Туршилтын амьтны уушгинд бүдүүн шулуун гэдэсний хорт хавдрын үсэрхийллийн загвар үүсгэн судалсан дүн

Д.Анужин[1], Б.Маналжав[2], М.Барсболд[2], Ч.Алтанчимэг[2], Б.Отгонсүрэн[2], Т.Хүсэлт-Од[3], У.Сувд-Эрдэнэ[3], Л.Энхсайхан[4,5], Ч.Гансүх[4], Б.Журамт[1]

[1]АШУҮИС, Био-АС, Анатомийн тэнхим
[2]АШУҮИС, Sci-lab клубийн оюутан
[3]АШУҮИС, Био-АС-ийн оюутан
[4]АШУҮИС, Био-АС, Дархлаа судлалын тэнхим
[5]АШУҮИС, Био-Анагаахын Хүрээлэн
Цахим шуудан: anujin.d@mnums.edu.mn, Утас: 88099136

Түлхүүр үг:
Туршилтын амьтны загвар
Уушги
C57BL/6J хулгана
MC38

Товч утга:
Үндэслэл: Өнөө үед бүдүүн шулуун гэдэсний хорт хавдар (БШГХХ) нь дэлхий дахинд түгээмэл тохиолддог хорт хавдрын гуравдугаарт, хорт хавдрын шалтгаант нас баралтын хоёрдугаарт орж байна. БШГХХ нь элэг (50%), уушги (10-15%), хэвлийн гялтан хальс (4%), яс (10.7-23.7%), тархи (0.3-6%) болон нугас руу ихэвчлэн үсэрхийлдэг ба нийт тохиолдлын 35% нь анхдагч голомтоос тархахаас өмнө, 36% нь ойролцоох тунгалгийн булчирхайд үсэрхийлсэн үедээ, 23% нь алсын эд, эрхтэнд үсэрхийлсний дараа оношлогддог байна. Манай оронд туршилтын хулганад хорт хавдрын анхдагч загвар үүсгэсэн судалгааны ажил цөөнгүй байгаа ч туршилтын хулганы уушгинд хорт хавдрын үсэрхийллийн загвар үүсгэсэн судалгаа хомс байгаа нь энэхүү судалгааг хийх үндэслэл боллоо. **Зорилго:** C57BL/6J хулганад MC38 хавдрын эсийн шугаман өсгөвөр ашиглан бүдүүн шулуун гэдэсний хорт хавдрын үсэрхийллийг судлах. **Арга, аргачлал:** Бид энэхүү судалгааг АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын хүрээлэнг түшиглэн хийж гүйцэтгэв. АШУҮИС-ийн Судалгааны ёс зүйн хяналтын хорооноос судалгааны ажлыг эхлүүлэх ёс зүйн зөвшөөрлийг авсны (хурлын тэмдэглэл №2023/3-09) үндсэн дээр лабораторид ажиллах аюулгүй ажиллагааны дүрэм, журмыг чанд мөрдөн хийж гүйцэтгэв. АШУҮИС-ийн Туршилтын амьтны төвд үржүүлсэн C57BL/6J эрэгчин хулгана, хулганы MC38 бүдүүн шулуун гэдэсний хавдрын эсийн шугаман өсгөвөр ашиглав. Туршилтын хулганы сүүлний венд $0.25*10^6$ MC38 эсийг (n=12) тарьж хавдрын үсэрхийллийн загвар үүсгэж, гистологи шинжилгээгээр дүгнэсэн. **Үр дүн:** Бүдүүн шулуун гэдэсний хорт хавдар бусад эрхтэн рүү үсэрхийлсэн байдлыг судлахад хулганы уушгины эдийн хэвийн бичил бүтэц алдагдсан, гиперхроматик будагдсан, плеоморфик эс шигүү нэвчиж уушгины хэвийн бүтцийг алдагдуулсан голомттой харагдаж байв. Элэг, дэлүү, бөөр, бүдүүн гэдэсний гистологи бүтцэд өөрчлөлт ажиглагдсангүй. **Дүгнэлт:** Хулганы сүүлний венээр бүдүүн шулуун гэдэсний аденокарцинома MC38 эс тарихад уушгинд холбогч эдэн дэвсгэр бүхий гиперхроматик будагдсан, плеоморфик эс шигүү нэвчиж булчирхайлаг бүтэц бүхий хавдрын үсэрхийлэл үүсэж байна.

