

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ СОЗДАНИЯ ОРТОТОПИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ РАКА ПЕЧЕНИ

Кечерюкова Т.М.<sup>1</sup>, Гурова С.В.<sup>1</sup>, Гончарова А.С.<sup>1</sup>, Максимов А.Ю.<sup>1</sup>, Галина А.В.<sup>1</sup>, Романова М.В.<sup>1</sup>, Ходакова Д.В.<sup>1</sup>, Колесников Е.Н.<sup>1</sup>, Гусарева М.А.<sup>1</sup>, Зинькович М.С.<sup>1</sup>, Шалашная Е.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: [fateyeva\\_a\\_s@list.ru](mailto:fateyeva_a_s@list.ru)

Первичные злокачественные опухоли печени характеризуются высокой частотой рецидивов и метастазирования, низким коэффициентом полного выздоровления, поэтому существует необходимость в проведении различных доклинических исследований для разработки новых терапевтических стратегий, улучшения диагностики и лечения опухолей печени. Для этого наиболее часто используют модели ксенографтов рака печени, созданные путем инъекции или имплантации человеческого опухолевого материала иммунодефицитным животным. Однако, несмотря на достаточно большое количество исследовательских работ, выполненных с использованием данных моделей, нами не были найдены публикации, освещающие преимущества и недостатки различных методов создания ортотопических моделей рака печени. В связи с этим мы провели сравнительную оценку методов создания ортотопической модели рака печени. Моделирование рака печени осуществляли при помощи инъекции клеточной линии HepG2 в левую долю печени и трансплантации опухолевого фрагмента в левую долю печени. В соответствии с выбранными методиками трансплантации опухолевого материала животные были разделены на две группы, по 8 голов в каждой. Согласно результатам лапаротомии, проведенной на 14-е сутки от начала эксперимента, имплантационный метод создания ортотопической модели рака печени продемонстрировал положительный результат: приживаемость опухолевых фрагментов в заданном сайте составила 100%, хороший показатель выживаемости – 100% и минимальная затрата времени на выполнение манипуляции. Также нами был получен неудовлетворительный результат при применении инъекционного способа создания модели: клеточная суспензия либо вытекала в брюшную полость через прокол, либо распространялась по всей печени, тем самым меняя локализацию ксенографта, показатель приживаемости составил 50%. Согласно полученным результатам, наиболее эффективным методом создания ортотопической модели ГЦК оказался имплантационный.

Ключевые слова: рак печени, гепатоцеллюлярная карцинома, ксенографт, иммунодефицитные животные, клеточные линии.

## COMPARATIVE ASSESSMENT OF METHODS TO CREATE ORTHOTOPIC MODEL OF LIVER CANCER

Kecheryukova T.M.<sup>1</sup>, Gurova S.V.<sup>1</sup>, Goncharova A.S.<sup>1</sup>, Maksimov A.Yu.<sup>1</sup>, Galina A.V.<sup>1</sup>, Romanova M.V.<sup>1</sup>, Khodakova D.V.<sup>1</sup>, Kolesnikov E.N.<sup>1</sup>, Gusareva M.A.<sup>1</sup>, Zinkovich M.S.<sup>1</sup>, Shalashnaya E.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: [fateyeva\\_a\\_s@list.ru](mailto:fateyeva_a_s@list.ru)

Primary malignant liver tumors are characterized with high rates of recurrence and metastasis and low rate of full recovery, and various preclinical studies are required to develop new therapeutic strategies and improve the diagnosis and treatment of liver tumors. For this purpose, models of liver cancer xenografts created by injection or implantation of human tumor material into immunodeficient animals are most often used. However, despite the rather large number of studies conducted using these models, we have not found publications highlighting the advantages and disadvantages of various methods for creating orthotopic models of liver cancer. In this regard, we performed a comparative assessment of methods to create an orthotopic model of liver cancer. The liver cancer model was established by injecting the HepG2 cell line into the left lobe of the liver and transplanting the tumor fragment into the left lobe of the liver. In accordance with the chosen methods of the tumor material transplantation, the animals were divided into two groups, 8 animals in each. Laparotomy performed on the 14th day from the start of the experiment demonstrated that the implantation method for creating an orthotopic model of liver cancer showed a positive result: the survival rate of tumor fragments at the intended site was 100%, a good survival rate of 100%, and the minimum time required to perform the manipulation. At the same time, the injection method of creating the model showed an unsatisfactory result: the cell suspension either leaked into the abdominal cavity through a puncture or spread throughout the liver, thereby changing the site of the xenograft;

