

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Ανασκόπηση των εφαρμογών των μοντέλων ποντικών στην έρευνα του καρκίνου

Η γενετική ετερογένεια του καρκίνου και οι πολυάριθμες διεργασίες που εμπλέκονται στην εμφάνιση και στην εξέλιξή του έχουν καταστήσει επιτακτική την ανάγκη ανάπτυξης καινοτόμων μεθόδων για τη μελέτη του, οι οποίες στοχεύουν στην εύρεση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Οι εξελίξεις που έχουν λάβει χώρα στο πεδίο της Γενετικής Μηχανικής τις τελευταίες δεκαετίες έχουν επιτρέψει την ανάπτυξη διαφόρων πρότυπων οργανισμών (μοντέλων) που χρησιμοποιούνται στη μελέτη της βιολογίας του καρκίνου. Τέτοια πρότυπα ζωικά συστήματα αποτελούν κοινά εργαλεία για τη μοντελοποίηση και τη μελέτη των όγκων *in vivo*. Η δυνατότητα δημιουργίας ποντικών, οι οποίοι προσομοιάζουν τη γενετική των ανθρώπινων ασθενειών, μπορεί να βοηθήσει στην ταυτοποίηση εκείνων των ασθενών που θα επωφεληθούν περισσότερο από μια συγκεκριμένη θεραπευτική αγωγή σε σύγκριση με άλλους οι οποίοι αποτυγχάνουν να ανταποκριθούν αποτελεσματικά. Συν-κλινικές δοκιμές μπορούν να διεξαχθούν παράλληλα με μελέτες σε ανθρώπους, κατά τις οποίες οι ποντικοί υπόκεινται στις ίδιες συνθήκες και στις θεραπευτικές τεχνικές και, με βάση τα αποτελέσματα των τελευταίων, εφαρμόζονται στη συνέχεια κατάλληλα στους ασθενείς. Τα ζωικά μοντέλα χρησιμοποιούνται επίσης ως πηγές ανάπτυξης και επέκτασης καρκινικών κυττάρων, τα οποία μπορεί να προέρχονται από ανθρώπινα μοσχεύματα ή από τη γενετική τροποποίηση των ίδιων των ζωικών μοντέλων. Ως εκ τούτου, βρίσκουν συχνή εφαρμογή σε κλινικές δοκιμές, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες που μπορούν να αξιοποιηθούν για τον εμπλουτισμό των κλασικών θεραπευτικών προσεγγίσεων και την ανίχνευση εξατομικευμένων θεραπειών με βάση τον κάθε ασθενή. Εναλλακτικά, χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση των περίπλοκων μηχανισμών και παραγόντων που εμπλέκονται στις διάφορες κακοήθεις διεργασίες, όπως η ογκογένεση και η μετάσταση. Η δυναμικότητα των εφαρμογών τους μπορεί επίσης να φανεί χρήσιμη στην ταυτοποίηση των γενετικών και μοριακών μηχανισμών που ευθύνονται για την ετερογένεια των αποκρίσεων ενός ασθενούς σε διαφορετικές θεραπευτικές προσεγγίσεις.

1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

1.1. Μοντέλα ξενομοσχευμάτων από ασθενείς

Έναν από τους πλέον κοινούς τύπους ζωικών μοντέλων με εφαρμογή στην έρευνα του καρκίνου αποτελούν τα μοντέλα ξενομοσχευμάτων, στα οποία λαμβάνει χώρα η εμφύτευση όγκων σε ποντικούς. Συγκεκριμένα, θα εστιάσουμε στα προερχόμενα από ασθενείς μοντέλα ξενομοσχευμάτων (patient-derived xenograft, PDX), στα οποία λαμβάνει χώρα η εμφύτευση όγκων του ανθρώπου σε ποντικούς με εξανθρωπισμένο ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτοί οι ποντικοί αποτελούν πρότυπους οργανισμούς οι οποίοι προσομοιάζουν τις συγκεκριμένες χαρακτηρι-

στικές ιδιότητες του μικροπεριβάλλοντος του όγκου του ασθενούς, γεγονός που τους καθιστά κατάλληλα εργαλεία μελέτης των καρκίνων του ανθρώπου. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ένα τέτοιο μοντέλο δημιουργείται με την εμφύτευση καρκινικών κυττάρων ή ιστών ενός ασθενούς σε ποντικό ο οποίος φέρει συστατικά του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος. Συνεπώς, τα μοντέλα PDX διατηρούν ως επί το πλείστον τα κύρια ιστολογικά, μοριακά και γενετικά χαρακτηριστικά του όγκου του ασθενούς-δότη, ενώ παραμένουν βιολογικά σταθερά. Με αυτόν τον τρόπο, η ετερογένεια των ανθρώπινων όγκων «μεταφράζεται» στα μοντέλα των ποντικών. Τελικά, είναι εμφανές ότι αποτελούν πολύτιμα εργαλεία μελέτης των όγκων του ανθρώπου *in*

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2021, 38(2):166-176
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2021, 38(2):166-176

Ε.Π. Κοκκινογένης,
Μ. Δελή,
Σ. Παπακωστοπούλου,
Μ. Κότσαρη,
Π. Ζουμπουρλής,
Μ. Γουλιελμάκη,
Β. Ζουμπουρλής

Μονάδα Βιοϊατρικών Εφαρμογών,
Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό
Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα

Review of the applications of
mouse models in cancer research

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρητηρίου

Βασική έρευνα
Γενετικά τροποποιημένα
μοντέλα ποντικών
Καρκίνος
Ξενομοσχεύματα
Προκλινική έρευνα

Υποβλήθηκε 17.9.2020
Εγκρίθηκε 26.9.2020

vivo και έχουν αποδειχθεί χρήσιμα εργαλεία πρόγνωσης των κλινικών αποτελεσμάτων. Συνεπώς, χρησιμοποιούνται για την προκλινική αξιολόγηση φαρμάκων, την ανάδειξη βιοδεικτών, τις βιολογικές μελέτες και τον σχεδιασμό στρατηγικών εξατομικευμένης Ιατρικής.¹

1.2. Γενετικά τροποποιημένα μοντέλα ποντικών

Η ανάπτυξη του κλάδου της Γενετικής Μηχανικής οδήγησε στην ανάπτυξη μιας νέας κατηγορίας διαγονιδιακών μοντέλων ποντικών. Αυτά τα νεότερα μοντέλα μελέτης του καρκίνου περιλαμβάνουν γενετικά τροποποιημένους ποντικούς στους οποίους μπορούν να διερευνηθούν οι δράσεις και οι λειτουργίες των σχετιζόμενων ογκογονιδίων. Τα γενετικά τροποποιημένα μοντέλα ποντικών (genetically engineered mouse models, GEMMs) χρησιμοποιούνται, όπως και τα μοντέλα μοσχευμάτων, για την *in vivo* μελέτη θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Τα GEMMs έχουν παράσχει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τους κυτταρικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην καρκινική ανάπτυξη και έχουν συμβάλει στην εξακρίβωση της λειτουργίας πολλών γονιδίων που συμμετέχουν στη φυσιολογική ανάπτυξη και στην ομοιόσταση ενός οργανισμού. Παρ' όλα αυτά, η δυνατότητα δημιουργίας μοντέλων που θα αναπαριστούν πλήρως τις νόσους του ανθρώπου θα μπορούσε να διευκολυνθεί μέσω της ανάπτυξης τεχνικών ανάλυσης του γονιδιώματος. Έρευνες στις οποίες χρησιμοποιούνται GEMMs για τη μελέτη συγκεκριμένων ογκογονιδίων έχουν ήδη δώσει σημαντικές πληροφορίες για τις κυτταρικές διεργασίες που εμπλέκονται στην εν λόγω νόσο. Τα συγκεκριμένα μοντέλα παρέχουν στους ερευνητές τη δυνατότητα κατανόησης της φυσιολογικής δράσης διαφόρων πρωτεϊνών και μελέτης διακριτών σηματοδοτικών μονοπατιών, καθώς και των δυσλειτουργιών που παρουσιάζουν αυτά κατά την εξέλιξη των καρκινικών όγκων. Τα GEMMs συνιστούν ένα «ταχύ» και αξιόπιστο εργαλείο εκτίμησης διαφόρων θεραπειών για συγκεκριμένους υποπληθυσμούς ασθενών. Ο διαχωρισμός των ασθενών βάσει της γενετικής τους ετερογένειας είναι αναγκαίος για τη βελτίωση των υφιστάμενων θεραπευτικών μεθόδων και για την ανάπτυξη νέων. Οι δοκιμές σε ποντικούς πρέπει να διενεργούνται παράλληλα με τις κλινικές δοκιμές, ώστε να ταυτοποιείται η ευαισθησία των GEMMs στις διάφορες πιθανές θεραπείες. Στην περίπτωση χορήγησης φαρμάκων απαραίτητη προϋπόθεση συνιστά η εφαρμογή της σωστής αναλογίας των δόσεων που χορηγούνται στους ασθενείς και στους ποντικούς.^{2,3}

Γενικότερα, η ανάπτυξη *in vivo* μοντέλων με στόχο τη μελέτη των ιστολογικών παραγόντων στα μοντέλα PDX ή των γενετικών παραγόντων στα GEMMs, οι οποίοι διαμε-

σολαβούν στον καρκίνο, θα διευκολύνει την ανεύρεση των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων κατά τον αρχικό σχηματισμό του όγκου, κατά τη μετάσταση και κατά την εξέλιξή του, ενώ θα παράσχει πληροφορίες σχετικά με την απόκρισή του σε θεραπείες. Η απόκριση στην εκάστοτε θεραπεία διαφέρει ανάλογα με τη γενετική βάση της ασθένειας. Η χρήση των αντίστοιχων ποντικών σε προ-κλινικές δοκιμές επηρεάζει τον τρόπο σχηματισμού του όγκου και την απόκρισή του σε θεραπευτικές αγωγές. Η αναπαράσταση της νόσου σε ζωικά μοντέλα καθιστά δυνατή τη δοκιμή διαφόρων θεραπευτικών παραγόντων και την επιλογή των αποτελεσματικότερων από αυτούς.

