AML who were treated at the VA Almazov National Medical Research Center. Patient-derived tumor cells were transplanted to NSG-SGM3 mice. Test experiment consisted in injecting AML cells OCI-AML2 and HL60 in NSG-SGM3 mice. The efficacy of tumor engraftment was evaluated in terms of physical condition of animals and laboratory tests (blood count, blood smear, PCR, and flow cytofluorometry).

**Results.** The engraftment of applied tumor cells derived from AML patients was achieved in half (2 out of 4) of the transplanted tumor samples. In mice with successful transplantation leukocytosis was reported. Blast cells were identified in peripheral blood on Day 30 after transplantation. The mice with injected AML cells OCI-AML2 and HL60 showed a more aggressive course of disease. Among tested approaches to evaluate tumor engraftment in mouse recipients, the PCR method was marked by highest sensitivity.

415

Заключение. Использование иммунодефицитных «гуманизированных» мышей линии NSG-SGM3 позволяет успешно получать ксенографтные модели от пациентов с ОМЛ.

> Ключевые слова: ксенографтная модель, иммунодефицитные «гуманизированные» мыши, ОМЛ, мыши линии NSG-SGM3.

Получено: 27 апреля 2021 г. Принято в печать: 1 августа 2021 г.

Для переписки: Екатерина Викторовна Байдюк, канд. биол. наук, Тихорецкий пр-т, д. 4, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194064; e-mail: katya\_bay@mail.ru; Екатерина Васильевна Белоцерковская, канд. биол. наук, Тихорецкий пр-т, д. 4, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194064; e-mail: belotserkovskaya.ev@gmail.com

Для цитирования: Байдюк Е.В., Белоцерковская Е.В., Гиршова Л.Л. и др. Создание ксенографтных моделей от больных острыми миелоидными лейкозами с использованием иммунодефицитных мышей линии NSG-SGM3. Клиническая онкогематология. 2021;14(4):414–25.

DOI: 10.21320/2500-2139-2021-14-4-414-425

**Conclusion.** The use of immunodeficient humanized NSG-SGM3 mice enables successful generation of AML patient-derived xenograft models.

**Keywords:** xenograft model, immunodeficient humanized mice, AML, NSG-SGM3 mice.

Received: April 27, 2021 Accepted: August 1, 2021

*For correspondence:* Ekaterina Viktorovna Baidyuk, PhD in Biology, 4 Tikhoretskii pr-t, Saint Petersburg, Russian Federation, 194064; e-mail: katya\_bay@mail.ru; Ekaterina Vasilevna Belotserkovskaya, PhD in Biology, 4 Tikhoretskii pr-t, Saint Petersburg, Russian Federation, 194064; e-mail: belotserkovskaya.ev@gmail.com

*For citation:* Baidyuk EV, Belotserkovskaya EV, Girshova LL, et al. Acute Myeloid Leukemia Patient-Derived Xenograft Models Generated with the Use of Immunodeficient NSG-SGM3 Mice. Clinical oncohematology. 2021;14(4):414–25. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2021-14-4-414-425

# введение

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) представляют собой гетерогенную группу злокачественных опухолей системы крови, характеризующихся клональной экспансией низкодифференцированных бластных клеток миелоидного ряда в костном мозге. Бластные клетки ОМЛ накапливаются в костном мозге и подавляют пролиферацию нормальных гемопоэтических клеток, что приводит к снижению числа лимфоцитов, эритроцитов и тромбоцитов в крови [1]. Несмотря на прогресс в понимании молекулярно-генетических факторов патогенеза ОМЛ и появление новых протоколов лечения, показатели общей и безрецидивной выживаемости пациентов с ОМЛ остаются неудовлетворительными [2], что в первую очередь связано с высокой частотой рецидивов и рефрактерных форм ОМЛ [3]. Ключевая проблема терапии ОМЛ заключается в гетерогенности опухолевых клеток, которая индивидуальна у каждого конкретного пациента [4]. В этой связи для успешного лечения ОМЛ представляется важным создание персонализированных моделей данного заболевания, которые могут быть использованы для разработки и тестирования новых лечебных стратегий, исследования механизмов формирования терапевтической резистентности, изучения патогенеза и особенностей различных форм ОМЛ.

Одним из наиболее простых подходов к созданию персонализированных моделей злокачественных опухолей является использование первичных культур опухолевых клеток от пациентов [5]. Однако при ОМЛ первичные клетки, полученные от пациентов, вводятся в культуру с очень низкой эффективностью. Как правило, в условиях *ех vivo* большая часть таких клеток погибает в течение первых 3–5 дней культивирования в результате стресс-индуцированного апоптоза [6, 7]. Альтернативный перспективный подход персонализированного моделирования ОМЛ представляет собой ксенопластическую трансплантацию, которая заключается в переносе опухолевых клеток или тканей из одного организма в другой, относящихся к разным биологическим видам, например от человека к мыши. Для ксенотрансплантации могут быть использованы как клеточные линии, так и клетки ОМЛ от пациентов, полученные в результате пункции костного мозга [8]. Последние получили название ксенографтных моделей от пациентов (patientderived xenografts, PDX).

Основным преимуществом PDX-моделей является более эффективное приживление опухолевых клеток, позволяющее в течение длительного времени поддерживать и амплифицировать клинический образец бластных клеток ОМЛ вне организма пациента [9]. Другое преимущество PDX-модели по сравнению с поддержанием культуры клеток — сохранение наиболее важных первоначальных характеристик опухоли, таких как генетический спектр мутаций, клеточная гетерогенность, чувствительность к терапии [10]. Адекватность ксенографтных моделей ОМЛ для оценки эффективности терапии ОМЛ подтверждена в ряде работ [11–13]. Важно подчеркнуть, что данный подход успешно используется при тестировании соединений-кандидатов на стадии доклинических исследований [14, 15]. Однако стоит отметить, что данная модель обладает рядом недостатков, обусловленных в первую очередь более высокими расходами на поддержание модели и необходимостью в высококвалифицированном персонале для выполнения подобных работ. Помимо этого сложность получения и поддержания ксенографтных моделей с использованием линий лабораторных мышей связана

<b>о бластных кле</b>	Н ЧИСЛ	л Бариант Числ	раст, <mark>Вариант Числ</mark>
ате костного мо		FAB пункте	let Пол <mark>FAB пункт</mark>
46,0		M M4	32 М М4
74,8		M1 M1	52 М М1
47,0		M1	40 М М4
74,9		M1	14 Ж М1
00	НТ     Число бластных кл       пунктате костного м     46,0       74,8     74,8       74,9     74,9	Вариант Число бластных кл   л FAB тунктате костного м   л M4 46,0   л M1 74,8   л M4 47,0   м1 M4 47,0   л M1 74,8   л M1 74,8   л M1 74,9   л M1 74,9	pactBapuaHTЧисло бластных клletNo.FABпунктате костного м32MM446,032MM174,852MM474,840MM474,841MM474,944M174,9

с отсутствием соответствующего микроокружения в организме мышей, необходимого для поддержания опухолевых клеток человека, в частности специфических факторов роста и стромальных клеток человека [16].

