

МОДЕЛИ РАКА ПЕЧЕНИ IN VIVO

Гурова С.В.¹, Кечерюкова Т.М.¹, Гончарова А.С.¹, Колесников Е.Н.¹, Кожушко М.А.¹, Татимов М.З.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: fateyeva_a_s@list.ru

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) является распространенной формой первичного рака печени и имеет высокий уровень смертности из-за ограниченных возможностей лечения. Этиология этого онкологического заболевания связана с инфекциями, вызванными вирусом гепатита С или В, употреблением алкоголя, курением, ожирением, неалкогольной жировой болезнью печени, диабетом. В развитии ГЦК участвуют многочисленные клеточные механизмы, которые включают в себя нарушение регуляции клеточного цикла и апоптоза, молекулярные пути, связанные с воспалением, процессы фиброгенеза. Все они, в свою очередь, представляют собой важные молекулярные мишени для разработки новых лекарственных препаратов. Животные модели сыграли одну из ключевых ролей в биомедицинских исследованиях и являются необходимыми инструментами для изучения и понимания патогенеза опухолевых заболеваний. Создание моделей ГЦК на животных необходимо как для фундаментальных, так и для трансляционных исследований. Лабораторная мышь представляет собой одну из лучших экспериментальных систем за счет физиологического, молекулярного и генетического сходства с человеком. Химически индуцированные модели, ксенографты, аллографты, генетически модифицированные мыши (GEM) являются ценными инструментами для выявления потенциальных биомаркеров заболевания, поиска мишеней, оценки новых терапевтических препаратов в доклинических испытаниях и разработки новых методов лечения. В данном обзоре мы рассмотрим наиболее используемые экспериментальные модели для изучения ГЦК.

Ключевые слова: рак печени, гепатоцеллюлярная карцинома, ксенографт, аллографт, модели генетически модифицированных мышей, диэтилнитрозамин индуцированный гепатокарциногенез.

MODELS OF LIVER CANCER IN VIVO

Gurova S.V.¹, Kecheryukova T.M.¹, Goncharova A.S.¹, Kolesnikov E.N.¹, Kozhushko M.A.¹, Tatimov M.Z.¹

¹National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: fateyeva_a_s@list.ru

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a common form of primary liver cancer with high mortality rates due to limited treatment options. The etiology of this cancer is associated with infections caused by the hepatitis C or B viruses, alcohol consumption, smoking, obesity, non-alcoholic fatty liver disease, and diabetes. Numerous cellular mechanisms are involved in the development of HCC, including dysregulation of the cell cycle and apoptosis, molecular pathways associated with inflammation, and fibrogenesis processes. All of them, in turn, are important molecular targets for the development of new drugs. Animal models have played a key role in biomedical research and are essential tools for studying and understanding the pathogenesis of cancers. The creation of animal models of HCC is necessary for both fundamental and translational research. The laboratory mouse is one of the best experimental systems due to its physiological, molecular and genetic similarity to humans. Chemically induced models, xenografts, allografts, and genetically modified mice (GEM) are valuable tools for identifying potential disease biomarkers, targeting, evaluating new therapeutics in preclinical trials, and developing new treatments. In this review, we consider the most commonly used experimental models for HCC research.

Keywords: liver cancer, hepatocellular carcinoma, xenograft, allograft, genetically modified mouse models, diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis.

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) является распространенной формой первичного рака печени и занимает одну из лидирующих позиций по распространенности и смертности в структуре онкологических заболеваний. Хронические заболевания печени, вызванные вирусными инфекциями, в частности вирусом гепатита В (ВГВ) или вирусом гепатита С

(ВГС), употребление алкоголя, ожирение или их сочетание являются наиболее распространенными триггерами ГЦК [1]. Несмотря на прогресс в выявлении факторов риска и понимании этиологии заболевания, терапевтические возможности лечения данной патологии ограничены, а выживаемость после постановки диагноза крайне низка. В связи с этим существует необходимость в проведении различных исследований с использованием моделей *in vitro* и *in vivo* для разработки новых терапевтических стратегий, улучшения диагностики, предотвращения и лечения опухолей печени [1]. Однако модели *in vitro* не могут воспроизвести многие особенности опухолевого микроокружения, такие как наличие кровеносных сосудов, стромы, иммунных клеток, а также не в состоянии имитировать процесс перехода от воспалительных состояний к формированию онкопатологии, что делает животные модели важным инструментом в изучении рака печени.