**the tumor fragment survival rate was 50%. The results confirmed that implantation was the most effective method for creating an orthotopic model of hepatocellular carcinoma.**

---

Keywords: liver cancer, hepatocellular carcinoma, xenograft, immunodeficient animals, cell lines.

Первичные злокачественные опухоли печени занимают лидирующие позиции по распространенности и смертности в структуре онкологических заболеваний [1]. Наиболее распространенным типом первичного рака печени является гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК). Данная патология характеризуется высокой частотой рецидивов и метастазирования, низким коэффициентом полного выздоровления, который обусловлен поздним проявлением симптомов, высокой резистентностью к химио- и таргетной терапии [2]. Несмотря на прогресс в применении различных вариантов хирургических и консервативных методов лечения ГЦК, прогноз остается неблагоприятным, особенно на поздних стадиях заболевания. Как было установлено, лучшим вариантом химиотерапии для запущенных форм первичного рака печени является сорафениб, представляющий собой мультикиназный ингибитор, тем не менее даже применение этого препарата не способно продлить медиану времени до прогрессирования более чем на 3 месяца [3].

Таким образом, существует необходимость в проведении различных доклинических исследований для разработки новых терапевтических стратегий, улучшения диагностики и лечения опухолей печени. Наиболее часто используемыми для доклинических исследований тест-системами *in vivo* являются модели ксенографтов рака печени, созданные путем инъекции или имплантации человеческого опухолевого материала иммунодефицитным животным [4; 5].

Из литературных источников известны модель подкожной инъекции клеточных линий опухоли печени и модель подкожной трансплантации ГЦК в правый или левый бок иммунодефицитным мышам. Данные способы создания ксенографта имеют преимущество, которое состоит в удобстве мониторинга динамики роста опухолевого узла. Однако, согласно ряду исследований, подкожные гетеротопические модели не несут в себе тождественного отражения поведения опухоли печени, так как помещены в чужеродное микроокружение, кроме того, при подкожной имплантации клеток ГЦК редко возникают спонтанные метастазы, это является существенным недостатком указанной модели, что необходимо учитывать в случаях, когда объектом научного исследования является механизм метастазирования и связанные с ним возможные терапевтические мишени [6; 7].

Для преодоления этого недостатка были разработаны ортотопические модели, создание которых предполагает имплантацию или инъекцию опухолевого материала в соответствующий анатомический сайт. Существующие модели, основанные на инъекции опухолевых клеток ГЦК, а также на трансплантации фрагмента опухоли рака печени при

помощи подшивания либо погружения опухолевого фрагмента в печени иммунодефицитных мышей, широко используются как в экспериментальных, так и доклинических исследованиях [8-10]. Но, несмотря на достаточно большое количество работ, выполненных с использованием данных моделей, нами не были найдены публикации, освещающие преимущества и недостатки различных методов создания ортотопических моделей рака печени.

В связи с этим целью нашей работы стало выполнение сравнительной оценки методов создания ортотопической модели первичного рака печени.

## **Материалы и методы исследования**

### *Животные и их содержание*

В ходе эксперимента использовали самцов мышей линии Balb/c Nude в возрасте 10-12 недель, средний вес которых составлял 27 г. Животные были получены из собственного разведения вивария Испытательного лабораторного центра ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. Мышей содержали в индивидуальных вентилируемых клетках, корм и вода были предоставлены без ограничений. Все манипуляции, проведенные в рамках исследования, были выполнены согласно этическим принципам, установленным Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETSN 123, Страсбург, 18 марта 1986 г). Протокол исследования был одобрен локальным биоэтическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России.