1.3. Σύγκριση των δύο μοντέλων

Για τη μοντελοποίηση και τη μελέτη των όγκων του ανθρώπου βρίσκουν ευρεία εφαρμογή τόσο τα μοντέλα PDX όσο και τα GEMMs, ανάλογα με το είδος της έρευνας που λαμβάνει χώρα κάθε φορά. Μάλιστα, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του ασθενούς, αποτελεί συνήθη πρακτική να χρησιμοποιούνται και παράλληλα, ώστε να μεγιστοποιείται η αποτελεσματικότητα της μελέτης για την κατανόηση των μηχανισμών του καρκίνου. Φυσικά, καθώς κανένα από τα μοντέλα δεν συνιστά απόλυτα ακριβές ομοίωμα του ανθρώπινου ανοσοβιολογικού περιβάλλοντος με το οποίο αλληλεπιδρούν οι διάφοροι όγκοι, η χρήση αυτών περιορίζεται λόγω των αντίστοιχων χαρακτηριστικών τους και σχεδόν πάντα λαμβάνουν χώρα παράλληλα και εναλλακτικές τεχνικές μελέτης. Ωστόσο, το γεγονός αυτό δεν ελαττώνει καθόλου τη χρησιμότητα των εν λόγω δύο μοντέλων. Διάφορες τεχνικές απεικόνισης, όπως η αξονική τομογραφία (computed tomography, CT), διευκολύνουν τους ερευνητές στην εκτίμηση του τρόπου με τον οποίο αναπτύσσονται οι όγκοι, καθώς και της απόκρισής τους σε διάφορες θεραπείες συναρτήσει του χρόνου. Όσον αφορά στη χρήση τους σε συν-κλινικές δοκιμασίες, τα δύο αυτά μοντέλα χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

Από τη μια πλευρά, η χρήση των GEMMs προάγει την εξέλιξη και την ανάπτυξη της νόσου σε ποντικούς με φυσιολογικό ανοσοποιητικό σύστημα (ανοσοεπαρκή) και μπορεί να δώσει μια προκλινική εικόνα της νόσου στο περιβάλλον αυτό. Επιπλέον, ως *in vivo* μοντέλα, μπορούν να ενσωματώσουν αποτελεσματικά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος και του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, για την απόκτηση μιας ολοκληρωμένης εικόνας της σχέσης των δύο. Οι συγκεκριμένοι ποντικοί μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της επίδρασης φαρμάκων και θεραπευτικών σχημάτων στην εξέλιξη του καρκίνου. Γενικά, τα GEMMs συνιστούν ένα αποτελεσματικό

εργαλείο για τη διερεύνηση της γενετικής συνιστώσας της καρκινογένεσης και της μετάστασης.

Ωστόσο, υπάρχουν και ορισμένοι περιορισμοί που αποτρέπουν την καθολική εφαρμογή των GEMMs. Αρχικά, η γενετική τροποποίηση, η ανάπτυξη και οι διάφοροι θεραπευτικοί έλεγχοι που πρέπει να λάβουν χώρα για την ορθή δημιουργία του μοντέλου αποτελούν μια εξαιρετικά χρονοβόρα και υψηλού κόστους διαδικασία. Επιπλέον, με τη χρήση των GEMMs, η δυνατότητα μοντελοποίησης των γενετικών αλλαγών που παρατηρούνται στους ανθρώπους καθίσταται δύσκολη, καθώς η ετερογένεια η οποία παρατηρείται δεν συμπίπτει ακριβώς με αυτή που συναντάται στους καρκίνους του ανθρώπου, δυσχεραίνοντας έτσι τη μελέτη της νόσου. Επίσης, τα GEMMs αδυνατούν να περιγράψουν συνήθως όλα τα στάδια ανάπτυξης της νόσου, όπως τη μετάσταση και άλλες καταστάσεις που παρατηρούνται στον ανθρώπινο οργανισμό. Αυτό μπορεί να οφείλεται στις διαφορές μεταξύ του οργανισμού του ποντικού και του ασθενούς. Αν και τα GEMMs διατηρούν το ανοσοποιητικό τους σύστημα, οι διάφορες αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν μπορεί να διαφέρουν από τις αντίστοιχες στον άνθρωπο λόγω ενδογενών αποκλίσεων μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος των δύο οργανισμών.^{2,4-6}

Από την άλλη πλευρά, η περίπλοκη γενετική σύσταση των όγκων του ανθρώπου είναι ευκολότερα προσεγγίσιμη για μελέτη με τη χρήση των μοντέλων PDX έναντι των GEMMs. Τα μοντέλα PDX προσφέρουν την ικανότητα επέκτασης του όγκου του ασθενούς, γεγονός που καθιστά δυνατή την ανάδειξη νέων παραγόντων που διευκολύνουν την αναγνώριση κατάλληλων θεραπειών. Κατά τη διάρκεια της επέκτασης με τη χρήση των μοντέλων PDX, ο πρωτογενής όγκος συνεχίζει να διατηρεί τα παθολογικά και τα μοριακά χαρακτηριστικά του. Οι συγκεκριμένοι ποντικοί είναι ανοσοανεπαρκείς, αλλά εξανθρωπίζονται με την εισαγωγή συστατικών του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου. Συνεπώς, μπορούν να αποδίδουν μια ακριβέστερη εικόνα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του όγκου και των ανοσολογικών μηχανισμών.

Ωστόσο, και η χρήση των μοντέλων PDX περιλαμβάνει ορισμένα εμπόδια. Για την ακριβέστερη προσομοίωση του μικροπεριβάλλοντος του καρκίνου είναι απαραίτητη η ορθοτοπική μεταμόσχευση του όγκου. Όπου όμως αυτό δεν είναι εφικτό, οι όγκοι μεταμοσχεύονται υποδόρια με αποτέλεσμα την ελλιπή προσομοίωση του μικροπεριβάλλοντος και των στρωματικών αλληλεπιδράσεων που δρουν στον ασθενή. Επιπλέον, ακόμη και αν οι ποντικοί εξανθρωπιστούν, οι τρόποι με τους οποίους επιτυγχάνεται αυτό μπορεί να προκαλέσουν θανάσιμες επιπλοκές για τα ζώα. Αντίθετα, αν οι ποντικοί δεν εξανθρωπιστούν και έχουν

ανεπαρκές ανοσοποιητικό σύστημα, δεν θα είναι δυνατή η αξιολόγηση της ανοσολογικής λειτουργίας σε αυτά τα μοντέλα. Αλλά ακόμη και εάν η μεταμόσχευση των όγκων συμβεί ορθοτοπικά, μπορεί να υπάρξουν αντιδράσεις μεταξύ ιστολογικών προσδετών (ligands) των ποντικών και των αντίστοιχων υποδοχέων τους στον άνθρωπο, αποτρέποντας έτσι την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Τέλος, ομοίως με τα γενετικά τροποποιημένα μοντέλα, τα μοντέλα μοσχευμάτων χρειάζονται και αυτά μεγάλα χρονικά διαστήματα για να αναπτυχθούν και συνεπώς μπορεί να μην είναι άμεσα εφαρμόσιμα σε κάποιες περιπτώσεις.⁷⁻¹²

2. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΞΕΝΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα PDX μπορούν να προσομοιάσουν με μεγάλη ακρίβεια το εσωτερικό μικροπεριβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται ο όγκος. Συνήθως, χρησιμοποιούνται ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές ως το κύριο εργαλείο για την προκλινική αξιολόγηση νέων παραγόντων και συνδυαστικών πρωτοκόλλων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανές θεραπείες κατά των διαφόρων τύπων καρκίνου. Αυτό γίνεται εφικτό μέσω του συνδυασμού *in vitro* μελετών που χρησιμοποιούν τέτοιες κυτταρικές σειρές, με *in vivo* μελέτες οι οποίες χρησιμοποιούν ξενομοσχεύματα όγκων. Γενικά, το ανοσοποιητικό σύστημα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την εξέλιξη του καρκίνου, οπότε η μέθοδος των ξενομοσχευμάτων μπορεί να παρουσιάσει πολλές αδυναμίες λόγω της χρήσης ανοσοκατεσταλμένων ποντικών. Ακόμη, πολλές φορές η επέκταση και η γενετική τροποποίηση πρωτογενών καρκινικών κυττάρων *in vitro* είναι αδύνατον να λάβουν χώρα, οπότε στις εν λόγω περιπτώσεις είναι απαραίτητο να καταφύγουμε στη χρήση κατάλληλων μοντέλων. Σε μια τέτοια περίπτωση, για παράδειγμα, είναι δυνατή η *in vivo* στόχευση των καρκινικών κυττάρων λαμβάνοντας υπ' όψη τις ιδιότητες των ειδικών μοριακών δεικτών.