Үндэслэл: Дэлхийн Эрүүл Мэндийн Байгууллага (ДЭМБ)-ын мэдээлснээр 2022 онд 20 сая гаруй хүн хорт хавдраар өвчилж, үүнээс 9.7 сая хүн хорт хавдрын улмаас нас барсан байна. Эдгээрээс уушгины хорт хавдар (18.7%), бүдүүн шулуун гэдэсний хорт хавдар (9.3%) тэргүүлэх байрыг эзэлж байна. Бүдүүн шулуун гэдэсний хорт хавдар нь дэлхий дахинд түгээмэл тохиолддог хорт хавдрын гуравдугаарт, хорт хавдрын шалтгаант нас баралтын хоёрдугаарт орж байна.[1] 2050 он гэхэд бүдүүн шулуун гэдэсний хорт хавдрын өвчлөл

дэлхий даяар жил бүр 3.57 сая (85.5% ихсэх) болж, нас баралт 1.84 сая (103% ихсэх) болж тус тус нэмэгдэх хандлагатай байна.[2]

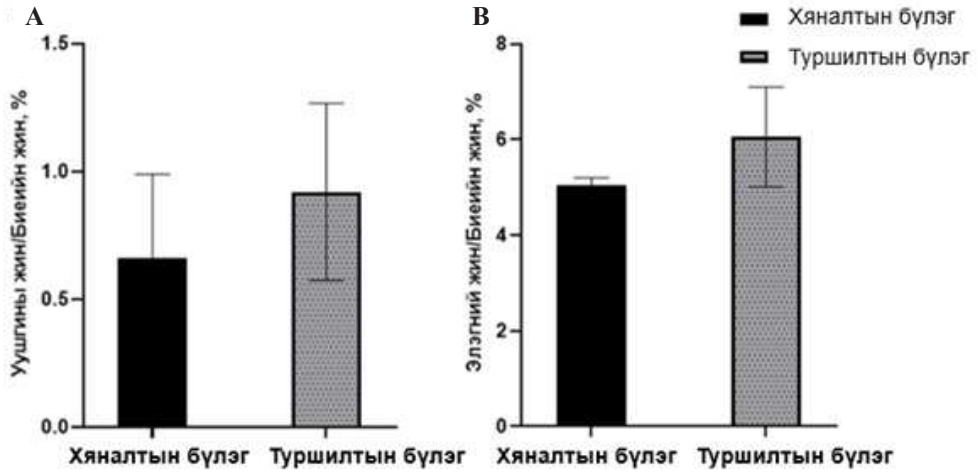
БШГХХ нь элэг (50%), уушги (10-15%), хэвлийн гялтан хальс (4%), яс (10.7-23.7%), тархи (0.3-6%) болон нугас руу үсэрхийлдэг ба 35% нь анхдагч голомтоос тархахаас өмнө, 36% нь ойролцоох тунгалгийн булчирхайд үсэрхийлсэн үедээ, 23% нь алсын эд, эрхтэнд үсэрхийлсний дараа оношлогддогийг Америкийн Үндэсний Хорт Хавдрын Нийгэмлэг (National Cancer Institute)-ээс мэдээлжээ.[3,4] Оношлогдсон үеийн хавдрын үе шатаас эмчлүүлэгчийн тавилан, амьдрах хугацаа ихээхэн хамаардгийг цөөнгүй судлаачид дурджээ.

Манай оронд туршилтын амьтанд хорт хавдрын загвар үүсгэсэн судалгааны ажил цөөнгүй байгаа ч туршилтын хулганы уушгинд хорт хавдрын үсэрхийллийн загвар үүсгэсэн судалгаа хомс байгаа нь энэхүү судалгааг хийх үндэслэл боллоо.

Зорилго: C57BL/6J хулганад MC38 хавдрын эсийн шугаман өсгөвөр ашиглан бүдүүн шулуун гэдэсний хорт хавдрын үсэрхийллийг судлах.