Понимание молекулярных особенностей ГЦК человека и их интеграция в мышинные модели гепатокарциногенеза представляет собой один из ключевых этапов в разработке новых терапевтических стратегий [2]. В настоящее время доступен широкий спектр *in vivo* моделей рака печени, однако их универсальность ограничена по нескольким причинам. Во-первых, модели гепатокарциногенеза сильно различаются по латентному периоду и характеристикам опухоли в зависимости от того, индуцируется ли ГЦК генетическими манипуляциями, хроническим заболеванием печени или трансплантацией раковых клеток. В некоторых моделях ГЦК может развиваться за несколько недель, а в других – за месяц и более. Множество различных триггеров ГЦК и ее обширный генетический ландшафт делают невозможным создание единственной мышинной модели, которая резюмировала бы все аспекты онкопатологии человека [3]. Во-вторых, этиология рака печени довольно сложна. Факторы риска, приводящие к ГЦК, включают в себе хроническую вирусную инфекцию, алкогольный цирроз и неалкогольный стеатогепатит (или жировую болезнь печени). Данные факторы будут влиять на разные наборы генов-мишеней, которые приводят к генетической гетерогенности рака печени, что делает мышинные модели рака печени не универсальными [4]. В-третьих, различные модели могут предоставить исследователям возможность имитировать сложный многоэтапный процесс канцерогенеза печени, оценить взаимодействие «опухоль – хозяин», проводить скрининг лекарств и различных терапевтических протоколов, однако ни одна модель не является универсальной для всех целей [5].

Целью данного обзора является анализ различных вариантов мышинных моделей рака печени, используемых в настоящее время, с акцентом на их преимущества и имеющиеся ограничения.

СПОНТАННЫЕ ЖИВОТНЫЕ МОДЕЛИ ГЦК

Известно, что инбредные линии мышей различаются по своей способности к формированию спонтанных неоплазий печени [6]. Так, мыши линии СЗН и СВА в высокой степени предрасположены к спонтанным опухолям печени, тогда как у линий LP, 129, DBA/2, BALB/c и C57BL отмечается низкая частота образования опухолей, однако данная информация была опубликована в конце 1930-х – начале 1940-х гг. и на сегодняшний день могла утратить актуальность [6]. Данная модель рассматривается как плохо контролируемая и непредсказуемая система с низкой частотой заболеваемости, которая в настоящее время практически не используется, тем не менее, она может быть полезна для работ по идентификации генов предрасположенности к опухолям печени [7].

ХИМИЧЕСКИ ИНДУЦИРОВАННЫЕ МОДЕЛИ ГЦК

До возникновения имплантационных и генетически модифицированных животных моделей широко использовались химически индуцированные. Они способны обеспечить физиологически релевантное тканевое и иммунное микроокружение, связанное с развитием и прогрессированием ГЦК [8]. Химические вещества, которые используют для данного способа, представлены диэтилнитрозамином (ДЭН), афлотоксином, четыреххлористым углеродом, диметилнитрозамином и тиоацетамидом.

Наиболее часто в источниках литературы встречается модель, полученная путем воздействия ДЭН. Данное химическое вещество представляет собой гидроксिलированный α -гидроксиинитрозамин и используется с 1960-х гг. для индукции ГЦК у грызунов. ДЭН подвергается метаболической активации в гепатоцитах ферментами семейства цитохромов P450 и действует как полноценный канцероген при введении мышам моложе 2 недель, когда процесс пролиферации гепатоцитов активен [9]. При более позднем введении требуется стимулирование роста опухоли, которое можно достичь различными способами, например с помощью фенобарбитала (ФБ), четыреххлористого углерода, частичной гепатэктомии или с помощью диеты с высоким содержанием жиров HFD (high-fat diet). Предрасположенность грызунов к ДЭН-индуцированному гепатоканцерогенезу зависит от линии и их генетических особенностей. Так, мыши линии СЗН более чувствительны к ДЭН, чем C57BL/6. Однако у мышей СЗН проявляется высокая частота спонтанных опухолей печени, достигающая 50%, а у мышей линии C57BL/6 – менее 2,5%. Таким образом, исследователи могут спутать ДЭН-индуцированные опухоли печени со спонтанными опухолями [10].

При создании модели, индуцированных ДЭН, независимо от его дозы происходят гистохимические изменения от базофильных очагов до гиперпластических узлов, которые приводят к появлению гепатоцеллюлярной аденомы, а затем и к гепатоцеллюлярной карциноме, во время процесса гепатоканцерогенеза [10]. Все эти изменения тесно связаны с неопластической конверсией гепатоцитов. Сравнительная функциональная геномика

показала, что паттерны экспрессии генов в ГЦК при индуцированном диэтилнитрозамином раке печени мышей были наиболее сходны с ГЦК человека [10]. Подобно тому, что происходит у пациентов с ГЦК, эта модель характеризуется медленной многоступенчатой последовательностью, где циклы некроза и регенерации способствуют неопластической трансформации [11].