Με αυτόν τον τρόπο αποκτάται μια πηγή διαφορετικών καρκινικών κυττάρων, τα οποία μπορούν να καλλιεργηθούν και να τροποποιηθούν *ex vivo* και να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της απόδοσης των αντικαρκινικών φαρμάκων. Πιθανά φάρμακα ή συνδυασμοί φαρμάκων μπορούν να εφαρμοστούν και να αξιολογηθούν περαιτέρω μέσω της αρχικής εφαρμογής τους στους ποντικούς, πριν δοκιμασθούν άμεσα στον ασθενή. Συνεπώς, τα ζωικά μοντέλα συνιστούν ένα αποτελεσματικό εργαλείο για τον προκλινικό έλεγχο φαρμάκων και θεραπειών. Είναι κοινώς γνωστό ότι υπάρχει μια πληθώρα πιθανών θεραπευτικών πρωτοκόλλων που είναι διαθέσιμα για άτομα τα οποία πάσχουν από καρκίνο.

Με τη βοήθεια των PDX μπορούν να καθοριστούν οι κατάλληλότερες θεραπείες, με βάση την επίδραση που έχουν τα διάφορα θεραπευτικά πρωτόκολλα πάνω σε αυτά, και ανάλογα με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του όγκου κάθε ασθενούς. Οι υπό μελέτη θεραπευτικές αγωγές μπορούν να εφαρμοστούν απ' ευθείας στους ίδιους τους οργανισμούς-μοντέλα ή σε καρκινικά κύτταρά τους που απομονώνονται από αυτούς. Στην εικόνα 1 παρουσιάζεται μια περίληψη των βασικών βημάτων για την εγκαθίδρυση των μοντέλων και τις σχετικές έρευνες που μπορούν να λάβουν χώρα στο πλαίσιο της μελέτης της βιολογίας του καρκίνου. Συμπερασματικά, οι οργανισμοί-μοντέλα και ακόμη περισσότερο τα PDX αποτελούν μια πηγή άντλησης πληροφοριών σχετικά με τα χαρακτηριστικά και την αντιμετώπιση του καρκίνου του ανθρώπου.^{1,8,9,13}

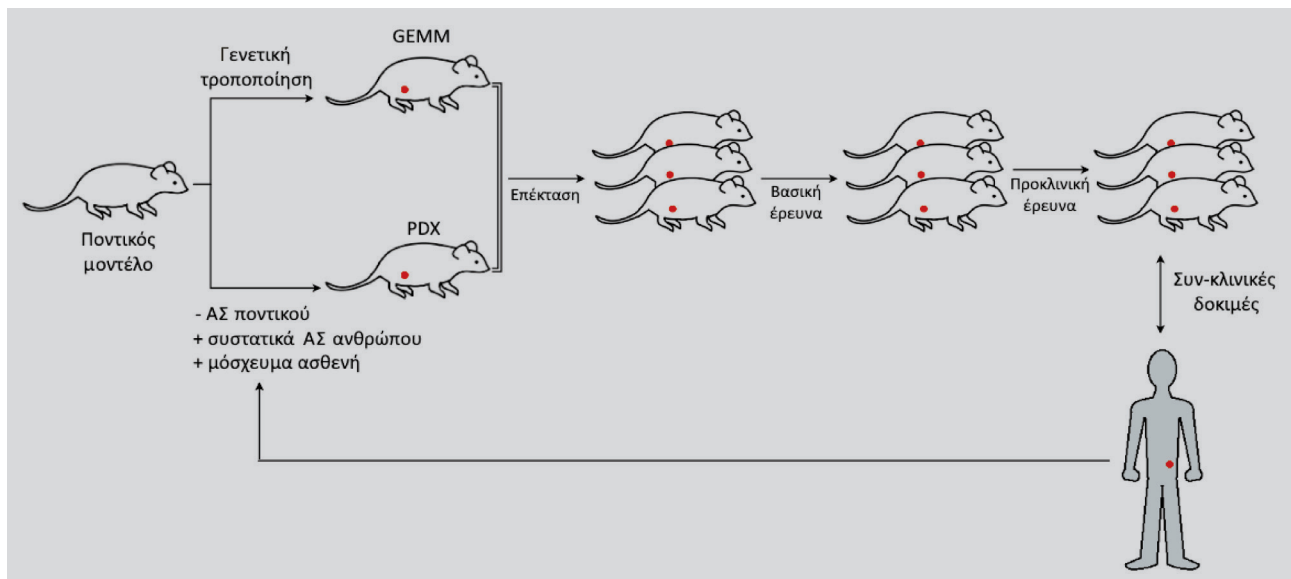
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

3.1. Ανάπτυξη μοντέλων ξενομοσχευμάτων

Για την ορθή ανάπτυξη και μελέτη των ανθρώπινων όγκων σε ποντικούς είναι απαραίτητη η προσομοίωση του μικροπεριβάλλοντος από το οποίο προέρχεται ο ανθρώπι-

νος όγκος αλλά και των σχετικών αλληλεπιδράσεων με το ανοσοποιητικό σύστημα. Καθώς τα μοντέλα PDX βασίζονται στη χρήση ποντικών με ανοσοανεπάρκεια, των οποίων το ανοσοποιητικό σύστημα εξανθρωπίζεται, βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή σε μελέτες όπου είναι σημαντική η εξέταση της σχέσης όγκου-ανοσοκυττάρων. Εναλλακτικά, μοντέλα όπως τα GEMMs, που διατηρούν τα φυσιολογικά ανοσοποιητικά συστήματα των ποντικών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν συμπληρωματικά.

Απαραίτητο αρχικό στάδιο για τον σχηματισμό μοντέλων PDX που εξαρτώνται από το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα είναι η δημιουργία των εξανθρωπισμένων ποντικών. Αυτό είναι εφικτό με τη μεταμόσχευση συστατικών του ανοσοποιητικού συστήματος σε γενετικά τροποποιημένους ανοσοανεπαρκείς ποντικούς. Οι εξανθρωπισμένοι ποντικοί καθιστούν δυνατή τη μελέτη των ανοσοποιητικών μηχανισμών του ανθρώπου *in vivo*, χωρίς τη διαμεσολάβηση των ανθρώπινων ξενιστών. Ως αποτέλεσμα, στα μοντέλα PDX τέτοιων εξανθρωπισμένων ποντικών παρουσιάζεται μια αύξηση στην ιστολογική σταθερότητα των καρκινικών μοσχευμάτων, εφόσον διατηρούνται οι φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των όγκων και του ανοσοποιητικού συστήματος. Για τη μέγιστη ακρίβεια τέτοιου είδους μελετών είναι



Εικόνα 1. Ανάπτυξη και χρήση μοντέλων ξενομοσχευμάτων (patient-derived xenograft, PDX) και γενετικά τροποποιημένων μοντέλων ποντικών (genetically engineered mouse models, GEMMs). Για την απόκτηση μοντέλων, όπως τα μοντέλα PDX ή GEMMs, μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατάλληλοι ποντικοί που φέρουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Στην περίπτωση των μοντέλων PDX χρησιμοποιούνται ανοσοκατεσταλμένοι ποντικοί, οι οποίοι στη συνέχεια εξανθρωπίζονται με συστατικά του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος πριν λάβουν τελικά το ξενομόσχευμα από τον ασθενή. Όσον αφορά στα GEMMs, μπορούν να λάβουν χώρα διάφορες γενετικές τροποποιήσεις, όπως η εισαγωγή ή υπερέκφραση κάποιου ογκογονιδίου. Εφόσον σχηματιστεί το επιθυμητό μοντέλο, λαμβάνει χώρα αναπαραγωγή των οργανισμών ώστε να αποκτηθεί επαρκής αριθμός για τις σχετικές μελέτες. Κατά τη μελέτη ενός όγκου που αναπτύσσεται σε αυτά, αρχικά υποβάλλονται σε βασική έρευνα για την αποκάλυψη των σχετικών μηχανισμών. Έπειτα, μπορεί να υποβληθούν σε προκλινική έρευνα κατά την οποία δοκιμάζονται πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις. Παράλληλα με τις κλινικές δοκιμές σε ασθενείς, τα μοντέλα, και ιδιαίτερα τα μοντέλα PDX, μπορούν να υποβληθούν σε ταυτόχρονες συν-κλινικές δοκιμές για την ανεύρεση εξατομικευμένων και βελτιστοποιημένων θεραπειών για τον κάθε ασθενή. ΑΣ: Ανοσοποιητικό σύστημα.