### *Культура клеток*

Клетки рака печени человека HepG2 культивировали согласно стандартной методике на флаконе T75 в культуральной питательной среде DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific), содержащей 10% телячьей сыворотки (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 1% пенициллина и стрептомицина, в CO<sub>2</sub> -инкубаторе (Thermo Fisher Scientific, 8000W) с влажной атмосферой при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

### *Техника создания ортотопической модели ГЦК путем введения клеточной линии HepG2 в левую долю печени*

Хирургические манипуляции проводили в стерильных условиях. По достижении необходимой глубины наркоза производили иссечение кожи и брюшной стенки по белой линии живота размером от 30 мм и обнажали левую долю печени. Опухолевую культуру клеток линии HepG2 в количестве 3 млн клеток в 50 мкл питательной среды DMEM без сыворотки и антибиотиков вводили стерильным, одноразовым инсулиновым шприцом в левую долю печени. По достижении гемостаза печень возвращали в брюшную полость согласно ее анатомическому положению. Брюшную стенку и кожу ушивали непрерывным хирургическим швом.

### *Техника создания ортотопической модели ГЦК путем трансплантации фрагмента опухоли в левую долю печени*

Эксперимент проводили в стерильных условиях. Предварительно двум мышам вводили культуру клеток линии HepG2 в количестве 5 млн клеток в 200 мкл питательной среды DMEM без сыворотки и антибиотиков подкожно в правый бок. По достижении подкожными опухолями диаметра 1-1,5 см, животных эвтаназировали, опухолевые узлы извлекали и делили на маленькие фрагменты для последующей трансплантации в печень. По достижении необходимой глубины наркоза животным-реципиентам выполняли лапаротомию, с последующим смещением в каудальном направлении желудка и двенадцатиперстной кишки, для лучшего доступа к левой доле печени, в которой производили надрез. Стерильным анатомическим пинцетом произвели трансплантацию опухолевого фрагмента размером 1 мм<sup>3</sup> в заданный сайт. Операционную рану ушивали непрерывным хирургическим швом.

#### *Анестезия*

Все хирургические вмешательства в данном эксперименте проводили с использованием внутримышечной инъекционной анестезии таких ветеринарных препаратов, как «Ксила» в дозе 20 мг/кг, «Золелил-100» в дозе 50 мг/кг.

#### *Оценка роста опухолевых узлов*

Измерение линейных размеров опухолевых узлов осуществляли в ходе диагностической лапаротомии при помощи штангенциркуля на 14-е сутки после проведения манипуляций. Определение объема опухолевого узла производили по формуле:

$$V=LW^2/2,$$

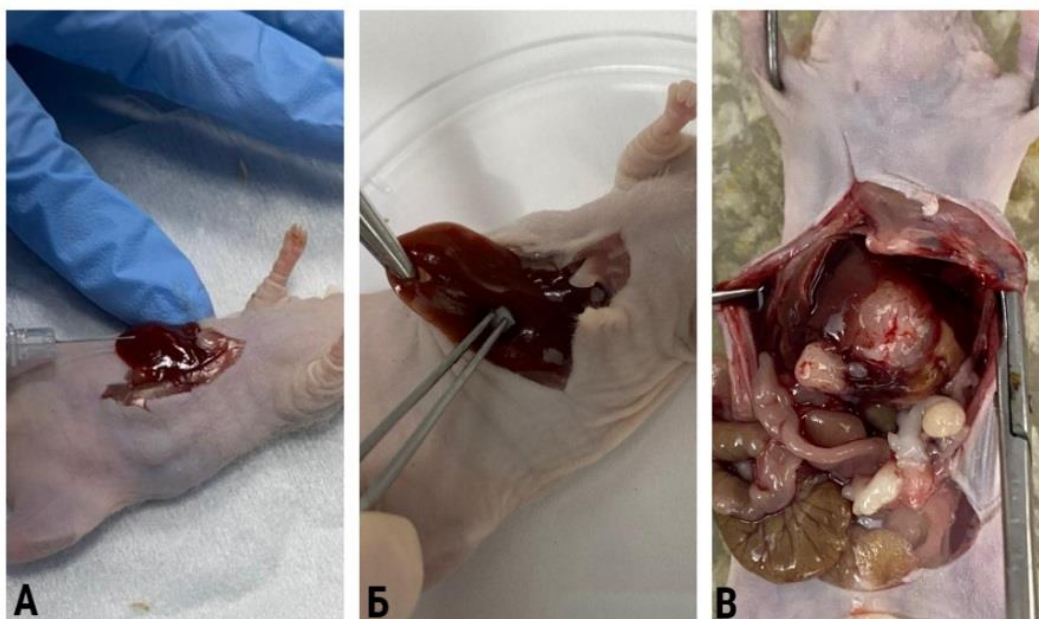
где  $L$ ,  $W$ , – линейные размеры опухоли.