Несмотря на то что для ускорения гепатоканцерогенеза используются различные методы стимуляции роста новообразования, среднее время формирования опухоли остается достаточно длительным. Кроме того, исследователей беспокоит временная и пространственная неоднородность возникновения опухолевых узлов. Данные недостатки сильно ограничивают использование данной методики [11].

МОДЕЛИ ГЦК, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ДИЕТОЙ

Установлено, что одним из значимых факторов риска развития ГЦК являются такие заболевания, как неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) и неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) [12, с. 433–453]. Механизмы прогрессирования НАЖБП и НАСГ в ГЦК считаются многофакторными, где ключевое значение имеют накопление липидов и некрвоспалительные реакции, что породило так называемую гипотезу «двух ударов», или «множественных ударов»: накопление липидных капель в печени (первый удар) должно сопровождаться окислительным стрессом и некрвоспалением (второй удар), приводя к повреждению печени [13]. Для изучения механизмов этих патологических состояний были разработаны животные модели данных заболеваний, индуцированных диетой [13].

Для этого мышей обычно кормят одной или двумя из следующих диет *ad libitum*: диета с высоким содержанием жиров (HFD), диета с высоким содержанием жиров и высоким содержанием холестерина (HFHCD), диета с высоким содержанием жиров и высоким содержанием фруктозы (HFHFD), западная диета (WD) с высоким содержанием насыщенных жиров, холестерина и сахарозы, диета с дефицитом холина и высоким содержанием жиров (CDHFD), диета с дефицитом метионина и холина (MCD) и диета с дефицитом холина, определяемая L-аминокислотами (CDAAD) [14]. Часто, чтобы сократить время индукции опухолей, применяют комбинацию диеты и химических веществ. Но даже при таком варианте создания модели время развития ГЦК составляет от 5 до 10 месяцев, что многими рассматривается как значительный недостаток [14]. Тем не менее, индуцированные диетой модели незаменимы для воспроизведения патологических и метаболических изменений печени, наблюдаемых при ГЦК, вызванной НАЖБП и НАСГ.

ИМПЛАНТАЦИОННЫЕ МОДЕЛИ ГЦК

Имплантационные модели характеризуются коротким периодом генерации, относительно низкой стоимостью и пригодностью для оценки различных методов лечения

ГЦК. Они могут быть созданы либо путем прямой имплантации фрагментов опухолевой ткани, либо путем инокуляции клеточных линий ГЦК мышам-реципиентам. Также в зависимости от видовой принадлежности реципиента и трансплантируемого материала такие модели подразделяют на аллографты и ксенографты. В зависимости от места имплантации трансплантатов их можно разделить на два вида: эктопические (подкожные) и ортотопические [15].

Модель аллотрансплантата

Согласно литературным источникам, за последнее десятилетие клинические наблюдения показали положительный потенциал иммунотерапии для пациентов с ГЦК, в частности для рецидивирующих новообразований. В связи с этим в доклинических исследованиях принято использовать модели аллотрансплантатов, которые создаются путем имплантации мышинных клеточных линий ГЦК или фрагментов мышинных опухолей иммунокомпетентным мышам путем эктопической или ортотопической инъекции [16, 17].

Эктопические модели являются простыми в выполнении, а также предоставляют неограниченный доступ к опухоли для различных манипуляций и при мониторинге роста опухоли. Например, синергизм между лучевой терапией и блокадой иммунных контрольных точек был продемонстрирован на подкожной модели, полученной путем инъекций мышинной клеточной линии HCa-1 в бока иммунокомпетентных мышей [17]. Кроме того, эктопические модели в сочетании с GEMM использовались в исследованиях взаимодействий между опухолевыми антигенами и Т-клетками для выявления механизмов истощения CD8⁺ Т-клеток, вызванного препаратом B7S1 [18]. Однако эктопические модели не точно отражают микроокружение опухоли, поскольку резидентные иммунные и стромальные клетки значительно различаются между системами органов.

Ортотопические модели, напротив, более точно воспроизводят естественное микроокружение органа, в котором протекает онкогенез. С. Hage et al. (2019) охарактеризовали одну из таких моделей, которая включала в себя печеночную имплантацию клеток Нер-55.1с [19]. В другом исследовании имплантировали кусочки опухолевого материала, полученные путем инъекции клеточной линии Нера1–6 иммунокомпетентным мышам для тестирования экзосомных вакцин, производных дендритных клеток, экспрессирующих белок AFP. Авторы отметили замедление роста опухоли и улучшение выживаемости [20]. Ортотопические модели ГЦК технически сложны, поскольку предполагают хирургическое вмешательство, а мониторинг роста опухоли требует методов визуальной диагностики органов брюшной полости.