απαραίτητο ο ερευνητής να επιλέξει τον κατάλληλο τύπο οργανισμού-μοντέλου. Μάλιστα, στην περίπτωση των PDX υπάρχει μια πληθώρα τύπων ποντικών με ανοσοανεπάρκεια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Η κύρια διαφορά των εν λόγω τύπων είναι ο βαθμός ανοσοανεπάρκειάς τους. Έχει αποδειχθεί ότι όσο μεγαλύτερη είναι η ανοσοανεπάρκεια ενός ποντικού τόσο αποτελεσματικότερη είναι η μελέτη των όγκων οι οποίοι πλήττονται από χαμηλές αποδόσεις μεταμόσχευσης.

Ωστόσο, η δημιουργία των μοντέλων PDX αντιμετωπίζει ορισμένα εμπόδια, τα οποία αφορούν στην ελαττωμένη βιωσιμότητα των οργανισμών, στη δυσκολία απόκτησης μεγάλου αριθμού οργανισμών, στο σχετικά μικρό ποσοστό επιτυχίας σχηματισμού του οργανισμού κ.ά. Το κυριότερο χαρακτηριστικό που καθορίζει την επιτυχία της μεταμόσχευσης είναι η βιωσιμότητα του ανθρώπινου όγκου. Για την επίτευξη αποδοτικότερης αύξησης, τα κύτταρα του πρωτογενούς όγκου αναμειγνύονται με ειδικές μεμβρανικές πρωτεΐνες ή άλλους κυτταρικούς τύπους πριν από τη μεταμόσχευση, ώστε να αποφευχθεί η απώλεια των χαρακτηριστικών τους. Κατά την αρχική διαδικασία ανάπτυξης μοντέλων PDX διαμεσολαβούν αρκετές διαδοχικές μεταμοσχεύσεις από ποντικό σε ποντικό. Αρχικά, λαμβάνει χώρα η φάση μεταμόσχευσης, κατά την οποία διαχωρίζονται καρκινικά κύτταρα από όγκους του ασθενούς και μεταμοσχεύονται στην πρώτη ομάδα ποντικών με ανοσοανεπάρκεια. Τα δείγματα των πρωτογενών όγκων από τον ασθενή μπορούν να εμφυτευτούν στους ανοσοανεπαρκείς ποντικούς με τη μορφή θραυσμάτων ή κυτταρικών εναιωρημάτων. Έπειτα, ακολουθεί η φάση επέκτασης των όγκων αυτών, όπου εμφυτεύονται ανεπτυγμένοι όγκοι από την πρώτη στη δεύτερη ομάδα ποντικών-δεκτών. Οι όγκοι της κάθε φάσης μπορούν είτε να διατηρηθούν στην κατάψυξη για μετέπειτα χρήση είτε να μεταμοσχευτούν σε περαιτέρω ποντικούς για ερευνητικούς σκοπούς. Ο τρόπος με τον οποίο χρησιμοποιούνται οι όγκοι στα περαιτέρω στάδια έρευνας εξαρτάται φυσικά από τον τύπο και τον σκοπό της συγκεκριμένης έρευνας.^{9,13,14}

Στην πραγματικότητα, ωστόσο, δεν διαδραματίζει ρόλο μόνο η μεταμόσχευση των καρκινικών κυττάρων στους ποντικούς αλλά και η ίδια η περιοχή στην οποία αυτή συμβαίνει. Τα κύτταρα μπορούν να μεταμοσχευτούν στον ποντικό-δέκτη σε αντίστοιχες (ορθοτοπική εμφύτευση) ή σε διαφορετικές θέσεις (ετεροτοπική εμφύτευση) από εκείνες απ' όπου προήλθαν από τον άνθρωπο-δότη. Συχνή εφαρμογή βρίσκει για παράδειγμα η υποδόρια ετεροτοπική μεταμόσχευση, σε περιπτώσεις που δεν είναι δυνατή η ορθοτοπική. Αλλά γενικά, και οι δύο τρόποι μεταμόσχευσης των καρκινικών κυττάρων βρίσκουν εφαρμογή λόγω των χαρακτηριστικών πλεονεκτημάτων τους. Η ετεροτοπική

εμφύτευση είναι γενικά απλούστερη, καθώς καθιστά τη μεταμόσχευση και την παρακολούθηση του όγκου με τεχνικές απεικόνισης πιο εύκολη. Αντίθετα, η ορθοτοπική εμφύτευση είναι τεχνικά περισσότερο δυσχερής και χρονοβόρα. Ωστόσο, το πλεονέκτημα της ορθοτοπικής έναντι της ετεροτοπικής εμφύτευσης είναι ότι προσομοιάζεται σε μεγαλύτερο βαθμό το εξωκυτταρικό περιβάλλον όπου βρίσκονται τα μεταμοσχευμένα καρκινικά κύτταρα και συνεπώς αντικατοπτρίζει καλύτερα τις φυσικές αλληλεπιδράσεις οι οποίες λαμβάνουν χώρα στο άμεσο μικροπεριβάλλον του ανθρώπινου όγκου. Επιπλέον, η ορθοτοπική μεταμόσχευση είναι αναγκαία όταν σκοπό μας αποτελεί η μελέτη μεταστάσεων, καθώς η εν λόγω τεχνική αυξάνει τη συχνότητα εμφάνισής τους κατά την ανάπτυξη του ξενομοσχεύματος.^{1,15,16}

Ακόμη, αρκετές φορές είναι αδύνατη η οποιαδήποτε μεταμόσχευση των καρκινικών κυττάρων σε ποντικούς. Για την αντιμετώπιση του σχετικού προβλήματος οι ερευνητές μπορούν να εκμεταλλευτούν την ιδιότητα του επαναπρογραμματισμού των καρκινικών κυττάρων προς επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (induced pluripotent stem cells, iPSCs). Τα iPSCs που λαμβάνονται, με τη σειρά τους, είναι ικανά να διαφοροποιηθούν προς τον αρχικό κυτταρικό τύπο προέλευσης του όγκου. Έτσι, για την ανάπτυξη μοντέλων PDX μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμη και βλαστικά κύτταρα που προήλθαν από τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα. Η εφαρμογή του ενδιάμεσου σταδίου iPSCs μπορεί επιπλέον να λάβει χώρα με σκοπό την *in vitro* γενετική τροποποίηση των κυττάρων πριν από τη μεταμόσχευσή τους. Από την άλλη πλευρά, μοντέλα όπως τα GEMMs που περιλαμβάνουν τη χρήση ποντικών με ανοσοανεπάρκεια χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των καρκινικών όγκων με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Επίσης, με τη βοήθεια τέτοιων μοντέλων διερευνώνται και οι γενετικοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στην καρκινογένεση, όπως για παράδειγμα η ανεξέλεγκτη δράση των ογκογονιδίων.¹⁷

3.2. Σχηματισμός γενετικά τροποποιημένων ποντικών

Για τη δημιουργία των γενετικά τροποποιημένων ζωικών μοντέλων μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολυάριθμοι τρόποι και τεχνικές για την επαγωγή της ογκογένεσης. Κατ' αρχάς, μπορεί να γίνει χρήση φορέων κλωνοποίησης, με κύριους πρωταγωνιστές τους ρετροϊούς, οι οποίοι μεταφέρουν ένα συγκεκριμένο διαγονίδιο που εισάγεται στο γονιδίωμα των κυττάρων-στόχων. Εναλλακτικά, μπορεί να γίνει επαγωγή μέσω της τροποποίησης αυτούσιων γενετικών στοιχείων του ίδιου του ποντικού. Όσον αφορά στα γονίδια του ίδιου του ποντικού, η ογκογένεση συχνά επάγεται μέσω

της μετατροπής πρωτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια, της υπερέκφρασης ογκογονιδίων, της καταστολής ογκοκατασταλτικών γονιδίων, της καταστολής ρυθμιστικών μηχανισμών του κυτταρικού κύκλου ή με συνδυασμό αυτών. Αντίθετα, κατά την εισαγωγή ενός διαγονιδίου, συχνά επιλέγονται ανθρώπινα γονίδια ώστε να προσομοιωθεί η γενετική βάση του καρκίνου στον άνθρωπο.^{18,19}