Арга, аргачлал: Бид энэхүү судалгааг АШУҮИС ийн Био-Анагаахын Сургуулийн Анатомийн тэнхим, Дархлаа судлалын тэнхимийн дэргэдэх Эмнэлзүйн Эмгэг судлалын лаборатори, АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын хүрээлэнг түшиглэн хийж гүйцэтгэв. АШУҮИС-ийн Туршилтын амьтны төвд үржүүлсэн эрүүл, нас бие гүйцсэн 6-7 долоо хоногтой C57BL/6J эрэгчин хулгана (n=16), хулганы MC38 бүдүүн шулуун гэдэсний хавдрын эсийн шугаман өсгөвөр (Kerafast) ашиглав. Хяналтын бүлгийн хулганы (n=4) сүүлний хажуугийн вений судсанд 100 мкл PBS (Phosphate Buffered Saline) уусмал, туршилтын бүлгийн хулганы (n=12) сүүлний хажуугийн вений судсанд $0.25*10^6$ MC38 эсийн хөвмөлөөс 100 мкл тарьж хавдрын үсэрхийллийн загвар үүсгэв. Туршилтын 14 дэх хоногт нэвчүүлэн бэхжүүлэх аргаар хоёр бүлгийн хулганыг егүүтгэн уушги, элэг, дэлүү, бөөр, бүдүүн гэдсийг тусгаарлан авч электрон жин ашиглан жинг, калипр ашиглан дээрх эрхтнүүдийн урт, өндрийг хэмжив. Тусгаарлан авсан эрхтнийг 4%-ийн параформальдегидийн уусмалд бэхжүүлж, бүрэн автомат аппарат (Sakura Tissue tek Vip 5Jr) ашиглан усгүйжүүлж, парафинд цутгаад (Sakura Tissue TEC-Tek), микротомоор (Sakura Microtome SRM 200) 4 мкм зузаантай зүслээ. Слайд халаах тавцан (Sakura Paraffin oven PM 401), термостат, бүрэн автомат будгийн аппарат, бүрхүүл шил наагч аппарат (Sakura Tissue- Prisma) ашиглан гематоксилин-эозиноор будагдсан слайдыг бэлэн болгосон. Үр дүнгийн статистик боловсруулалтыг Графпад призм 10.2.3 программ ашиглан арифметик дундаж, дунджийн стандарт алдааг тооцов. Бүлэг хоорондын ялгааг T тестийн аргаар үнэлсэн ба p утга 0.05-аас бага байх тохиолдолд тэг таамаглалыг няцааж, статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай гэж үзсэн.

Үр дүн: Бид туршилтын 2 бүлэг хулганы уушги, элэгний морфометрийн зарим үзүүлэлтийг (жин, урт, өндөр) хэмжихэд бүлэг хооронд статистик ач холбогдол бүхий ялгаагүй ажиглагдлаа. Цаашид туршилтын хулганы элэгний жинг биеийн жинтэй, уушгины жинг биеийн жинтэй харьцуулан судлахад бүлэг хооронд статистик ач холбогдол бүхий ялгаагүй байгаа нь ажиглагдлаа ($p>0.05$) (Зураг 1).



Зураг 1. Туршилтын хулганы уушги, элэгний жинг биеийн жинтэй харьцуулан судалсан дүн, (бүлгээр).

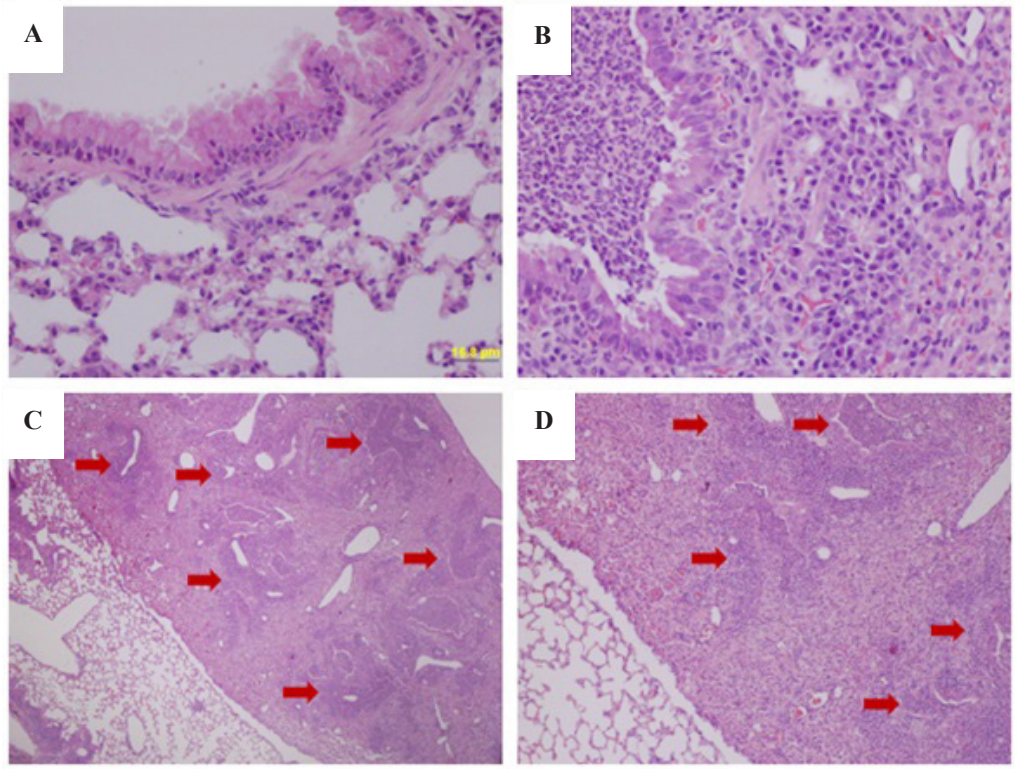
А. Уушгины жинг биеийн жинд харьцуулсан дүн