В качестве преимуществ имплантируемых аллотрансплантатов можно рассматривать быстрое развитие опухоли, высокую воспроизводимость и возможность одномоментного

ведения больших экспериментальных групп. Однако имплантация относительно однородных и плохо дифференцированных клеток ограничивает гетерогенность внутри опухоли и не позволяет точно воссоздать все естественные стадии онкогенеза, что является существенным недостатком таких моделей [21]. Также модели аллотрансплантантов быстро генерируют опухоли без хронического воспаления, которое обычно лежит в основе ГЦК человека. Кроме того, воспалительная реакция на саму инъекцию или на мертвые клетки может вызвать искусственный иммунный ответ [21].

Модель подкожного ксенографта

Согласно источникам литературы, подкожный ксенографт является предпочтительной моделью имплантации в доклинических исследованиях [22]. В данной модели клеточная суспензия или фрагменты опухолевой ткани человека имплантируют подкожно в бок иммунодефицитным мышам. Модель подкожного ксенографта часто применяется для тестирования новых терапевтических стратегий, исследования изменений экспрессии генов.

Из одних литературных источников известно, что модель подкожного ксенографта клеточной линии хорошо зарекомендовала себя в области изучения ГЦК [23]. Подкожная инъекция клеточных линий проста в выполнении, так как животных предварительно не нужно вводить в наркоз и совершать дополнительные хирургические манипуляции не требуется. Данный способ создания ксенографта позволяет проводить точные измерения размера опухолевого узла, мониторинг прогрессирования и эффектов воздействия различных видов лечения на новообразования [24].

Например, для изучения терапевтического эффекта конъюгированных с холестерином 2'-О-метил-модифицированных имитаторов микроРНК-375 (Chol-miR-375) X.X. He et al. (2012) инокулировали клетки HepG2 подкожно в оба бока мышам линии Balb/c Nude. Данная локализация опухоли облегчила исследователям введение терапевтического агента Chol-miR-375 и контроль динамики роста опухолевых узлов [24]. X. Zhang et al. (2022) в своем исследовании также использовали данную модель для проверки эффективности новых химических агентов на лекарственно-устойчивых опухолях. Учеными поясняется выбор данной модели удобством мониторинга воздействия терапевтических агентов на рост опухолевых узлов [25].

Согласно источникам литературы, результаты, полученные с помощью этой модели, демонстрируют ряд преимуществ, имеющих ключевое значение при выполнении доклинических исследований и скрининга противораковых препаратов, однако эти данные могут оказаться недостаточными для прогнозирования клинических исходов у человека. Во-первых, это может быть связано с отсутствием необходимого микроокружения опухоли печени [26]. Во-вторых, среда культивирования *in vitro* клеточных линий ГЦК человека сильно

отличается от естественных условий развития ГЦК человека. Следовательно, клеточные линии ГЦК не являются тождественными для опухолевых клеток, полученных от пациентов с ГЦК, так как фенотипические и генотипические характеристики могут значительно отличаться [26].

В связи с этим, помимо создания ксенографтов рака печени путем инъекции клеточной линии, существует способ имплантации образца человеческого опухолевого материала ГЦК иммунодефицитным животным в бок. Его особенность заключается в том, что животных вводят в наркоз и производят хирургические манипуляции.

Явным преимуществом этой модели является возможность изучать опухоли печени, наиболее точно воспроизводящие болезни человека, без промежуточной фазы роста *in vitro*, которая, как считается, является причиной клонального отбора и, как следствие, ведет к изменению первоначальных свойств опухолевых клеток [27].

Н. Hu et al. (2015) применили данную модель для проверки противоопухолевого эффекта специфической экспрессии Hsp70 в сочетании с клетками-киллерами, индуцированными цитокинами, в опухолевых тканях. Результаты показали, что Hsp70 и цитокин-индуцированные клетки-киллеры работали синергетически и оказывали ингибирующее действие на рост ксенографтов [28].

Н. Gao et al. (2015) создали около 1000 моделей ксенографтов с различными злокачественными новообразованиями, в том числе и ГЦК, а также протестировали 62 метода лечения по 6 показателям. С помощью этой работы исследователи смогли создать систему для прогнозирования реакции пациентов на определенные терапевтические протоколы для дальнейших клинических испытаний [29].