#### *Статистические данные*

Полученные данные анализировали при помощи пакета программ Statistica 10.0. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  ошибка среднего.

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

Моделирование рака печени осуществляли двумя способами: при помощи инъекции клеточной линии HepG2 в левую долю печени и трансплантации опухолевого фрагмента в левую долю печени (рисунок). В соответствии со способом трансплантации опухолевого материала животные были разделены на две группы, по 8 голов в каждой.



*Способы создания ортотопической модели ГЦК. А - введение клеточной линии HepG2 в левую долю печени; Б – трансплантация опухолевого фрагмента в левую долю печени; В – образовавшийся на 14-й день после трансплантации опухолевый узел в левой доле печени*

При применении инъекционного способа создания модели в процессе диагностической лапаротомии у 4 из 8 мышей были обнаружены опухолевые новообразования в печени, при этом только у 1 животного новообразование было сформировано в виде узла округлой формы в тканях левой доли печени. У остальных 3 животных ксенографты рака печени сформировались в различных анатомических зонах в виде вытянутых образований с неровными краями, что затрудняет измерение и сопоставление динамики роста по стандартным формулам. Можно предположить, что полученный неудовлетворительный результат связан с вытеканием клеточной суспензии через прокол, образовавшийся в результате инъекции, что приводит к формированию новообразований со сложными для измерения формами. Кроме того, клеточная суспензия, попадая в брюшную полость, способна образовывать опухолевые узлы в других органах и тканях животного. Также стоит отметить, что опухолевые клетки могут распределяться по всему объему доли печени, тем самым создавая вариабельность анатомического расположения опухолевого узла.

Инъекционный способ является достаточно распространенным методом создания ортотопической модели рака печени, в частности, он описан в работах по изучению влияния микроокружения на туморогенность клеточных линий [11], изучению иммунологических противоопухолевых препаратов [12] и новых химиотерапевтических агентов [13]. При этом формирование множественных опухолевых узлов или опухолей сложных форм при применении инъекционного способа было отмечено и описано в работе китайских

исследователей, что, однако, авторы интерпретируют не как методологические особенности, а как характеристику, соответствующую той или иной клеточной линии [13]. В частности, авторы указали, что опухоли, полученные путем инъекции клеточной линии Нер3В, не ограничивались ростом только в инъецированных долях печени, но были обнаружены и в других долях (27%), а при имплантации клеток SK-HEP-1 и DLD-1 50% и 40% мышей имели более одного опухолевого узла в печени соответственно [13]. Также авторы отмечают наличие метастазов в брюшной полости в 31% случаев при использовании SK-HEP-1, что, однако, по нашему мнению, вероятно, может быть следствием непреднамеренного попадания клеточной суспензии в брюшную полость сразу после выполнения процедуры, а не результатом реализации механизма метастазирования из сформированного первичного опухолевого узла.

При создании ортотопической модели ГЦК путем трансплантации фрагмента опухоли в левую долю печени нами были получены следующие результаты. Проведение на 14-е сутки диагностической лапаротомии продемонстрировало 100% приживаемость трансплантируемого фрагмента в заданном сайте. Техника создания данной модели подверглась доработке с нашей стороны. Это было необходимо, так как при погружении фрагмента в созданный надрез ток крови не способствовал его фиксации, как указано в некоторых источниках [10], а, наоборот, приводил к изменению местоположения трансплантируемого опухолевого фрагмента. Для предотвращения этого недостатка нами была предложена модификация способа трансплантации опухолевого фрагмента, заключающаяся в наложении гемостатической губки «Тахокомб», которая не только останавливала кровотечение, созданное в результате надреза в левые доли печени, но и гарантировала нахождение фрагмента опухоли в заданном сайте.