Для решения данной проблемы разработан ряд линий иммунодефицитных мышей, включая «nude» («голые»), SCID (severe combined immunodeficient мыши с тяжелым комбинированным иммунодефицитом), NOD (non-obese diabetic — мыши с диабетом без ожирения), NOD-SCID и NOD-SCID-IL2rynull (NSG) [17, 18]. Попытки получить ксенографтные модели ОМЛ с использованием ранее созданных линий иммунодефицитных мышей, таких как мыши «nude», не увенчались успехом [19, 20]. В отличие от линии «nude» мышам линии NSG удается выполнить успешную трансплантацию практически всех типов опухолей [21]. Однако у данной линии лабораторных животных отмечается низкая эффективность приживления опухолевых клеток ОМЛ, а в ряде случаев возможна потеря клеток при последующих пассажах [21, 22]. Специально для поддержания миелоидных клеток человека были созданы «гуманизированные» мыши NSG-SGM3. Они экспрессируют цитокины человека, которые способствуют пролиферации опухолевых миелоидных клеток, полученных от пациента с ОМЛ: интерлейкин-3 (IL-3), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор стволовых клеток KITLG [23]. Данный тип мышей позволил значительно повысить эффективность создания моделей ОМЛ [16, 22].

В настоящей работе мы представляем результаты экспериментов по созданию PDX-моделей ОМЛ с использованием иммунодефицитных мышей NSG-SGM3, впервые проведенных на территории Российской Федерации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### Образцы клеток от пациентов с ОМЛ

В пилотное исследование включено 4 пациента с впервые диагностированным ОМЛ в возрасте 32, 40, 44 и 52 года соответственно (3 мужчины, 1 женщина). Больные поступили для лечения в июне — июле 2020 г. в ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ. Все пациенты дали письменное информированное согласие на забор биоматериала и выполнение исследований. Постановка диагноза ОМЛ проводилась с использованием морфоцитохимических, цитофлюориметрических, цитогенетических и молекулярно-биологических методов исследования согласно критериям классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей Всемирной организации здравоохранения (BO3) 2017 г.

Группа риска устанавливалась в соответствии с критериями Европейской сети по изучению лейкозов (ELN) 2017 г. [24]. Характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Пункция костного мозга выполнена в стандартных условиях согласно протоколу. Место пункции — задняя верхняя ость подвздошной кости справа или слева либо грудина на уровне II, III, IV меж-

Е.В. Байдюк и др.

реберий. Манипуляция осуществлялась в условиях специально отведенного манипуляционного кабинета с соблюдением правил асептики и антисептики. Положение пациента: на животе или на спине. Обработка операционного поля проводилась последовательно двукратно 10% раствором бетадина. Тонкой иглой раствором препарата для местной анестезии (5% раствор новокаина, 2% раствор лидокаина) выполняли послойную анестезию тканей вплоть до надкостницы. Пункция осуществлялась иглой для стернальной пункции. В условиях вакуума аспирировали не более 0,2–0,3 мл.

Для получения мононуклеарной фракции клетки от пациентов центрифугировали в градиенте фиколла. Суспензию мононуклеарных клеток, полученных от пациентов с ОМЛ, ресуспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) в концентрации 10<sup>7</sup> клеток в 1 мл, после чего трансплантировали иммунодефицитным мышам.

#### Трансплантация клеток костного мозга пациентов иммунодефицитным мышам

Протокол экспериментов на животных был утвержден комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных (IACUC) ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, DT-IAC001v2.0-Jan 2019. Для трансплантации были выбраны иммунодефицитные мыши линии NSG-SGM3, NOD. Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup> Tg (CMV-IL3, CSF2, KITLG)1Eav/ MloySzJ (JAX stock #013062, The Jackson Laboratory, США) [23]. Мыши содержались в чистой зоне вивария Питомника лабораторных грызунов Центра доклинических и трансляционных исследований Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ в индивидуально вентилируемых клетках группами по 5 голов при температуре 21 ± 1 °С и режиме освещения 12/12.

Полученные от каждого из 4 пациентов мононуклеарные клетки вводили в латеральную хвостовую вену 5 иммунодефицитным мышам, зафиксированным в иммобилайзере, из расчета 1,5 × 10<sup>6</sup> клеток на мышь. Для эксперимента использовали мышей в возрасте 10–18 нед. В результате были сформированы 4 группы мышей (ОМЛ1, ОМЛ2, ОМЛ3 и ОМЛ4) по 5 животных в каждой.

Для проведения контрольных экспериментов были выбраны 2 клеточные линии ОМЛ: OCI-AML2 (FAB M4) и HL60 (FAB M2). Перед трансплантацией клетки каждой линии ресуспендировали в среде RPMI в концентрации 10<sup>7</sup>/мл и вводили по 1,5 × 10<sup>6</sup> клеток в латеральную хвостовую вену мышам NSG-SGM3, по 2 мыши на группу.

#### Оценка состояния животных

На всем протяжении эксперимента мыши находились под наблюдением ветеринарного врача. Общее физическое состояние мышей оценивалось ежедневно. Через 30 дней после трансплантации клеток, т. е. перед забором материала и эвтаназией животных, проводилась оценка их упитанности (табл. 2, *A*) и поведенческой активности (табл. 2, *Б*). Каждой мыши присваивался балл, далее рассчитывался средний балл для каждой группы. Таблица 2. Параметры оценки физических и поведенческих характеристик животных

A	. Упитанность животного	Баллы
	Истощение	1
	Худоба	2
	Норма	3
	Полнота	4
	Ожирение	5
Б	. Показатели поведения мыши	Баллы
	Реакция на внешние раздражители отсутствует, рефлексы и фотореакция зрачков отсутствуют, дыхание редкое, аритмичное	1
	Реакция на раздражители отсутствует, рефлексы угнетены, дыхание частое, поверхностное	2
	Реакция на сильные внешние раздражители, животное заторможено. Не пьет, пищи не принимает	3
	Адекватно реагирует на внешние раздражители, пьет воду, пищу не принимает. Животное вялое, передвигается по клетке с неохотой	4
	Поведение животного не отличается от поведения здорового (интактного животного): активно передвигается по клетке, пьет и принимает пищу	5