Στην περίπτωση χρήσης γονιδιακού φορέα, το γονίδιο του ανασυνδυασμένου φορέα, π.χ. ρετροϊού, ενσωματώνεται στο γονιδίωμα ενός ποντικού-δέκτη το οποίο θα φέρει πλέον το υπό εξέταση γονίδιο. Με αυτόν τον τρόπο μελετάται η δράση ενός συγκεκριμένου γονιδίου ως ογκογονίδιο και ερευνάται η επίδρασή του στην ανάπτυξη του όγκου. Η παραπάνω τεχνική, αν και θεωρητικά αποδοτική, δεν χρησιμοποιείται ευρέως, καθώς παρουσιάζει κάποιους σημαντικούς περιορισμούς. Τέτοιοι περιορισμοί αφορούν στην ικανότητα ενσωμάτωσης μικρού μεγέθους γονιδίων στον φορέα, ή στην τυχαιότητα της ενσωμάτωσης των γονιδίων στο γονιδίωμα του φορέα. Γ' αυτούς τους λόγους μπορεί να επηρεαστεί σε μεγάλο βαθμό η μεταγραφή των υπόλοιπων γονιδίων του, καθιστώντας τον φορέα αναποτελεσματικό.^{20,21}

Μια άλλη τεχνική περιλαμβάνει την εισαγωγή του επιθυμητού τμήματος DNA στον πυρήνα του σπερματοζωαρίου, ο οποίος βρίσκεται στο ωκύτταρο κατά τη διαδικασία της γονιμοποίησης του τελευταίου. Τα τροποποιημένα ωκύτταρα που φέρουν το γονίδιο καλλιεργούνται στη συνέχεια *in vitro* και εισάγονται στις μήτρες θηλυκών ποντικών για την κυοφορία τους. Το διαγονίδιο μπορεί να δρα ως ογκογονίδιο, ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο ή να μην έχει κάποια σημαντική επίδραση στην ογκογένεση. Ωστόσο, υπάρχει σοβαρός κίνδυνος είτε το διαγονίδιο να εισέλθει σε κάποια αμετάφραστη περιοχή του γονιδιώματος είτε να επηρεάσει ρυθμιστικά στοιχεία οδηγώντας ενδεχομένως σε τυχαία μεταλλαξιγένεση με απρόοπτες συνέπειες.²²

Μια ακόμη μέθοδο συνιστά η «γονιδιακή προσέγγιση διαγονιδίου», κατά την οποία το υπό μελέτη γενετικό υλικό εισάγεται σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (embryonic stem cells, ESCs), που τοποθετούνται στην εσωτερική κυτταρική μάζα βλαστοκύστης ποντικών και μεταφέρονται σε άλλους ποντικούς. Αυτή η διαδικασία έχει ως χαρακτηριστικό αποτέλεσμα τη δημιουργία χιμαιρικών οργανισμών που φέρουν το εισαγόμενο τμήμα DNA σε μερικά από τα κύτταρά τους. Οι εν λόγω χιμαιρικοί ποντικοί έπειτα διασταυρώνονται με ποντικούς άγριου τύπου, ώστε να ανιχνευτεί αν έχει πραγματοποιηθεί η μεταβίβαση του διαγονιδίου στους απογόνους τους. Σε επόμενο στάδιο λαμβάνει χώρα η διασταύρωση των χιμαιρικών ποντικών μεταξύ τους ώστε να προκύψουν απόγονοι που φέρουν το ξένο DNA στο σύνολο του γονιδιώματός τους, προκειμένου, τελικά, να μελετηθεί

ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζει η συγκεκριμένη γενετική τροποποίηση τον οργανισμό.^{18,23}

4. ΜΟΝΤΕΛΑ ΞΕΝΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

4.1. Βασική έρευνα με βάση τα μοντέλα ξενομοσχευμάτων

Η βασική έρευνα του καρκίνου έχει ως σκοπό τη διερεύνηση των μηχανισμών που συμμετέχουν, για τη βελτίωση της κατανόησης, της πρόληψης και της αντιμετώπισής του. Τα γενετικά τροποποιημένα μοντέλα και τα μοντέλα PDX ουσιαστικά παρέχουν σημαντικές πληροφορίες που συνδράμουν στις διάφορες μελέτες του καρκίνου. Συγκεκριμένα, τα μοντέλα PDX αποτελούν ιδανικά εργαλεία στη μελέτη των ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων και των σχετικών μηχανισμών τους. Το εν λόγω γεγονός οφείλεται στη χαρακτηριστική ιδιότητα που κατέχουν αυτά στο να μιμούνται με ακρίβεια τους καρκίνους του ανθρώπου, επιτρέποντάς τους έτσι να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό των ειδικών χαρακτηριστικών που καθορίζουν τους διάφορους τύπους πληθυσμών των καρκινικών κυττάρων. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα χρήσης των μοντέλων PDX στην έρευνα είναι η ανάδειξη της επίδρασης που έχουν οι διάφοροι τύποι καρκινικών κυττάρων στη δομή και στη μορφολογία του συνολικού πληθυσμού. Από τη μελέτη της συγκεκριμένης επίδρασης προκύπτει ότι, ανάλογα με το είδος του καρκινικού κλώνου, τα κύτταρα εμφυτεύονται με διαφορετικά ποσοστά επιτυχίας. Επίσης, φαίνεται ότι σε αυτούς τους εμφυτευμένους όγκους κυριαρχεί ένας συγκεκριμένος υποκλώνος λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του. Συνήθως, η ανάπτυξη ενός όγκου καθορίζεται από την αλληλεπίδραση των διαφόρων υποκλωνικών πληθυσμών μεταξύ τους, αλλά και με τους εξωγενείς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ωστόσο, πολλές φορές στην προαγωγή του όγκου μπορεί να συμμετέχει μόνο ένας κυτταρικός υποπληθυσμός που λόγω των χαρακτηριστικών του ενισχύει και άλλους παρακείμενους υποπληθυσμούς. Παρουσιάζει επίσης ενδιαφέρον το γεγονός ότι ένας τέτοιος υποπληθυσμός ενδέχεται να αποτελέσει ακόμη και την αιτία κατάρρευσης του όγκου, καθώς ταχύτερα πολλαπλασιαζόμενοι υποπληθυσμοί ανταγωνίζονται για πόρους και χώρο, προκαλώντας έτσι τον παράδοξο περιορισμό των κυττάρων που τους υποστηρίζουν.^{8,24}

Αν και τις τελευταίες δεκαετίες οι εξελίξεις στις τεχνολογίες των γονιδιωματικών αλληλουχίσεων έχουν αποκαλύψει εκατομμύρια μεταλλαγές σε καρκίνους, δεν έχουν εξακριβωθεί ακόμη οι λειτουργικές επιπτώσεις που μπορεί να έχουν στα κύτταρα και στους οργανισμούς. Μέσω των μελετών οι οποίες διενεργούνται σε διάφορα μοντέλα,

είναι δυνατή η αναγνώριση σημαντικών μεταλλάξεων που μεσολαβούν στους μηχανισμούς της καρκινογένεσης και μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τον οργανισμό. Εκτός από τις γενετικές μεταλλάξεις των καρκινικών κυττάρων, μπορούν επίσης να γίνουν και *in vivo* συγκρίσεις σε ποντικούς όσον αφορά στον ρυθμό και στον τρόπο ανάπτυξης των όγκων. Επιπλέον, η διερεύνηση των διαφόρων κυτταρικών παραγόντων που συμμετέχουν στην καρκινογένεση και η επέκταση των κυττάρων γίνεται δυνατή κυρίως μέσω μελετών σε μοντέλα PDX αλλά και σε συνδυασμό με άλλου είδους μοντέλα ξενομοσχευμάτων. Για παράδειγμα, οι μοριακοί μηχανισμοί συνήθως μελετώνται στα μοντέλα ξενομοσχευμάτων καρκινικών κυτταρικών σειρών (cancer cell line xenografts, CCLXs), στα οποία λαμβάνει χώρα η εμφύτευση γενετικά τροποποιημένων καρκινικών κυττάρων. Έναν ακόμη πιθανό μηχανισμό έναρξης της ογκογένεσης μπορεί να αποτελέσει μια ομάδα καρκινικών βλαστικών κυττάρων (cancer stem cells, CSCs), τα οποία παρουσιάζουν χαρακτηριστικά βλαστοκυττάρων.²⁵