В. Элэгний жинг биеийн жинд харьцуулсан дүн

Туршилтын амьтанд үүсгэсэн бүдүүн шулуун гэдэсний хорт хавдрын үсэрхийллийг уушгины эдэд судлахад хяналтын бүлгийн уушгины эдийн бичил бүтэц хадгалагдсан, гялтан хальс нимгэн. Цулцангийн хөндийд агаар агуулсан, өөрчлөлтгүй. Цулцангийн хялгасан судаснууд тэлэгдсэн, жигд бус дүүрэлттэй. Гуурсан хоолой тэлэгдсэн, бортгон хучуур эс хадгалагдсан, хөндий хоосон. Тараагуур болон хураагуур судаснууд тэлэгдсэн, хөндий хоосон байгаа нь тодорхойлогдлоо (Зураг 2а).

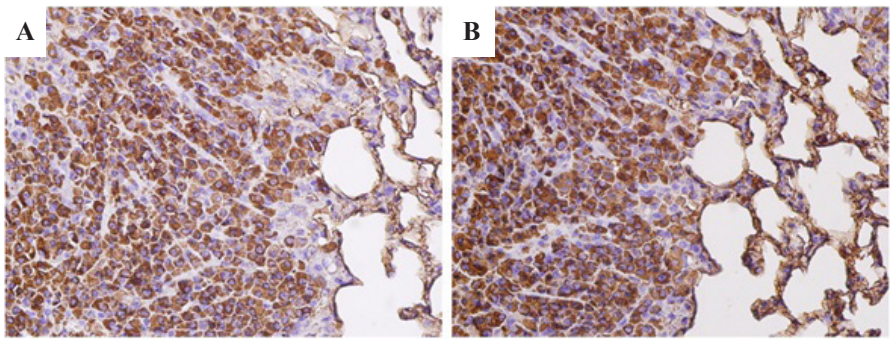
Харин туршилтын бүлгийн хулганы уушгины эдийн бичил бүтэц алдагдсан. Булчирхайлаг бүтэц

үүсгэсэн, хөндийдөө үхжил болон нейтрофил давамгайлсан холимог үрэвслийн эсийн нэвчдэстэй, холбогч эдэн дэвсгэр бүхий гиперхроматик будагдсан, плеоморфик эсийн шигүү нэвчиж уушгины хэвийн бүтцийг алдагдуулсан голомттой. Бусад хэсгээр цулцангийн хөндий хоосон, хялгасан судаснууд тэлэгдсэн, жигд бус цус дүүрэлттэй. Гуурсан хоолой тэлэгдсэн, хучуур хадгалагдсан, хөндий хоосон. Хураагуур судас тойрсон холимог шигүү үрэвслийн эсийн нэвчдэстэй харагдлаа (Зураг 2b,c,d).