Таблица 3. Олигонуклеотидные последовательности праймеров, использованные в работе

Ген	Олигонуклеотидная последовательность (5'→3')	Размер ПЦР- продукта	Источник
SRY	F: CATGAACGCATTCATCGTGTGGTC	254	[25]
	R: CTGCGGGAAGCAAACTGCAATTCTT		
ATL1	F: CCCTGATGAAGAACTTGTATCTC	301	
	R: GAAATTACACACATAGGTGGCACT		
comW1	F: TTCCTCCGTGGCCTTTTTCG	319	-
	R: GCTTTTAGTCACTTCCATCAGTGT		

Эффективность приживления образцов оценивалась не только на основе физического состояния животных, но и путем лабораторных исследований крови на 10, 20 и 30-й дни после введения клеток. Забор крови осуществляли в пробирку с ЭДТА путем отрезания кончика хвоста. Анализ формулы крови проводился с помощью автоматического ветеринарного анализатора Abacus Junior/Vet (Diatron, Австрия). Мазки крови мышей выполняли по стандартной методике на предметных стеклах, фиксировали этанолом и окрашивали азуром и эозином.

#### ПЦР и проточная цитофлюориметрия

Помимо анализа крови для оценки приживления опухоли проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием ДНК мышей, выделенной из крови. Выделение геномной ДНК из крови мышей осуществляли коммерческим набором ExtractDNA Blood («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Полученную ДНК использовали для амплификации фрагментов генов человека *SRY*, *ATL1*, *comW1*. Олигонуклеотидные последовательности к данным генам были подобраны таким образом, что позволяли осуществлять специфическую амплификацию только ДНК человека, но не ДНК мыши. Это давало возможность контролировать

#### КЛИНИЧЕСКАЯ ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ



Рис. 1. Схема создания и поддержания PDX-модели ОМЛ

КМ — костный мозг; МК — мазок крови; ОМЛ — острый миелоидный лейкоз; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ПЦФМ — проточная цитофлюориметрия; ФК — формула крови.

Fig. 1. Generation and maintenance diagram for PDX model of AML

KM — bone marrow; MK — blood smear; OMЛ — acute myeloid leukemia; ΠЦP — polymerase chain reaction; ΠЦΦM — flow cytofluorometry; ΦK — blood count.

приживление трансплантированных клеток человека в организме реципиентного животного. В случае *SRY* и *ATL1* амплификацию проводили как по отдельности, так и в условиях мультиплексной ПЦР (*SRY* + *ATL1*). Олигонуклеотидные последовательности для амплификации фрагментов гена *comW1* были подобраны с помощью программы PrimerBLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ tools/primerblast/). Характеристика использованных праймеров приведена в табл. 3.

Амплификацию проводили на приборе T100<sup>™</sup> Thermal Cycler (Віо-Rad, США) с использованием коммерческой смеси реактивов для ПЦР Encyclo Plus PCR kit («Евроген», Россия). В ПЦР-смесь добавляли по 0,4 мкмоль каждого из праймеров и 50 нг геномной ДНК. Режим амплификации включал предварительную денатурацию при температуре 95 °C в течение 3 мин; затем 38 циклов, включавших денатурацию (95 °C, 20 с), отжиг (61 °C, 20 с), элонгацию (72 °C, 25 с); заключительную элонгацию при температуре 72 °C в течение 3 мин. Полученные продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле в 1х буфере ТАЕ. Для визуализации использовали этидия бромид в концентрации 1 мкг/мл.

Оценку персистенции трансплантированных опухолевых клеток от пациента с ОМЛ в периферической крови и костном мозге мышей проводили методом проточной цитофлюориметрии. Для получения фракции мононуклеарных клеток периферическую кровь мышей центрифугировали в градиенте плотности фиколла. Обогащенную фракцию мононуклеарных клеток мышей окрашивали моноклональными антителами, специфичными к антигену CD45, меченными флюорохромом PerCPCy5 (BD, CША). Окрашенные образцы анализировали с помощью проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, CША). О присутствии опухолевых клеток человека в периферической крови и костном мозге мышей судили по наличию и характеру «облака» отдельной популяции окрашенных клеток.

Общая схема эксперимента по созданию PDX-модели представлена на рис. 1.

#### Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 8.3. Статистическую значимость между двумя независимыми выборками оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считались значимыми при p < 0,05.

# РЕЗУЛЬТАТЫ

# Динамика изменений формулы крови мышей после трансплантации клеток костного мозга от пациентов с ОМЛ

В результате проведенных трансплантаций клеток костного мозга 4 пациентов с ОМЛ реципиентным животным были сформированы 4 группы мышей (ОМЛ1, ОМЛ2, ОМЛ3, ОМЛ4) по 5 животных в каждой. Для того чтобы оценить успешность проведенной трансплантации, ежедневно отслеживали общее состояние здоровья животных, а каждые 10 дней проводили забор крови для мониторинга изменений в ее формуле.

Обычно мыши линии NSG характеризуются отсутствием в крови клеток лимфоцитарного ряда из-за блока лимфоцитарной дифференцировки, обусловленного мутациями в гене Prkdc [26]. Эта особенность служит причиной доминирования нейтрофилов среди лейкоцитов в формуле крови. В эксперименте у мышей с успешным приживлением клеток ОМЛ отмечался лейкоцитоз с повышенным абсолютным содержанием гранулоцитов в крови. Данные изменения были выявлены только на 30-й день после трансплантации у части мышей из групп ОМЛ2 и ОМЛ3. Кровь, полученная от мышей ОМЛ2-1, ОМЛ2-3, ОМЛ3-1 и ОМЛЗ-З, характеризовалась высоким числом лейкоцитов, достигающим 2-3-кратного превышения нормальных значений (рис. 2, А). Так, в среднем у контрольных мышей и у тех, у кого, по-видимому, не прижился введенный образец (группа 1), количество лейкоцитов через месяц после введения клеток

419





Рис. 2. Показатели и цитология мазков крови мышей после трансплантации костного мозга от пациентов с ОМЛ: *А* — количество лейкоцитов в крови контрольных мышей и мышей, которым трансплантированы клетки костного мозга, полученные от пациентов с ОМЛ (группы 1 и 2), через 10, 20 и 30 дней после трансплантации. Группа 1 — мыши, у которых предположительно не произошло приживления трансплантированных клеток, группа 2 — мыши с эффективным приживлением трансплантата от пациентов с ОМЛ; *Б* — абсолютные значения количества лейкоцитов и гранулоцитов в крови мышей, у которых не произошло приживления трансплантированных клеток (группа 1), мышей с эффективным приживлением клеток костного мозга (группа 2) и контрольных мышей на 30-й день после введения трансплантата; *В*–*Д* — мазки крови (*B*) контрольных мышей, (/) мышей группы 1 и (*Д*) мышей группы 2. Окраска азуром и эозином, ×63. *Стрелками* указаны бластные формы миелоидных клеток