Σημαντικό τμήμα της βασικής έρευνας του καρκίνου αφιερώνεται στον μηχανισμό της μετάστασης και της διείσδυσης των καρκινικών κυττάρων. Ο θάνατος λόγω καρκίνου οφείλεται, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, στην εξάπλωση των δευτερογενών όγκων στο σώμα. Παρ' όλο τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η μετάσταση στην εξέλιξη του όγκου, οι καθοριστικοί παράγοντες που την ορίζουν και οι αποτελεσματικοί τρόποι αντιμετώπισής της παραμένουν ασαφείς. Ωστόσο, σχετικές δοκιμασίες σε μοντέλα PDX μπορούν να εφαρμοστούν με σκοπό την αναγνώριση των κυττάρων και των μορίων που συμμετέχουν στη μετάσταση. Έχει βρεθεί ότι ορισμένοι υποπληθυσμοί καρκινικών κυττάρων έχουν την ικανότητα εκκίνησης της μετάστασης (metastasis-initiating cells, MICs), χωρίς ωστόσο να είναι δυνατή η απόκτηση επαρκών αριθμών τους από ασθενείς. Ωστόσο, τα μοντέλα PDX, λειτουργώντας ως πηγές επέκτασης, μπορούν να καταστήσουν δυνατή την απομόνωση επαρκών αριθμών MICs. Επιπλέον, ορισμένα ειδικά καρκινικά κύτταρα που μπορούν να μεταφέρονται μέσω του κυκλοφορικού συστήματος (circulating tumor cells, CTCs) φαίνεται ότι συμμετέχουν και αυτά στη μετάσταση των όγκων σε σημαντικό βαθμό. Απομονωμένα CTCs έχουν αποτελέσει πηγές για την εγκαθίδρυση ιδιαίτερων μοντέλων PDX, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση των μηχανισμών της ογκογένεσης και των χαρακτηριστικών των CTCs.²⁶⁻²⁸

4.2. Προκλινική έρευνα με βάση τα μοντέλα ξενομοσχευμάτων

Ένα μειονέκτημα των κλασικών αντικαρκινικών θεραπειών είναι ότι οδηγούν στην ανάπτυξη ανθεκτικών

κυτταρικών υποπληθυσμών που επηρεάζουν τελικά την ανταπόκριση στη θεραπεία. Γι' αυτόν τον λόγο κρίνεται επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης νέων θεραπειών που θα μπορούν να αντιμετωπίζουν αποτελεσματικά τους συνεχώς εξελισσόμενους καρκίνους. Τα μοντέλα PDX αποτελούν μια προσομοιαστική προσέγγιση για τη διεξαγωγή ερευνών *in vivo* που εξασφαλίζουν την άντληση χρήσιμων πληροφοριών σχετικά με την αξιολόγηση νέων πιθανών θεραπευτικών στρατηγικών. Συγκεκριμένα, τα μοντέλα PDX είναι χρήσιμα για την εύρεση διαγνωστικών και θεραπευτικών στόχων, π.χ. ειδικών βιοδεικτών. Οι πληροφορίες οι οποίες αντλούνται από αυτά μπορούν να καθορίσουν την καταλληλότερη θεραπευτική προσέγγιση, που θα χρησιμοποιηθεί στον ασθενή μέσω της μελέτης του τρόπου δράσης των αντικαρκινικών παραγόντων και των μηχανισμών οι οποίοι εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων. Συνεπώς, τα μοντέλα PDX μπορούν να οριστούν ως καθοδηγητές της κλινικής θεραπείας.⁹

Ο τύπος του καρκίνου και η ανοσοβιολογία του κάθε ασθενούς συνιστούν τους κυριότερους παράγοντες που καθορίζουν την επιλογή της θεραπευτικής αγωγής. Ένα κοινό πρόβλημα που παρουσιάζεται κατά την ανάπτυξη των αντικαρκινικών θεραπευτικών σχημάτων είναι ότι ένα φάρμακο μπορεί να εμφανίζει αντικαρκινική δράση σε πειραματόζωα, αλλά όχι στους ίδιους τους ασθενείς. Αυτό το πρόβλημα είναι δυνατόν να επιλυθεί με την εκπόνηση μελετών σε εξανθρωπισμένα μοντέλα PDX, τα οποία προσομοιάζουν το καρκινικό περιβάλλον στον άνθρωπο, με υψηλή ακρίβεια. Οπότε μια φαρμακευτική αγωγή που είναι αποτελεσματική έναντι ενός μοντέλου PDX ποντικού θα είναι αποτελεσματική και για τους αντίστοιχους ασθενείς. Συνεπώς, τα μοντέλα PDX μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αποτελεσματικά εργαλεία για την αναγνώριση και την αξιολόγηση νέων αντικαρκινικών θεραπευτικών δοκιμασιών.

Κατά τις προκλινικές δοκιμασίες πιθανών αντικαρκινικών φαρμάκων είναι σημαντικό να γίνουν δοκιμασίες με τη χρήση μοντέλων PDX ώστε να διευκρινιστούν οι ιδιότητες των συγκεκριμένων φαρμάκων. Ωστόσο, το κυριότερο πρόβλημα στην ανάπτυξη των αντικαρκινικών φαρμάκων είναι το χαμηλό ποσοστό επιτυχίας, το οποίο οφείλεται μερικώς στα κλασικά μοντέλα προκλινικού ελέγχου και στην έλλειψη ελέγχου με τους κατάλληλους βιοδείκτες. Τα μοντέλα PDX αποτελούν μια ασφαλή εναλλακτική λύση έναντι άλλων υφιστάμενων μοντέλων για τον ορθό έλεγχο της δράσης των φαρμάκων έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου. Εξαιτίας της ακριβούς προσομοίωσης της παθολογίας του ασθενούς, τα *ex vivo* καλλιεργημένα καρκινικά κύτταρα μοντέλων PDX μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τον *in vitro* έλεγχο υψηλής απόδοσης (high-throughput screening) της αποτελεσματικότητας των αντικαρκινικών φαρμάκων και για την ανάδειξη βιοδεικτών.²⁹⁻³¹

5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

5.1. Διερεύνηση των μηχανισμών καρκινικής ανάπτυξης μέσω της εφαρμογής των γενετικά τροποποιημένων μοντέλων ποντικών

Τα GEMMs αποτελούν συστήματα στα οποία οι όγκοι αναπτύσσονται *de novo* και έχουν ως στόχο τη διερεύνηση των παραγόντων που συμμετέχουν σε σχετιζόμενες με τον καρκίνο διεργασίες. Τα πολυάριθμα γονίδια τα οποία έχει ανακαλυφθεί ότι σχετίζονται με την καρκινογένεση έχουν καταστήσει επιτακτική ανάγκη την εύρεση *in vivo* μεθόδων για τη μελέτη της επίδρασης που έχουν στην ογκογένεση. Λόγω της δυνατότητας την οποία παρέχουν τα GEMMs για την εισαγωγή των υπό μελέτη γονιδίων στο γονιδίωμα των ποντικών, χρησιμοποιούνται πλέον για την εκτίμηση γονιδίων που θεωρούνται υπεύθυνα για την ανάπτυξη καρκινικών όγκων και για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ διαφορετικών γονιδίων. Επίσης, συμμετέχουν στη μελέτη της «εξάρτησης από ογκογονίδια», ενός φαινομένου όπου η ανάπτυξη και η εξέλιξη κάποιων όγκων εξαρτάται από την έκφραση ενός και μόνο ογκογονιδίου.

Μια ακόμη σημαντική χρήση των GEMMs είναι η ανίχνευση των κυττάρων από τα οποία αρχίζει να αναπτύσσεται ο όγκος. Η ταυτοποίηση των παραπάνω κυττάρων γίνεται με την αποσιώπηση της έκφρασης γονιδίων σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Στη συνέχεια, μελετάται ο τρόπος με τον οποίο η εν λόγω απενεργοποίηση συμβάλλει στην ανάπτυξη του όγκου. Η εφαρμογή αυτή έχει ως σκοπό τη βελτίωση των υφιστάμενων θεραπευτικών στρατηγικών και φαρμάκων, που στοχεύουν ειδικά τα συγκεκριμένα κύτταρα. Τα GEMMs μπορούν ακόμη να αποκαλύψουν την επίδραση που έχουν διάφοροι επικουρικοί παράγοντες, όπως οι ινοβλάστες αλλά και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, στη δημιουργία του καρκινικού φαινότυπου. Οι ινοβλάστες αποτελούν το μικροπεριβάλλον του όγκου και είναι υπεύθυνοι για τον σχηματισμό της βασικής μεμβράνης και για τη ρύθμιση της θέσης της εξωκυττάριας μήτρας. Έχει παρατηρηθεί ότι κατά την ανάπτυξη του καρκίνου ενισχύουν την αγγειογένεση, προωθώντας έτσι την καρκινική εξέλιξη. Επομένως, η χρήση των GEMMs καθίσταται αναγκαία για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των ινοβλαστών με τον υπό μελέτη καρκίνο.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι μεταστάσεις ευθύνονται για το μεγαλύτερο ποσοστό των θανάτων που σχετίζονται με τον καρκίνο. Ωστόσο, αποτελούν μια πολυσταδιακή διαδικασία η οποία δεν έχει μελετηθεί εκτενώς ούτε η ίδια αλλά ούτε και οι λόγοι για τους οποίους είναι θανατηφόρος. Τα GEMMs μπορούν να χρησιμοποιηθούν