Результаты, отражающие все интересующие нас параметры, соответственно каждому из рассмотренных нами методов представлены в таблице.

Характеристика методов создания ортотопической модели ГЦК

Способ создания	Инъекция клеточной линии НерG2 в левую долю печени	Трансплантация опухолевого фрагмента в левую долю печени
Количество животных в группе	8	8
Количество прижившихся ксенографтов	4/8	8/8
Расположение опухоли (кол-во животных с указанным расположением)	Ткани левой доли печени (1/8), Над левой долей печени (2/8)	Ткани левой доли печени (8/8)

опухоли/общее кол-во животных)	Между долями печени (1/8) Нет опухоли (4/8)	
Средний объем ортотопических ксенографтов на 14-е сутки, мм <sup>3</sup>	118 ± 13,8	170,44±15,04
Выживаемость	100%	100%

Стоит отметить, что метод трансплантации фрагмента опухоли для создания ортотопической модели рака печени в литературе встречается не так часто, как инъекционный метод, что, вероятно, связано с необходимостью выполнения дополнительного этапа создания подкожного опухолевого узла, фрагменты которого затем используют для трансплантации непосредственно в печень. Этот метод создания ортотопической модели рака печени применяли в работе по изучению неоваскулогенеза гепатоцеллюлярной карциномы, при этом авторы акцентируют внимание на характер развития опухолевых сосудов в динамике, оценивая их диаметр и плотность [14]. Авторы показали увеличение объема опухоли, объема и плотности опухолевых сосудов на 1-4-й неделе, при этом, несмотря на постоянное увеличение количества новых сосудов, скорость роста опухоли опережала скорость роста сосудов [14]. Продемонстрированные данные могут иметь ключевое значение при интерпретации результатов оценки эффективности противоопухолевых препаратов, механизм действия которых направлен на подавление ангиогенеза, при этом важно отметить, что выполнить подобного рода работу, используя инъекционный метод, по нашему мнению, было бы затруднительно в связи с тенденцией к формированию опухолевых образований сложных геометрических форм или множественных опухолевых узлов вследствие неравномерного распределения жидкой клеточной суспензии в тканях печени.

### **Заключение**

Согласно литературным источникам, на сегодняшний день разработано большое количество методов создания ортотопической модели ГЦК, однако каждый из них имеет определенный ряд недостатков. В рамках нашего исследования подверглись сравнению 2 способа создания ортотопической модели рака печени - инъекционный и имплантационный. Согласно нашим данным, наиболее эффективным методом создания ортотопической модели ГЦК оказался имплантационный, который продемонстрировал 100% приживления трансплантируемого материала в заданный сайт, простоту выполнения манипуляции, хорошую выживаемость. Ортотопические модели, полученные при помощи имплантации фрагмента опухоли в печень лабораторным мышам, рекомендованы к использованию как для

экспериментальных работ в области фундаментальной науки, так и для доклинических исследований новых препаратов для лечения ГЦК.