#### Fig. 2. The parameters and cytology of mouse blood smears after AML patient-derived bone marrow transplantation:

A — leukocyte count in the control mice and the mice with transplanted bone marrow cells derived from AML patients (groups 1 and 2), in 10, 20, and 30 days after transplantation. Group 1 includes the mice in which the engraftment of transplanted cells is assumed to fail, group 2 includes the mice with successful engraftment of AML patient-derived transplants; B — absolute leukocyte and granulocyte counts in the mice with engraftment failure (group 1), mice with successful engraftment of bone marrow cells (group 2), and control mice on Day 30 after transplantation; B-A — blood smears of (B) control mice, ( $\Gamma$ ) mice of group 1, and (A) mice of group 2. Azure-eosin stain, ×63. Blast forms of myeloid cells are marked with arrows

достигло 1,84 ± 0,23 × 10<sup>9</sup>/л и статистически не отличалось от контрольных значений 1,21 ± 0,21 × 10<sup>9</sup>/л. В то же время у мышей, у которых предположительно произошло эффективное приживление введенных клеток (группа 2), уровень лейкоцитов повысился более чем в 10 раз и составил 16,02 ± 0,66 × 10<sup>9</sup>/л (рис. 2, *A*, *Б*). Как и ожидалось, основным источником лейкоцитоза были клетки гранулоцитарного ряда, количество которых увеличилось в 14 раз по сравнению с контролем (см. рис. 2, *Б*). Кроме того, в мазках крови животных ОМЛ2-1, ОМЛ2-3, ОМЛ3-1 и ОМЛ3-3 (группа 2) были обнаружены бластные формы клеток (рис. 2, *Д*) в отличие от мазков крови контрольных мышей (рис. 2, *В*) и мышей группы 1, у которых не наблюдалось выраженного лейкоцитоза (рис. 2, *Г*).

Остальные показатели крови мышей через 30 дней после введения образцов не различались или отличались незначительно от контрольных значений (табл. 4).

# Оценка физического состояния и поведения мышей после трансплантации клеток костного мозга, полученных от пациентов с ОМЛ (PDXмыши), и клеточных линий ОМЛ (OCI-AML2 и HL60)

Практически все мыши, которым были выполнены трансплантации мононуклеарных клеток от пациентов с ОМЛ, в т. ч. и особи с выраженным лейкоцитозом (ОМЛ2-1, ОМЛ2-3, ОМЛ3-1, ОМЛ3-4), по своему физическому состоянию и поведению не отличались от контрольных животных (табл. 5). Исключение составляла мышь ОМЛ2-1, у которой наблюдалась худоба и шаткость походки. При вскрытии животных видимых новообразований, воспалений, отечности и других отклонений от нормы не обнаружено. Если по массе тела данные мыши не отличались от контрольных, то масса легких превышала таковую у контрольных мышей на 34 %, а масса селезенки увеличилась в 3,77 раза (табл. 6). Таблица 4. Показатели формулы крови контрольных мышей, мышей, у которых не произошло приживления трансплантированных клеток (группа 1), и мышей с успешным приживлением трансплантата (группа 2) через 30 дней после введения клеток костного мозга, полученных от пациентов с ОМЛ

Показатели формулы крови	Контроль ( <i>n</i> = 7)	Группа 1 ( <i>n</i> = 16)	Группа 2 ( <i>n</i> = 4)
Лейкоциты, ×10 <sup>9</sup> /л	1,24 ± 0,23	1,65 ± 0,21	16,03 ± 0,66*
Лимфоциты, ×10 <sup>9</sup> /л	0,18 ± 0,06	0,16 ± 0,04	1,18 ± 0,19*
Моноциты, ×10 <sup>9</sup> /л	0,07 ± 0,03	0,14 ± 0,03	1,47 ± 0,23*
Гранулоциты, ×10 <sup>9</sup> /л	0,98 ± 0,19	1,34 ± 0,17	13,40 ± 0,69*
Лимфоциты, %	14,76 ± 3,69	10,88 ± 2,37	7,30 ± 0,93
Моноциты, %	5,44 ± 1,48	7,81 ± 1,28	9,28 ± 1,64
Гранулоциты, %	79,81 ± 3,89	81,23 ± 3,02	83,43 ± 1,74
Эритроциты, ×10 <sup>12</sup> /л	5,02 ± 0,47	5,07 ± 0,36	4,87 ± 0,35
Гемоглобин, г/л	94,86 ± 8,47	92,94 ± 6,33	88,75 ± 4,63
Гематокрит, %	23,73 ± 2,17	22,28 ± 1,48	22,23 ± 1,13
МСV, фл	47,00 ± 0,22	44,94 ± 0,35	43,75 ± 0,75
МСН, пг	18,79 ± 0,49	18,73 ± 0,38	17,53 ± 0,42
МСНС, г/л	387,86 ± 17,99	417,88 ± 7,15	400,00 ± 3,98
RDW, %	18,34 ± 0,28	18,38 ± 0,19	18,25 ± 0,27
Тромбоциты, ×10 <sup>9</sup> /л	504,43 ± 75,08	470,69 ± 56,61	591,75 ± 15,39
Тромбокрит, %	0,28 ± 0,04	0,25 ± 0,03	0,35 ± 0,02
MPV, фл	5,56 ± 0,10	5,48 ± 0,10	5,95 ± 0,22
PDW, %	31,51 ± 0,41	31,86 ± 0,54	33,70 ± 0,57

МСН — среднее содержание гемоглобина; МСНС — средняя концентрация гемоглобина в эритроците; МСV — средний объем эритроцита; MPV — средний объем тромбоцита; PDW — ширина распределения тромбоцитов; RDW — ширина распределения эритроцитов.

\* Отличие от контроля p ≤ 0,01, X ± Sx.