για τη μελέτη των διαφορετικών σταδίων της μετάστασης, π.χ. της ενδαγγείωσης. Επίσης, αξιοποιούνται και στη διερεύνηση του ρόλου διαφόρων γονιδίων που εκφράζονται κατά τη διάρκεια της μετάστασης. Έτσι, μπορούν να παρέχουν περαιτέρω γνώσεις για την εξέλιξη της νόσου. Ένα πρόβλημα που παρατηρείται συχνά είναι ο θάνατος των ποντικών, ο οποίος προκαλείται λόγω του πρωτογενούς όγκου πριν μπορέσει να σχηματιστεί κάποια μετάσταση. Για τον λόγο αυτόν μπορεί να γίνει ορθοτοπική εμφύτευση τμημάτων των όγκων, τα οποία διαθέτουν ακόμη τα καρκινικά χαρακτηριστικά τους, από τα GEMMs σε ποντικούς δέκτες, ώστε να μελετηθεί η διαδικασία της μετάστασης. Επίσης, τα εν λόγω μοντέλα έχουν αποκαλύψει πολυάριθμες αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη δημιουργία του μεταστατικού καρκίνου. Έχει δειχθεί ότι για τη δημιουργία του δεν είναι πάντοτε απαραίτητη η μετάπτωση των κυττάρων από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά. Τα ευρήματα αυτά μπορούν να συνεισφέρουν σημαντικά στην ανάπτυξη αποτελεσματικής θεραπείας για μεταστατικούς καρκίνους.^{2,18,19,23}

5.2. Κλινική έρευνα και γενετικά τροποποιημένα μοντέλα ποντικών

Στο πεδίο της κλινικής έρευνας της μεταφραστικής ογκολογίας, τα GEMMs συμβάλλουν στη διερεύνηση των μηχανισμών που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του καρκίνου. Η καταστολή ή η επαγωγή της έκφρασης κάποιου γονιδίου στα μοντέλα ποντικών μπορεί να δώσει στοιχεία για τον τρόπο με τον οποίο η έκφραση ή η απουσία έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων επηρεάζει την ανάπτυξη του υπό μελέτη καρκινικού τύπου. Επομένως, αποτελούν ένα μέσο για την εύρεση διαφορετικών στόχων των φαρμάκων και για την εξακρίβωση των κυτταρικών μηχανισμών που προσδίδουν αντοχή στα φάρμακα. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό των GEMMs αποτελεί η χρήση τους σε προκλινικές δοκιμές για την εκτίμηση της απόκρισης σε νέες θεραπείες, καθώς και για την αξιολόγηση μηχανισμών αντίστασης του καρκίνου σε φάρμακα. Οι αντικαρκινικές θεραπείες δοκιμάζονται πρώτα σε ποντικούς και ύστερα σε ανθρώπους, ώστε να ενισχυθεί η επιτυχία της θεραπείας. Ωστόσο, ο τρόπος με τον οποίο μεταβολίζουν τα φάρμακα οι ποντικοί διαφέρει σε σύγκριση με τους ανθρώπους και πρέπει να ληφθεί υπ' όψη κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Επιπλέον, απαιτείται να μελετηθεί και η συνεισφορά του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και των κυττάρων γύρω από αυτόν στην αντοχή του καρκίνου σε θεραπείες.

Εφόσον τα GEMMs περιλαμβάνουν την ανάπτυξη όγκων *de novo* σε ανοσοεπαρκείς ποντικούς θεωρούνται κατάλλη-

λα για τη μελέτη της επίδρασης της ανοσοθεραπείας στον καρκίνο. Χρησιμοποιούνται επίσης για την ταυτοποίηση καρκινικών αντιγόνων και για τη μελέτη της απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος που παρατηρείται έναντι αυτών. Συνεπώς, τα συγκεκριμένα μοντέλα θεωρούνται κατάλληλα μέσα για την έρευνα των μηχανισμών που συμμετέχουν στη διαφυγή του καρκίνου από την ανοσοεπιτήρηση, καταλήγοντας στη δημιουργία κακοήθειας. Τέλος, η αξιοποίησή τους σε προκλινικές δοκιμές είναι σημαντική καθώς συνεισφέρει στην ανίχνευση βιοδεικτών και συνδυασμών διαφόρων θεραπειών που μπορούν μετέπειτα να εφαρμοστούν και σε ανθρώπους. Επίσης, η χρήση τους στο πλαίσιο των συν-κλινικών δοκιμών μπορεί να αποτελέσει το εναρκτήριο βήμα για τη δημιουργία καινοτόμων θεραπευτικών αγωγών με βάση τις ιδιαιτερότητες κάθε ασθενούς.^{23,32}

6. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Είναι σαφές από διάφορες μελέτες ότι κάποιες θεραπείες ενδέχεται να είναι αποτελεσματικές μόνο για συγκεκριμένες υποομάδες ασθενών. Οπότε ως αποτέλεσμα, η θεραπεία που θα πρέπει να ακολουθηθεί για κάθε ασθενή διαφέρει. Γι' αυτόν τον λόγο, οι σύγχρονες μεθοδολογίες στοχεύουν στην ανάπτυξη καινοτόμων εξατομικευμένων θεραπευτικών μεθόδων έναντι των κλασικών γενικευμένων, για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση του καρκίνου. Παρ' όλα αυτά, υπάρχει ένα χάσμα μεταξύ της σύνδεσης της θεωρητικής γνώσης με την πρακτική χρήση των διαφόρων μεθόδων, το οποίο καθιστά τις κλασικές θεραπείες συχνά χρησιμότερες. Αν και η κλασική χημειοθεραπεία παραμένει ο βασικός τρόπος θεραπείας των περισσότερων καρκίνων, τα μοντέλα ποντικών βρίσκουν ευρεία εφαρμογή σε *in vivo* και *in vitro* μελέτες ανάδειξης νέων θεραπειών. Συγκεκριμένα, οι οργανισμοί-μοντέλα είναι πολύτιμα εργαλεία στην ανάπτυξη και στην αξιολόγηση εναλλακτικών στοχευμένων θεραπειών. Τέτοιες εναλλακτικές θεραπείες περιλαμβάνουν τη χρήση αντισωμάτων, τη στόχευση ειδικών μηχανισμών για την ευαισθητοποίηση ανθεκτικών όγκων και τη χρήση ειδικών μικροοργανισμών και ογκολυτικών ιών. Το κυριότερο μειονέκτημα των στοχευμένων θεραπειών είναι η ανάπτυξη ανθεκτικών κλώνων. Γι' αυτόν τον λόγο, στην κλασική χημειοθεραπεία υπάρχει μια προσπάθεια περιορισμού του εν λόγω γεγονότος με τη χρήση πολλαπλών συνδυασμών φαρμάκων. Καθώς τα μοντέλα μπορούν να καθορίσουν και τους βέλτιστους θεραπευτικούς στόχους, είναι δυνατή η αποφυγή δημιουργίας ανθεκτικότητας ακόμη και σε στοχευμένες θεραπείες. Τελικά, μπορούμε

να συμπεράνουμε ότι τα ζωικά μοντέλα διευκολύνουν την ανακάλυψη και την εξέταση διαφόρων θεραπευτικών παραγόντων.¹

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα τελευταία έτη έχει παρατηρηθεί ταχεία ανάπτυξη νέων βελτιωμένων τεχνικών που αφορούν στη μελέτη του καρκίνου. Μέσω σχετικών ερευνών, είναι δυνατή η άντληση πληροφοριών αναφορικά με τους εμπλεκόμενους μηχανισμούς και παράγοντες, γεγονός που καθιστά περισσότερο αποτελεσματική την εύρεση πιθανών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Βασικά εργαλεία για τη μελέτη της βιολογίας του καρκίνου συνιστούν τα πρότυπα μοντέλα ποντικών, τα οποία βρίσκουν συχνά εφαρμογή σε συν-κλινικές δοκιμασίες πιθανών θεραπειών. Οι ερευνητές, έχοντας την ικανότητα τροποποίησης των διαφόρων ιδιοτήτων τους (π.χ. βαθμός ανοσοανεπάρκειας στα μοντέλα PDX), έχουν στη διάθεσή τους μια ανεξάντλητη «εργαλειοθήκη» με ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών και χρήσεων που μπορούν να «ρυθμίσουν στα μέτρα τους».

Συγκεκριμένα, δύο από τους σημαντικότερους τύπους τέτοιων οργανισμών αποτελούν τα μοντέλα PDX που εστιάζουν στην προσομοίωση του ιστικού μικροπεριβάλλοντος και των ανοσολογικών αλληλεπιδράσεων με τα οποία έρχονται αντιμέτωπα τα καρκινικά κύτταρα, και τα γενετικά τροποποιημένα μοντέλα που χαρακτηρίζονται από τη δυνατότητα *de novo* ογκογένεσης και προσομοιάζουν τη γενετική του ανθρώπινου καρκίνου. Κύριους αντιπροσώπους αυτών αποτελούν τα μοντέλα PDX και GEMMs, αντίστοιχα. Τα μοντέλα αυτά συνιστούν αναπόσπαστο τμήμα συν-κλινικών δοκιμών, όπου λαμβάνει χώρα η δοκιμή διαφόρων φαρμακευτικών και άλλων παραγόντων παράλληλα με ασθενείς, με σκοπό τη μελέτη της απόκρισης του καρκίνου στη θεραπεία και στην ανίχνευση της βέλτιστης θεραπευτικής προσέγγισης για τον ασθενή.