### Список литературы

1. He L., Tian D.A., Li P.Y., He X.X. Mouse models of liver cancer: Progress and recommendations // *Oncotarget*. 2015. Vol. 6. № 27. P. 23306-23322. DOI: 10.18632/oncotarget.4202.
2. Vogel A., Meyer T., Sapisochin G., Salem R., Saborowski A. Hepatocellular carcinoma // *Lancet*. 2022. Vol. 400. P. 1345-1362. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)01200-4.
3. Ludwig A.D., Labadie K.P., Seo Y.D., Hamlin D.K., Nguyen H.M., Mahadev V.M., Yeung R.S., Wilbur D.S., Park J.O. Yttrium-90-labeled anti-glypican 3 radioimmunotherapy halts tumor growth in an orthotopic xenograft model of hepatocellular carcinoma // *Journal of Oncology*. 2019. P. 1-7. DOI: 10.1155/2019/4564707.
4. Кит О.И., Владимирова Л.Ю., Сторожакова А.Э., Снежко Т.А., Калабанова Е.А., Саманева Н. Ю., Светицкая Я. В., Кабанов С. Н. Роль мультидисциплинарного подхода в лечении гепатоцеллюлярного рака печени // *Современная онкология*. 2019. Т. 21, № 4. С. 10-14. DOI:10.26442/18151434.2019.4.190694.
5. Киблицкая А.А., Карасев Т.С., Гончарова А.С., Максимов А.Ю. Пути моделирования опухолевого роста у мышей в экспериментальных исследованиях рака желудка человека // *Южно-российский онкологический журнал*. 2021. Т. 2, № 4. С. 26-37. DOI: 10.37748/2686-9039-2021-2-4-4.
6. Kageyama K., Ohara M., Saito K., Ozaki S., Terai M., Mastrangelo M.J., Fortina P., Aplin A.E., Sato T. Establishment of an orthotopic patient-derived xenograft mouse model using uveal melanoma hepatic metastasis // *Journal of translational medicine*. 2017. Vol. 15. P. 1-19. DOI: 10.1186/s12967-017-1247-z.
7. Gu C.Y., Lee T.K.W. Preclinical mouse models of hepatocellular carcinoma: an overview and update // *Experimental Cell Research*. 2022. P. 1-7. DOI: 10.1016/j.yexcr.2022.113042.
8. Sugase T., Lam B.Q., Danielson M., Terai M., Aplin A.E., Gutkind J.S., Sato T. Development and optimization of orthotopic liver metastasis xenograft mouse models in uveal melanoma // *Journal of Translational Medicine*. 2020. Vol. 18. № 1. P. 1-14. DOI: 10.1186/s12967-020-02377-x.
9. Tan K.V., Yang X., Chan C.Y., Shi J., Chang H.C., Chiu K.W., Man K. Non-invasive PET/MR Imaging in an Orthotopic Mouse Model of Hepatocellular Carcinoma // *Journal of Visualized Experiments: Jove*. 2022. № 186. P. 1-8. DOI: 10.3791/63958.



10. Nishino H., Hollandsworth H.M., Sugisawa N., Yamamoto J., Tashiro Y., Inubushi S., Hamada K., Sun Y.U., Lim H., Amirfakhri S., Filemoni F., Hoffman R.M., Bouvet M. Sutureless surgical orthotopic implantation technique of primary and metastatic cancer in the liver of mouse models // *In vivo*. 2020. Vol. 34. № 6. P. 3153-3157. DOI: 10.21873/invivo.12149.
11. Pandit H., Li Y., Zheng Q., Guo W., Yu Y., Li S., Martin R. C. Carcinogenetic initiation contributed by EpCAM+ cancer cells in orthotopic HCC models of immunocompetent and athymic mice // *Oncotarget*. 2020. Vol. 11. № 22. P. 2047-2060. DOI: 10.18632/oncotarget.27454.
12. Ou D.L., Lin Y.Y., Hsu C.L., Lin Y.Y., Chen C.W., Yu J.S., Miaw S.C., Hsu P.N., Cheng A.L., Hsu C. Development of a PD-L1-expressing orthotopic liver cancer model: implications for immunotherapy for hepatocellular carcinoma // *Liver Cancer*. 2019. Vol. 8. № 3. P. 155-171. DOI: 10.1159/000489318.
13. Ma S.H., Chen G.G., Yip J., Lai P.B.S. Therapeutic effect of  $\alpha$ -fetoprotein promoter-mediated tBid and chemotherapeutic agents on orthotopic liver tumor in mice // *Gene therapy*. 2010. Vol. 17. № 7. P. 905-912. DOI: 10.1038/gt.2010.34.
14. Li B., Zhang Y., Wu W., Du G., Cai L., Shi H., Chen S. Neovascularization of hepatocellular carcinoma in a nude mouse orthotopic liver cancer model: a morphological study using X-ray in-line phase-contrast imaging // *BMC cancer*. 2017. Vol. 17. № 1. P. 1-11. DOI: 10.1186/s12885-017-3073-3.