Значительно более агрессивно болезнь протекала у мышей, которым были трансплантированы клеточные линии OCI-AML2 и HL60. У этих животных наблюдалось появление множественных новообразований по всему телу (подкожные, внутримышечные, во внутренних органах) (см. табл. 5). Примечательно, Таблица 6. Масса тела и внутренних органов мышей контрольной группы и группы 2 (успешное приживление клеток костного мозга от пациентов с ОМЛ) через 30 дней после трансплантации

	Масса тела, г	
Орган	Контроль	Группа 2
Тело	31,50 ± 0,50	29,33 ± 2,19
Легкие	0,22 ± 0,02	0,29 ± 0,01
Печень	1,92 ± 0,15	2,03 ± 0,20
Селезенка	0,04 ± 0,0015	0,14 ± 0,03

что в отличие от мышей с трансплантацией костного мозга от пациентов с ОМЛ у всех животных, привитых с использованием клеточных линий ОМЛ, регистрировались симптомы нейролейкоза [27]. Неврологические симптомы отмечались как в поведении мышей (апатия, замедленность движений, неустойчивость походки, нарушение координации), так и в виде заметных физических нарушений, таких как паралич задних конечностей (OCI-AML2), увеличение и асимметрия черепа, энофтальм, менингит (HL60) (см. табл. 5).

## Оценка приживления трансплантатов костного мозга от пациентов с ОМЛ методом ПЦР и проточной цитофлюориметрии

Особенность использованного ПЦР-теста заключается в том, что олигонуклеотидные последовательности к генам *SRY*, *ATL1* и *comW1* специфично распознают только ДНК человека, но не ДНК мыши. Таким образом, определение ПЦР-продукта служит доказательством наличия клеток человека в крови мыши, т. е. успешного приживления опухоли, полученной от пациента с ОМЛ, у мышей-реципиентов. Кроме того, важно отметить, что гены *SRY* и *ATL1* являются ключевыми детерминантами пола, а наличие ПЦР-продукта фрагментов этих генов указывает

Таблица 5. Физические и поведенческие характеристики мышей через 30 дней после трансплантации мононуклеарных клеток костного мозга, полученных от пациентов с ОМЛ, и клеточных линий OCI-AML2 и HL60

		Мыши после введения различных типов клеток		пов клеток
Физические и поведенческие	Интактные	Аспират костного	Клеточные линии	
характеристики животных	мыши	с ОМЛ	OCI-AML2	HL60
Поведение	5	4,75 ± 0,22	3	4
Физическое состояние (худоба/полнота)	3	2,75 ± 0,21	2	3
Наличие новообразований	Нет	Нет	Множественные подкожные новообразования, новообра- зования в брюшной полости, представленные колониями клеток ОМЛ размером от 3—4 до 8—10 мм на внутренних органах и в виде отдельных структур	Множественные подкожные новообразования, ново- образования в брюшной полости, мягких тканях
Состояние внутренних органов	Без видимых патоло- гических изменений	Увеличение селезенки, в остальном— без видимых патологических изменений	Перерождение тимуса, увели- чение придатков, селезенка уменьшена	Тимус атрофирован, левая почка с новообразованием, уменьшение селезенки
Дополнительные характе- ристики	Нет	Нет	Асцит, паралич задних конечно- стей	Увеличение черепной коробки, энофтальм правого глаза, шаткость походки

421

#### M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Рис. 3. Электрофореграмма продуктов совместной амплификации фрагментов генов SRY и ATL1

М — маркер молекулярной массы 50 bp+ («Евроген», Россия): дорожки 1–5 — образцы ОМЛ2-1, ОМЛ2-2, ОМЛ2-3, ОМЛ2-4, ОМЛ2-5; дорожки 6, 7 — образцы от контрольных мышей без трансплантации опухоли; дорожки 8–12 — образцы ОМЛ3-1, ОМЛ3-2, ОМЛ3-3, ОМЛ3-4, ОМЛ3-5; дорожка 13 — отрицательный контроль (ДНК из клеток эмбриональной линии мыши NIH3T3); дорожка 14 — положительный контроль амплификации *SRY* (ДНК мужчины); дорожка 15 — положительный контроль амплификации *ATL1* (ДНК женщины).

Fig. 3. Electropherogram of co-amplification products of SRY and ATL1 gene fragments

M — molecular weight marker 50 bp+ (Evrogen, Russia): lanes 1–5 — AML2-1, AML2-2, AML2-3, AML2-4, and AML2-5 samples; lanes 6, 7 — samples derived from the control mice without tumor transplantation; lanes 8–12 — AML3-1, AML3-2, AML3-3, AML3-4, and AML3-5 samples; lane 13 — negative control (DNA of embryonic strain cells of NIH3T3 mouse); lane 14 — positive *SRY* amplification control (male DNA); lane 15 — positive *ATL1* amplification control (female DNA)

на присутствие Ү- и Х-хромосомы соответственно. В связи с этим определение генов половых хромосом привитых клеток человека позволяет осуществлять дополнительный контроль чистоты/контаминации биологическим материалом человека во время проведения эксперимента. Так, несоответствие пола, установленного ПЦР, будет сигнализировать о проблемах с логистикой при транспортировке трансплантационного материала из клиники в отделение по содержанию лабораторных животных и/или после выполнения трансплантации животным. Результаты ПЦР (SRY, ATL1, SRY + ATL1, comW1) указывают на приживление опухоли в группах животных с образцами ОМЛ2 (ОМЛ2-1, ОМЛ2-2, ОМЛ2-3, ОМЛ2-4, ОМЛ2-5) и ОМЛЗ (ОМЛЗ-1, ОМЛЗ-2, ОМЛЗ-3, ОМЛЗ-4, ОМЛЗ-5) (рис. 3 и 4). При трансплантации клеточных линий OCI-AML2 и HL60 приживление введенных клеток регистрировалось у всех привитых животных (данные не приводятся).

Помимо ПЦР для оценки приживления опухолевых клеток в трансгенных мышах использовался метод проточной цитофлюориметрии. На примере трех экспериментальных образцов (ОМЛ2-1, ОМЛ2-3, ОМЛ3-4) показано, что данный метод позволяет определять наличие лейкозных клеток человека (CD45+) в периферической крови (рис. 5, *A*) и костном мозге (рис. 5, *Б*) у мышей — реципиентов трансплантата костного мозга, полученного от пациентов с

#### M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагментов гена *comW1* 

М — маркер молекулярной массы 100 bp+ («Евроген», Россия): дорожки 1–5 — образцы ОМЛ2-1, ОМЛ2-2, ОМЛ2-3, ОМЛ2-4, ОМЛ2-5; дорожка 6 — образец от контрольной мыши без трансплантации опухоли; дорожки 7–11 — образцы ОМЛ3-1, ОМЛ3-2, ОМЛ3-3, ОМЛ3-4, ОМЛ3-5; дорожки 12–16 — образцы ОМЛ4-1, ОМЛ4-2, ОМЛ4-3, ОМЛ4-4, ОМЛ4-5; дорожка 17 — положительный контроль ПЦР (ДНК человека); дорожка 18 — отрицательный контроль (ДНК из клеток эмбриональной линии мыши NIH3T3).