Συνεπώς, τέτοια και άλλα μοντέλα όχι μόνο θα συνεχίσουν να χρησιμοποιούνται στη βασική και στην προκλινική έρευνα του καρκίνου αλλά είναι αναμενόμενη η επέκταση των πιθανών εφαρμογών τους καθώς αναπτύσσονται βελτιωμένα μοντέλα και τεχνικές μελέτης. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των μοντέλων και τα σχετικά δεδομένα που μας παρέχουν, τα διαφοροποιούν από τις κλασικές θεραπευτικές μεθόδους, δρώντας συμπληρωματικά σε αυτές και επιταχύνοντας έτσι την εύρεση ειδικευμένων και βελτιωμένων θεραπευτικών μεθόδων όσον αφορά στην αντιμετώπιση του καρκίνου του ανθρώπου.

ABSTRACT

Review of the applications of mouse models in cancer research

E.P. KOKKINOGENIS, M. DELI, S. PAPAΚΟΣΤΟΠΟΥΛΟΥ, M. KOTSARI, P. ZOUMPOURLIS,
M. GOULIELMAKI, V. ZOUMPOURLIS

*Unit of Biomedical Applications, Institute of Chemical Biology, National Hellenic Research Foundation,
Athens, Greece*

Archives of Hellenic Medicine 2021, 38(2):166–176

The genetic heterogeneity of cancer and the numerous processes that are involved in its development and progression have created the necessity for development of novel methods for its study, aimed at finding new therapeutic approaches. Progress in the field of genetic engineering in recent decades has enabled the development of various model organisms that are used in the study of cancer biology. Such model organisms are among the most common tools for modeling and studying tumors *in vivo*. The ability to generate mice that represent the genetics of human disease can contribute to identifying those patients who will benefit more from a particular treatment than others who fail to respond effectively. Co-clinical trials can be performed in parallel with studies in humans, during which mice are subjected to the same conditions and therapeutic techniques, and based on the results of the latter, are in turn appropriately applied to human patients. Animal models are also used as a source of tumor cell growth and expansion, which can be derived from human grafts or genetic modification of the models themselves. These are often used in clinical trials to provide information for the complementation of traditional therapeutic approaches and to detect individualized treatments based on the individual characteristics each patient. Alternatively, they can be used to investigate the complex mechanisms and factors involved in various cancer processes, such as tumorigenesis and metastasis. Their application may also be useful in identifying genetic and molecular mechanisms responsible for the heterogeneity of a patient's responses to different therapeutic approaches.

Key words: Basic research, Cancer, Genetically engineered mouse models, Patient-derived xenografts, Preclinical research

Βιβλιογραφία

1. LAI Y, WEI X, LIN S, QIN L, CHENG L, LI P. Current status and perspectives of patient-derived xenograft models in cancer research. *J Hematol Oncol* 2017, 10:106
2. CLOHESSY JG, PANDOLFI PP. Mouse hospital and co-clinical trial project – from bench to bedside. *Nat Rev Clin Oncol* 2015, 12:491–498
3. TURSZT, ANDRE F, LAZAR V, LACROIX L, SORIA JC. Implications of personalized medicine – perspective from a cancer center. *Nat Rev Clin Oncol* 2011, 8:177–183
4. KELLAND LR. Of mice and men: Values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer* 2004, 40:827–836
5. SAUSVILLE EA, BURGER AM. Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development. *Cancer Res* 2006, 66:3351–3354
6. FINN OJ. Immuno-oncology: Understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol* 2012, 23(Suppl 8):viii6–viii9
7. KURACHA MR, THOMAS P, LOGGIE BW, GOVINDARAJAN V. Patient-derived xenograft mouse models of pseudomyxoma peritonei recapitulate the human inflammatory tumor microenvironment. *Cancer Med* 2016, 5:711–719
8. MORTON CL, HOUGHTON PJ. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc* 2007, 2:247–250
9. PAVÍA-JIMÉNEZ A, TCHEUYAP VT, BRUGAROLAS J. Establishing a human renal cell carcinoma tumorgraft platform for preclinical drug testing. *Nat Protoc* 2014, 9:1848–1859
10. QUAIL DF, JOYCE JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013, 19:1423–1437
11. SIOLAS D, HANNON GJ. Patient-derived tumor xenografts: Transforming clinical samples into mouse models. *Cancer Res* 2013, 73:5315–5319
12. TENTLER JJ, TAN AC, WEEKES CD, JIMENO A, LEONG S, PITTS TM ET AL. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol* 2012, 9:338–350
13. DONG R, QIANG W, GUO H, XU X, KIM JJ, MAZAR A ET AL. Histologic and molecular analysis of patient derived xenografts of high-grade serous ovarian carcinoma. *J Hematol Oncol* 2016, 9:92
14. HOFFMAN RM. Patient-derived orthotopic xenografts: Better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. *Nat Rev Cancer* 2015, 15:451–452
15. KIM MP, EVANS DB, WANG H, ABBRUZZESE JL, FLEMING JB, GALLICK GE. Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc* 2009, 4:1670–1680

16. FU X, GUADAGNI F, HOFFMAN RM. A metastatic nude-mouse model of human pancreatic cancer constructed orthotopically with histologically intact patient specimens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89:5645–5649
17. PAPANETROU EP. Patient-derived induced pluripotent stem cells in cancer research and precision oncology. *Nat Med* 2016, 22:1392–1401
18. LAMPREHT TRATAR U, HORVAT S, CEMAZAR M. Transgenic mouse models in cancer research. *Front Oncol* 2018, 8:268
19. HARUYAMA N, CHO A, KULKARNI AB. Overview: Engineering transgenic constructs and mice. *Curr Protoc Cell Biol* 2009, 42:19.10
20. DOYLE A, MCGARRY MP, LEE NA, LEE JJ. The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. *Transgenic Res* 2012, 21:327–349
21. BRINSTER RL, PALMITER RD. Induction of foreign genes in animals. *Trends Biochem Sci* 1982, 7:438–440
22. GORDON JW, RUDDLE FH. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 1981, 214:1244–1246
23. KERSTEN K, DE VISSER KE, VAN MILTENBURG MH, JONKERS J. Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. *EMBO Mol Med* 2017, 9:137–153
24. MARUSYK A, TABASSUM DP, ALTROCK PM, ALMENDRO V, MICHOR F, POLYAK K. Non-cell-autonomous driving of tumour growth supports sub-clonal heterogeneity. *Nature* 2014, 514:54–58
25. LAWSON DA, BHAKTA NR, KESSENBROCK K, PRUMMEL KD, YU Y, TAKAI K ET AL. Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells. *Nature* 2015, 526:131–135
26. YU M, BARDIA A, ACETO N, BERSANI F, MADDEN MW, DONALDSON MC ET AL. Cancer therapy. *Ex vivo* culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science* 2014, 345:216–220
27. GIULIANO M, HERRERA S, CHRISTINY P, SHAW C, CREIGHTON CJ, MITCHELL T ET AL. Circulating and disseminated tumor cells from breast cancer patient-derived xenograft-bearing mice as a novel model to study metastasis. *Breast Cancer Res* 2015, 17:3
28. SINGH SK, HAWKINS C, CLARKE ID, SQUIRE JA, BAYANI J, HIDE T ET AL. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004, 432:396–401
29. DOBBIN ZC, KATRE AA, STEG AD, ERICKSON BK, SHAH MM, ALVAREZ RD ET AL. Using heterogeneity of the patient-derived xenograft model to identify the chemoresistant population in ovarian cancer. *Oncotarget* 2014, 5:8750–8764
30. BOUSQUET G, JANIN A. Patient-derived xenograft: An adjuvant technology for the treatment of metastatic disease. *Pathobiology* 2016, 83:170–176
31. BRADFORD JR, WAPPETT M, BERAN G, LOGIE A, DELPUECH O, BROWN H ET AL. Whole transcriptome profiling of patient-derived xenograft models as a tool to identify both tumor and stromal specific biomarkers. *Oncotarget* 2016, 7:20773–20787
32. SINGH M, LIMA A, MOLINA R, HAMILTON P, CLERMONT AC, DEVASTHALI V ET AL. Assessing therapeutic responses in Kras mutant cancers using genetically engineered mouse models. *Nat Biotechnol* 2010, 28:585–593

Corresponding author:

V. Zoumpourlis, Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, 48 Vassileos Constantinou Ave., 116 35 Athens, Greece
e-mail: vzub@ie.gr