Зураг 2. Туршилтын хулганы уушгины эдийн өөрчлөлтийг судалсан дүн.
a. Хяналтын бүлгийн хулганы уушгины эдийн бичил бүтэц. (H&E, Өсгөлт: x200).
b. Туршилтын бүлгийн хулганы уушгины эдийн бичил бүтэц. (H&E, Өсгөлт: x200).
c. Туршилтын бүлгийн хулганы уушгины эдийн бичил бүтэц. (H&E, Өсгөлт: x40).
d. Туршилтын бүлгийн хулганы уушгины эдийн бичил бүтэц. (H&E, Өсгөлт: x100).
Сумаар булчирхайлаг эдийн өөрчлөлтийг заав.

MC38 хавдрын эсийн уушгин дах үсэрхийллийг иммуногистохимийн шинжилгээгээр судлахад туршилтын бүлгийн хулганы уушгины эдэд хавдрын эсийн цитоплазм бор өнгөөр будагдаж хавдрын үсэрхийлэл бүрэн тодорхойлогдлоо (Зураг 3).



Зураг 3. Уушгины эдийн өөрчлөлтийг иммуногистохимийн шинжилгээгээр судалсан дүн.
a. IHC-CK20, **b.** IHC-CDX-2 (Өсгөлт: x400)

Хэлцэмж: Судлаач Joshua Smith (2009) нар ногоон флюресценци ууриг экспресслэгч $7.5*10^5$ MC38 эсийн тогтвортой өсгөврийг хулганы сүүлний венд тарьж In Vivo Imaging System (IVIS)-ээр гэрэлтүүлэн судалсан байна. Туршилтын 1-21 дэх хоногт хулганы уушгинд хавдрын эс гэрэлтэн харагдаж байгаа нь тарилгын 14 дэх хоногт хавдрын үсэрхийллийг гистологийн шинжилгээгээр баталсан бидний судалгааны үр дүнтэй дүйж байна.[5]

АНУ-ын судлаач Hanchen Li (2009) нар C57BL/6J омгийн 6 долоо хоногтой хулганы сүүлний венд $1*10^6$ болон $5*10^6$ MC38 эсийг тус тус тарин хавдрын загвар үүсгэн судлахад дөрвөн долоо хоногийн дараа тарьсан хавдрын эсийн тооноос үл

хамааран уушгинд хавдрын үсэрхийлэл 100% илэрч байлаа.[6]

Бидний судалгаагаар хавдрын загвар үүсгэсэн (n=12) амьтныг туршилтын 14 дэх хоногт судлахад уушгинд хавдрын зангилаа тодорхойлогдоогүй бол Frank F Shi (2007) нарын судалгааны дүнд туршилтын амьтны уушгинд хавдрын зангилаанууд тодорхойлогдсон байна. Бид судалгаандаа 6-8 долоо хоногтой хулганыг ашигласан бол Frank F Shi нар судалгаандаа 8-14 долоо хоногтой хулганыг ашигласан. Мөн бидний судалгаа богино хугацаанд уушгинд хавдрын үсэрхийлэл үүсгэхэд төвлөрч туршилтыг 14 хоногт гүйцэтгэсэн бол дээрх судалгааны баг 56 хоногийн дараа үр дүнг үнэлсэн байна.[7] Туршилтын хулганы төрөл, судалгааны үргэлжлэх хугацаа зэрэг нь үр дүнгийн ялгаатай байдалд хүргэсэн байж болзошгүй юм.

Шинэ Зеландын судлаач Nensi Shrestha (2019) нар SCID хулганы сүүлний венд уушгины аденокарцинома $1*10^5$ A549 эс, $1*10^5$ H3122 эсийг тус тус тарьж, 7-8 долоо хоногийн дараа хулганы уушгийг авч судлахад уушгинд бүтцийн өөрчлөлт илэрхий ажиглагдсанболовчхавдрынэсийгиммуногистохимийн шинжилгээгээр судлах боломжгүйг цаашид судлах шаардлагатай гэж тэмдэглэсэн байна. Судлаачид туршилтын 3, 5, 8 дахь долоо хоногт туршилтын хулганы элэг, бөөр, уушги, тархи, зүрх, төмсөг, дэлүү зэрэг эрхтнүүдийг гарган авч тухайн эрхтний жинг биеийн жинд харьцуулан судалжээ. Гурав дахь долоо хоногийн хэмжилтээр элэгний жин биеийн жингийн 6-8%, уушгины жин биеийн жингийн 1-2%-ийг тус тус эзэлсэн болохыг тодорхойлсон бол бидний судалгаанд элэг болон уушгины жинг биеийн жинтэй харьцуулсан дүн дээрх судалгааны дүнтэй ойролцоо хэдий ч бага тодорхойлогдож байгааг туршилтын хугацааны ялгаатай байдалтай холбон үзэж байна. Мөн бидний судалгааны иммуногистохимийн шинжилгээнд өөрчлөлт илэрснийг шугаман эсийн омгийн болон туршилтын хулганы омгийн ялгаатай байдал, шугаман эсийн тун зэргээс шалтгаалсан байж болзошгүй гэж үзэж байна.[8]