Fig. 4. Electropherogram of co-amplification products of *comW1* gene fragments

M — molecular weight marker 100 bp+ (Evrogen, Russia): lanes 1–5 — AML2-1, AML2-2, AML2-3, AML2-4, and AML2-5 samples; lane 6 — sample derived from the control mouse without tumor transplantation; lanes 7–11 — AML3-1, AML3-2, AML3-3, AML3-4, and AML3-5 samples; lanes 12–16 — AML4-1, AML4-2, AML4-3, AML4-4, and AML4-5 samples; lane 17 — positive PCR control (human DNA); lane 18 — negative control (DNA of embryonic strain cells of NIH3T3 mouse).

ОМЛ. Число выявленных клеток человека у особей с успешной трансплантацией составляло 0,53–2,88 % в периферической крови, 1,0–6,84 % — в костном мозге.

# обсуждение

В настоящее время PDX-модели ОМЛ рассматриваются как многообещающий подход для изучения биологических основ патогенеза ОМЛ, а также разработки и тестирования новых лечебных стратегий. Известно, что результаты тестирования кандидатных соединений, полученные в экспериментах *in vitro* и на моделях трансгенных мышей, зачастую не воспроизводятся в ходе клинических испытаний, что связывают с невозможностью воссоздания мутационного профиля ОМЛ человека и влияния микроокружения [28]. Модели PDX позволяют с наибольшим успехом преодолеть данные ограничения, что делает эти системы одним из самых адекватных подходов для оценки эффективности новой терапии ОМЛ.

Несмотря на то что появление линий иммунодефицитных «гуманизированных» мышей, таких как NSG-SGM3, открыло новые перспективы на пути создания персонализированных моделей ОМЛ, к настоящему времени описанный в литературе опыт создания PDX-моделей ОМЛ в основном относится к более ранним линиям иммунодефицитных мышей, таких как NOD/ SCID, в меньшей степени — NSG. Основная задача проведенного нами исследования заключалась в создании PDX-моделей ОМЛ с использованием линии NSG-SGM3. Хотя данный тип иммунодефицитных животных харак-



Рис. 5. Оценка приживления опухолевых клеток пациента с ОМЛ у мышей-реципиентов. Гистограммы распределения лейкозных клеток человека в образцах мыши из группы контроля (без трансплантации) и мыши после трансплантации (ОМЛЗ-4), окрашенных антителами против CD45, конъюгированными с PerCPCy5.5-A. Область гистограммы красного цвета соответствует субпопуляции CD45-позитивных клеток человека, диагностированных в (*A*) периферической крови и (*Б*) костном мозге мыши FSC-A — область бокового светорассеяния; КМ — костный мозг.

**Fig. 5.** Evaluation of AML patient-derived tumor cell engraftment in mouse recipients. Histograms of human leukemia cell distribution in the control mouse samples (without transplantation) and in the mouse after transplantation (AML3-4) stained with PerCPCy5.5-A conjugated CD45 antibodies. Red area of histogram indicates subpopulations of human CD45-positive cells identified in (A) peripheral blood and (*b*) bone marrow of a mouse

FSC-A — forward scatter area; SSC-A — side scatter area; KM — bone marrow.

Ксенографтные модели ОМЛ

теризуется наиболее высоким потенциалом приживления трансплантатов человека среди существующих линий лабораторных мышей [21, 29], приживление образцов опухоли ОМЛ по-прежнему ограничено. Так, в работе М. Krevvata и соавт. на большой выборке пациентов с ОМЛ удалось достичь 82 % успешных трансплантаций у мышей NSG-SGM3 [22].

В настоящей работе успешное приживление клеток ОМЛ у животных-реципиентов регистрировалось в половине (2 из 4) инъецированных образцов опухоли пациентов (ОМЛ2, ОМЛ3). Отсутствие 100%-го приживления опухолевых клеток человека с ОМЛ может быть обусловлено особенностями животных-реципиентов и манипуляционных процедур с ними. К примеру, для повышения уровня приживления лейкозных клеток широко распространена практика применения циклофосфамида и/или бусульфана [22], а также облучение мышей у-излучением [9]. В нашей работе мы не прибегали к подобным подготовительным манипуляциям по причине повышенной чувствительности мышей линии NSG к физическим воздействиям и химическим соединениям, повреждающим ДНК, из-за мутации в гене ответа на двухцепочечные разрывы в ДНК (DNA-PK), белковый продукт которого принадлежит к IV классу семейства PI3К-киназ. Кроме того, использование ү-излучения у мышей затруднено в связи с возможной контаминацией патогенами «чистой» зоны вивария, в которой содержатся иммунодефицитные животные, при транспортировке к источнику излучения. В последующих экспериментах мы планируем проверить специально подобранные для мышей NSG-SGM3 дозы бусульфана, чтобы сравнить эффективность колонизации костного мозга мыши трансплантатом, полученным от пациентов с ОМЛ.

Кроме того, на число успешных трансплантаций оказывает влияние путь введения опухолевых клеток в трансгенных мышей [30, 31], пол реципиентных животных [32, 33]. В настоящее время мы изучаем возможность интратибиального введения клеток ОМЛ человека мышам-реципиентам с целью сократить путь поступления донорских клеток к костному мозгу, минимизировать их потери при прямом внутрикостном введении клеток и тем самым повысить число приживлений клеток человека в модельных мышах.

В проведенном нами исследовании примечательна согласованность результатов трансплантации среди животных, инъецированных одним и тем же образцом опухоли. В частности, приживление опухолевых клеток образцов ОМЛ2 и ОМЛ3 наблюдалось у всех животных-реципиентов, в то время как у всех мышей после трансплантации образцов ОМЛ4 и ОМЛ5 приживление опухоли отсутствовало. Эти данные позволяют предположить наличие зависимости эффективности приживления от характеристик трансплантируемой опухоли. Действительно, согласно опубликованным работам, потенциал приживления опухоли может зависеть от генетических аномалий и прогностической группы пациента [9], варианта опухоли по FAB-классификации.

Так, некоторые авторы отмечают повышенный потенциал приживления опухолей с мутациями в гене

*FLT3* [21], в то время как другие исследователи отрицают влияние данной тандемной дупликации на успех трансформации [34, 35]. Среди трансплантированных нами образцов опухоли у 1 пациента были выявлены мутации *FLT3*-ITD и *NPM1* (пациент № 2, см. табл. 1). При этом потенциал приживления данного образца сопоставим с таковым у другого пациента, опухолевые клетки которого не содержали прогностически значимых мутаций ОМЛ (пациент № 3, см. табл. 1).

В ряде работ показано, что наибольшее число успешных трансплантаций опухолей выполняется от пациентов с неблагоприятным прогнозом [35–38]. Иными словами, чем хуже прогноз, тем больше вероятность приживления трансплантата опухолевых клеток в мышах-реципиентах. По этой причине для создания ксенографтных моделей ОМЛ мы отобрали образцы от пациентов с ОМЛ из групп высокого и промежуточного риска (см. табл. 1). Мы не наблюдали различий в потенциале приживления лейкозных клеток от пациентов из указанных групп риска.

Опубликованные данные о влиянии FAB-варианта ОМЛ на приживление опухоли весьма противоречивы [21, 34, 37]. В проведенном нами исследовании приживление образцов от пациентов с ОМЛ не коррелировало с диагнозом согласно FAB-классификации. Следует отметить, что в проведенной нами работе малочисленность выборки не позволяет сформулировать выводы о закономерностях между потенциалом приживления и типом опухоли.

Немаловажной частью нашей работы была отработка методов оценки приживления трансплантированных образцов. Это оценка физического состояния животного, анализ формулы крови, мазки крови, результаты ПЦР-тестирования, проточной цитофлюориметрии. Согласно нашим данным, оценка физического состояния животного не давала возможности выявлять успешно привитых особей. Морфологические тесты, такие как анализ формулы и мазки крови, отражали динамику развития опухоли у реципиентных животных, однако по причине низкой чувствительности позволяли устанавливать приживление лишь на поздних сроках (30-й день после трансплантации). В отличие от анализа формулы крови метод ПЦР характеризовался более высокой чувствительностью, благодаря которой животных с приживлением человеческих клеток удавалось выявлять на более ранних сроках. Кроме того, по сравнению с результатами формулы крови положительный ответ ПЦР был получен у большего числа экспериментальных животных.

Помимо анализа формулы крови и ПЦР нами был опробован метод проточной цитофлюориметрии, широко применяемый в экспериментах по созданию PDX-моделей. Чувствительность данного метода оценивается как 0,1–0,5 % опухолевых клеток человека от общего числа клеток крови (костного мозга) экспериментального животного [29]. Однако метод проточной цитофлюориметрии требует экспериментальной верификации видоспецифичности антител, используемых для обнаружения клеток человека. Кроме того, возможная кросс-реактивность антител человека с антигенами мыши может приводить к ложноположительным результатам. Таким образом, согласно нашему опыту, оценка приживления опухоли человека у животных должна осуществляться не только классическими лабораторными тестами (анализ формулы крови, мазок крови), но и более чувствительными диагностическими подходами (ПЦР, проточная цитофлюориметрия).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование иммунодефицитных «гуманизированных» мышей линии NSG-SGM3 позволяет достигать приживления первичных опухолевых клеток от пациентов с ОМЛ. Полученный опыт по созданию персонализированных ксенографтных моделей ОМЛ может быть использован для изучения патогенеза болезни и разработки новых персонализированных направлений терапии ОМЛ в целом.

### КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

# ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ в рамках научного проекта № 19-75-20128, гранта РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-51035.

# ВКЛАД АВТОРОВ

**Концепция и дизайн:** О.Н. Демидов, М.Л. Васютина, Л.Л. Гиршова, А.Ю. Зарицкий.

**Сбор и обработка данных:** О.Н. Демидов, Е.В. Байдюк, Е.В. Белоцерковская, В.А. Голотин, К.А. Левчук.

**Предоставление материалов исследования:** О.Н. Демидов, Л.Л. Гиршова, М.Л. Васютина, Е.В. Щелина, О.Г. Бреднева, Я.А. Портная.

**Анализ и интерпретация данных:** О.Н. Демидов, Е.В. Байдюк, Е.В. Белоцерковская, Л.Л. Гиршова, А.В. Петухов.

**Подготовка рукописи:** О.Н. Демидов, Е.В. Байдюк, Е.В. Белоцерковская, А.В. Петухов, Л.Л. Гиршова.

**Окончательное одобрение рукописи:** О.Н. Демидов, А.В. Петухов, Л.Л. Гиршова, А.Ю. Зарицкий.

# ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Saultz JN, Garzon R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. J Clin Med. 2016;5(3):33. doi: 10.3390/jcm5030033.

2. Burnett A, Wetzler M, Lowenberg B. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2011;29(5):487–94. doi: 10.1200/jco.2010.30.1820.

**3.** Patel SA, Gerber JM. A User's Guide to Novel Therapies for Acute Myeloid Leukemia. Clin Lymphoma Myel Leuk. 2020;20(5):277–88. doi: 10.1016/j. clml.2020.01.011.

**4.** Levine RL. Molecular pathogenesis of AML: translating insights to the clinic. Best Pract Res Clin Haematol. 2013;26(3):245–8. doi: 10.1016/j.beha.2013.10.003.

**5.** Mitra A, Mishra L, Li S. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. Trends Biotechnol. 2013;31(6):347–54. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.03.006.

6. Bruserud O, Gjertsen BT, Foss B, et al. New strategies in the treatment of acute myelogenous leukemia (AML): In vitro culture of AML cells—The present

use in experimental studies and the possible importance for future therapeutic approaches. Stem Cells. 2001;19(1):1–11. doi: 10.1634/stemcells.19-1-1.

**7.** Ryningen A, Stapnes C, Bruserud O. Clonogenic acute myelogenous leukemia cells are heterogeneous with regard to regulation of differentiation and effect of epigenetic pharmacological targeting. Leuk Res. 2007;31(9):1303–13. doi: 10.1016/j.leukres.2007.01.019.

 Непомнящих Т.С., Гаврилова Е.В., Максютов Р.А. Некоторые аспекты использования алло- и ксенографтных моделей при разработке противораковых вакцин и онколитических вирусов. Медицинская иммунология. 2019;21(2):221–30. doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-221-230.

[Nepomnyashchikh TS, Gavrilova EV, Maksyutov RA. Selected aspects of allo- and xenograft model applications for developing novel anti-cancer vaccines and oncolytic viruses. Medical Immunology (Russia). 2019;21(2):221–30. doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-221-230. (In Russ)]

**9.** Shan WL, Ma XL. How to establish acute myeloid leukemia xenograft models using immunodeficient mice. Asian Pacif J Cancer Prev. 2013;14(12):7057–63. doi: 10.7314/apjcp.2013.14.12.7057.

**10.** Mambet C, Chivu-Economescu M, Matei L, et al. Murine models based on acute myeloid leukemia-initiating stem cells xenografting. World J Stem Cells. 2018;10(6):57–65. doi: 10.4252/wjsc.v10.i6.57.