Omar M. Rashid (2015) нарын судалгаанд BALB/c омгийн 12 долоо хоногтой хулганы сүүний булчирхай болон хэвлийн арьсан дор хөхний 4T1-luc2 хавдрын эсийг суулгац байдлаар, сүүлний вений судсанд тарих аргаар хөхний хавдрын үсэрхийллийн загвар үүсгэсэн байна. Сүүний булчирхайд хавдрын эс шилжүүлэн суулгасан суулгацын бүлэг болон сүүлний венд хавдрын эс тарьсан 2 бүлгийн хулганы уушгийг гистологи шинжилгээгээр дүгнэхэд морфологи бүтцийн хувьд ялгаатай байгааг тодорхойлсон байна. Сүүний булчирхайд хавдрын эс суулгасан хулганы уушгины бүтэц бидний судалгааны туршилтын бүлгийн хулганы уушгины бүтэцтэй ойролцоо байгаа нь тодорхойлогдлоо.[9]

Түүнчлэн Q Yang (2006) нар C57BL/6J омгийн хулганад $0.2\text{-}0.4*10^6$ MC38 эсээр хавдрын загвар үүсгэн, гистологи шинжилгээгээр уушгины зураглалыг үнэлэхэд хавдрын эс хоорондын холбоо сул, лейкоцит эс ихэссэн нь бидний судалгааны үр дүнтэй ойролцоо байлаа.[10] Энэ нь нэг омгийн хулгана, нэг төрлийн шугаман эс болон хавдрын эсийн тун ойролцоо байсан зэрэг нөлөөлсөнтэй холбоотой гэж үзэж байна.

Судлаач Nevena Ilieva (2022) нар бүдүүн шулуун гэдэсний хорт хавдрын үеийн CK20, CK7, CDX2 илрэлийг иммуногистохимийн шинжилгээгээр судлахад эсийн цитоплазм болон эсийн мембраны уургуудад CK20 66.2% (n=47), CDX2 87.3% (n=62) тус тус эерэг илэрсэн нь бидний судалгааны ажлын иммуногистохимийн үр дүнтэй ойролцоо байгаа нь тодорхойлогдлоо.[11]

Дүгнэлт: Хулганы сүүлний венээр бүдүүн шулуун гэдэсний аденокарцинома MC38 эс тарихад уушгинд холбогч эдэн дэвсгэр бүхий гиперхроматик будагдсан, плеоморфик эс шигүү нэвчиж булчирхайлаг бүтэц бүхий хавдрын үсэрхийлэл үүсэж байна. C57BL/6J үүлдрийн хулганад MC38 хавдрын эсийн шугаман өсгөвөр ашиглан хорт хавдрын үсэрхийлэл үүсгэхэд уушгины эдэд хавдрын голомт тодорхойлогдож байгаа нь хавдрын үсэрхийллийн загварыг цаашид ашиглах боломжтойг харуулж байна.

Ном зүй:

1. *Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. Transl Oncol. 2021;14(10). doi:10.1016/j.tranon.2021.101174*
2. *Global cancer burden growing, amidst mounting need for services. Accessed April 8, 2024. https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer burden-growing--amidst-mounting-need-for-services*
3. *Vatandoust S, Price TJ, Karapetis CS. Colorectal cancer: Metastases to a single organ. World J Gastroenterol. 2015;21(41):11767. doi:10.3748/WJG.V21.I41.11767*
4. *Colorectal Cancer — Cancer Stat Facts. Accessed April 13, 2024. https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html*
5. *Smith JJ, Deane NG, Wu F, et al. Experimentally Derived Metastasis Gene Expression Profile Predicts Recurrence and Death in Patients With Colon Cancer. Gastroenterology. 2010;138(3):958. doi:10.1053/J.GASTRO.2009.11.005*
6. *Li H, Fan X, Stoicov C, et al. Human and mouse colon cancer utilizes CD95 signaling for local growth and metastatic spread to liver. Gastroenterology. 2009;137(3). doi:10.1053/J.GASTRO.2009.06.004*
7. *Shi FF, Gunn GR, Snyder LA, Goletz TJ. Intradermal vaccination of MUC1 transgenic mice with MUC1/IL-18 plasmid DNA suppresses experimental pulmonary metastases. Vaccine. 2007;25(17):3338-3346. doi:10.1016/J.VACCINE.2007.01.007*
8. *Shrestha N, Lateef Z, Martey O, et al. Does the mouse tail vein injection method provide a good model of lung cancer?. F1000Res. 2019;8. doi:10.12688/F1000RESEARCH.17964.1/DOI*
9. *Rashid OM, Nagahashi M, Ramachandran S, et al. Is tail vein injection a relevant breast cancer lung metastasis model? J Thorac Dis. 2013;5(4). doi:10.3978/J.ISSN.2072-1439.2013.06.17*
10. *Yang Q, Goding S, Hagenaars M, et al. Morphological appearance, content of extracellular matrix and vascular density of lung metastases predicts permissiveness to infiltration by adoptively transferred natural killer and T cells. Cancer Immunol Immunother. 2006;55(6):699-707. doi:10.1007/S00262-005-0043-4*
11. *Ilieva N, Tashkova D, Staykov D, et al. Immunohistochemical Expression of CK20, CK7, and CDX2 in Colorectal Carcinoma in Correlation with Pathomorphological Characteristics. Folia Med (Plovdiv). 2022;64(2):214 220. doi:10.3897/folmed.64.e60950*

Establishment and evaluation of a lung metastasis model of colorectal cancer in experimental animals

Anujin D[1], Manaljav B[2], Barsbold M[2], Altanchimeg Ch[2], Otgonsuren B[2], Khuselt-Od T[3], Suvd-Erdene U[3], Enkhsaikhan L[4,5], Gansukh Ch[4], Juramt B[1]

[1]Department of Anatomy, School of Bio-Medicine, MNUMS
[2]Sci-Lab Student Club, MNUMS
[3]Students of School of Bio-Medicine, MNUMS
[4]Department of Immunology, School of Bio-Medicine, MNUMS
[5]Institute of Biomedical Sciences, MNUMS
E-mail: anujin.d@mnums.edu.mn, Tel:: +976-88099136

Background: Currently, colorectal cancer (CRC) ranks as the third most common cancer and the second leading cause of cancer-related mortality worldwide. CRC frequently metastasizes to the liver (50%), lungs (10–15%), peritoneum (4%), bones (10.7%–23.7%), brain (0.3%–6%), and spinal cord. Approximately 35% of CRC cases are diagnosed before distant metastasis, 36% upon lymph node involvement, and 23% after distant organ metastasis. Although several studies have established primary tumor models in mice in our country, there are limited studies on experimental lung metastasis models, prompting the need for this research.
Aim: To establish and evaluate a lung metastasis model of colorectal cancer in C57BL/6J mice using the MC38 cell line.
Materials and Methods: This study was conducted at the Institute of Biomedical Sciences, Mongolian National University of Medical Sciences. Approval was obtained from the Ethics Review Board of the Mongolian National University of Medical Sciences (2023/3-09) and all laboratory safety regulations and protocols were strictly followed. Male C57BL/6J mice bred at the Experimental Animal Center of Mongolian National University of Medical Sciences were used. MC38 murine colorectal carcinoma cells were cultured and injected intravenously (via the tail vein) at a concentration of 0.25×10^6 cells per mouse (n=12) to induce lung metastasis. Histological analysis was subsequently performed.
Results: Histological examination revealed significant alterations in lung tissue architecture, characterized by areas of dense infiltration by pleomorphic, hyperchromatic cells, disrupting the normal alveolar structure. No histological abnormalities were observed in other organs.
Conclusion: Intravenous injection of MC38 colorectal adenocarcinoma cells into the tail vein of C57BL/6J mice successfully induced lung metastases, characterized by hyperchromatic, pleomorphic cell infiltrates forming glandular structures within the lung parenchyma.

Keywords: Experimental animal model, Lung, C57BL/6J mouse, MC38