**11.** Wunderlich M, Mizukawa B, Chou FS, et al. AML cells are differentially sensitive to chemotherapy treatment in a human xenograft model. Blood. 2013;121(12):e90–e97. doi: 10.1182/blood-2012-10-464677.

**12.** Saland E, Boutzen H, Castellano R, et al. A robust and rapid xenograft model to assess efficacy of chemotherapeutic agents for human acute myeloid leukemia. Blood Cancer J. 2015;5(3):e297. doi: 10.1038/bcj.2015.19.

**13.** Her Z, Yong KSM, Paramasivam K, et al. An improved pre-clinical patient-derived liquid xenograft mouse model for acute myeloid leukemia. J Hematol Oncol. 2017;10(1):162. doi: 10.1186/s13045-017-0532-x.

**14.** Johanna I, Straetemans T, Heijhuurs S, et al. Evaluating in vivo efficacy – toxicity profile of TEG001 in humanized mice xenografts against primary human AML disease and healthy hematopoietic cells. J Immunother Cancer. 2019;7(1):69. doi: 10.1186/s40425-019-0558-4.

**15.** Ruzicka M, Koenig LM, Formisano S, et al. RIG-I-based immunotherapy enhances survival in preclinical AML models and sensitizes AML cells to checkpoint blockade. Leukemia. 2020;34(4):1017–26. doi: 10.1038/s41375-019-0639-x.

**16.** Wunderlich M, Chou F-S, Link KA, et al. AML xenograft efficiency is significantly improved in NOD/SCID-IL2RG mice constitutively expressing human SCF, GM-CSF and IL-3. Leukemia. 2010;24(10):1785–8. doi: 10.1038/leu.2010.158.

**17.** Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, Greiner DL. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. Nat Rev Immunol. 2012;12(11):786–98. doi: 10.1038/nri3311.

**18.** Theocharides AP, Rongvaux A, Fritsch K, et al. Humanized hemato-lymphoid system mice. Haematologica. 2016;101(1):5–19. doi: 10.3324/ haematol.2014.115212.

**19.** Nara N, Miyamoto T. Direct and serial transplantation of human acute myeloid leukaemia into nude mice. Br J Cancer. 1982;45(5):778–82. doi: 10.1038/ bjc.1982.120.

**20.** Okada S, Vaeteewoottacharn K, Kariya R. Application of Highly Immunocompromised Mice for the Establishment of Patient-Derived Xenograft (PDX) Models. Cells. 2019;8(8):889. doi: 10.3390/cells8080889.

**21.** Sanchez PV, Perry RL, Sarry JE, et al. A robust xenotransplantation model for acute myeloid leukemia. Leukemia. 2009;23(11):2109–17. doi: 10.1038/ leu.2009.143.

**22.** Krevvata M, Shan X, Zhou C, et al. Cytokines increase engraftment of human acute myeloid leukemia cells in immunocompromised mice but not engraftment of human myelodysplastic syndrome cells. Haematologica. 2018;103(6):959–71. doi: 10.3324/haematol.2017.183202.

**23.** Billerbeck E, Barry WT, Mu K, et al. Development of human CD4+FoxP3+ regulatory T cells in human stem cell factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, and interleukin-3-expressing NOD-SCID IL2Ry(null) humanized mice. Blood. 2011;117(11):3076–86. doi: 10.1182/blood-2010-08-301507.

**24.** Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood. 2017;129(4):424–47. doi: 10.1182/blood-2016-08-733196.

**25.** Osman J, Murad AM, Chin SF, et al. Highly Sensitive and Reliable Human Sex Determination Using Multiplex PCR. Asia Pacif J Mol Med. 2014;4:1–4.

**26.** Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. Nat Rev Immunol. 2007;7(2):118–30. doi: 10.1038/nri2017.

**27.** Voin V, Khalid S, Shrager S, et al. Neuroleukemiosis: Two Case Reports. Cureus. 2017;9(7):e1529. doi: 10.7759/cureus.1529.

 Almosailleakh M, Schwaller J. Murine Models of Acute Myeloid Leukaemia. Int J Mol Sci. 2019;20(2):453. doi: 10.3390/ijms20020453.

**29.** Agliano A, Martin-Padura I, Mancuso P, et al. Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains. Int J Cancer. 2008;123(9):2222–7. doi: 10.1002/ijc.23772.

**30.** Terpstra W, Prins A, Visser T, et al. Conditions for engraftment of human acute myeloid leukemia (AML) in SCID mice. Leukemia. 1995;9(9):1573–7.

**31.** Lumkul R, Gorin N, Malehorn M, et al. Human AML cells in NOD/SCID mice: engraftment potential and gene expression. Leukemia. 2002;16(9):1818–26. doi: 10.1038/sj.leu.2402632.

**32.** Martin-Padura I, Agliano A, Marighetti P, et al. Sex-related efficiency in NSG mouse engraftment. Blood. 2010;116(14):2616–7. doi: 10.1182/blood-2010-07-295584.

**33.** Woiterski J, Ebinger M, Witte KE, et al. Engraftment of low numbers of pediatric acute lymphoid and myeloid leukemias into NOD/SCID/IL2Rcγnull mice reflects individual leukemogenecity and highly correlates with clinical outcome. Int J Cancer. 2013;133(7):1547–56. doi: 10.1002/ijc.28170.

**34.** Ailles LE, Gerhard B, Kawagoe H, Hogge DE. Growth characteristics of acute myelogenous leukemia progenitors that initiate malignant hematopoiesis in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. Blood. 1999;94(5):1761–72. doi: 10.1182/blood.V94.5.1761.

**35.** Pearce DJ, Taussig D, Zibara K, et al. AML engraftment in the NOD/SCID assay reflects the outcome of AML: implications for our understanding of the

heterogeneity of AML. Blood. 2006;107(3):1166-73. doi: 10.1182/blood-2005-06-2325.

**36.** Monaco G, Konopleva M, Munsell M, et al. Engraftment of acute myeloid leukemia in NOD/SCID mice is independent of CXCR4 and predicts poor patient survival. Stem Cells. 2004;22(2):188–201. doi: 10.1634/stemcells.22-2-188.

**37.** Rombouts WJ, Martens AC, Ploemacher RE. Identification of variables determining the engraftment potential of human acute myeloid leukemia in the immunodeficient NOD/SCID human chimera model. Leukemia. 2000;14(5):889–97. doi: 10.1038/sj.leu.2401777.

**38.** Culen M, Kosarova Z, Jeziskova I, et al. The influence of mutational status and biological characteristics of acute myeloid leukemia on xenotransplantation outcomes in NOD SCID gamma mice. J Cancer Res Clin Oncol. 2018;144(7):1239–51. doi: 10.1007/s00432-018-2652-2.