Поскольку фрагменты опухолевой ткани, которые используют для создания данного ксенографта, более полно сохраняют признаки ГЦК человека, результаты, полученные на таких животных моделях, могут быть более информативными по сравнению с результатами, полученными с использованием других моделей [30].

Таким образом, анализ литературных данных показал, что модели подкожного ксенографта ГЦК широко используются в большинстве доклинических исследований, однако их основным недостатком является отсутствие взаимодействия между опухолью и тканями печени. Кроме того, нарушение микроокружения может повлиять на биологическое поведение злокачественных клеток, что способно привести к неверной интерпретации результатов.

Ортотопические модели ксенографтов

Ортотопические модели ксенографтов можно получить при помощи инъекции опухолевых клеток и хирургической трансплантации фрагмента опухоли в анатомически соответствующий орган. Как известно из литературных источников, многие линии

опухолевых клеток, трансплантированные подкожно, не вызывают спонтанного образования метастазов, однако метастазирование может быть индуцировано в ортотопической модели [30, 31].

Для предотвращения диспергирования клеток принято проводить инъекцию с добавлением матригеля для создания единой солидной опухоли в заданном сайте. Однако, согласно литературным источникам, даже при наличии матригеля клеточная суспензия способна вытекать из заданного органа и образовывать множественные рассеянные опухоли [32].

C. Hage et al. (2019) в своей работе использовали как инъекционный метод, так и хирургическую трансплантацию для создания ортотопических мышинных моделей гепатоцеллюлярной карциномы. При инъекции опухолевых клеток исследователи отмечали высокую скорость роста опухоли с коротким латентным периодом. Однако инокуляция клеток в долю печени приводила к диссеминации опухолевых клеток в легкое, что вызвало образование множественных новообразований за пределами печени, которые обуславливали развитие кахексии и резкое сокращение продолжительности жизни. При хирургической имплантации фрагментов опухоли в печень мышей также отмечали высокую степень роста, однако отличительной чертой данного способа является отсутствие диссеминации раковыми клетками соседних органов, что для исследователей считается важным аспектом при создании пациентоподобной модели рака печени у мышей [32].

В своей работе K.V. Tan et al. (2022) использовали ортотопическую модель ГЦК, созданную путем подшивания к левой доле печени опухолевого материала, для создания протокола индукции гипоксии опухоли и оценки опухолевого метаболизма *in vivo* с использованием фторомизонидазола. Однако, как отмечено исследователями, печень мышей тонкая и склонна кровоточить при любом механическом повреждении, в частности при наложении швов, что привело к падежу животных [33].

H. Nishino et al. (2020) в своей работе разработали протокол создания ортотопической модели ГЦК путем формирования печеночного кармана у иммунодефицитных мышей. Согласно авторам, данный способ подходит для исследований первичного рака печени и имитации метастазирования в печень благодаря высокой скорости приживления [34].

Ортотопические модели за последние несколько лет привлекли повышенное внимание в доклинических исследованиях рака. Они играют одну из решающих ролей в оценке эффективности таргетных противоопухолевых препаратов, мишенью которых являются микроокружение или сигнальные пути, связанные с метастазированием. Однако у данной модели есть и ряд недостатков. Создание ортотопического ксенографта – технически сложный процесс. Выполнение дополнительного этапа создания подкожного опухолевого узла,

фрагмент которого затем используют для трансплантации непосредственно в печень, увеличивает время создания модели. Также для мониторинга опухолевых узлов необходим дополнительный комплекс оборудования для визуализации (например, компьютерный томограф).

ГЕНЕТИЧЕСКИ ИНЖЕНЕРНЫЕ МОДЕЛИ ГЦК

Развитие генетики и молекулярной биологии способствовало созданию трансгенных или генетических инженерных моделей (GEMM, genetically engineered mouse models), которые являются подходящим объектом для изучения роли тех или иных генов и связанных с ними сигналингов, играющих важную роль в процессе развития опухолей. Первые работы по созданию GEMM мышей для исследований молекулярных сигнальных путей и их роли в формировании злокачественных опухолей человека были выполнены в 1980-х гг. [35].

Такие модели характеризуются сверхэкспрессией онкогенов или, напротив, инактивацией генов-онкосупрессоров, а также экспрессией генов вирусов, связанных с канцерогенезом печени. На сегодняшний день существует большое количество методологических приемов, позволяющих осуществлять манипуляции с геномом и регулировать экспрессию интересующих генов [36, 37]. Один из наиболее ранних подходов к созданию трансгенных мышей основан на выполнении переноса фрагмента чужеродной ДНК в одноклеточный эмбрион, следствием чего является конститутивная экспрессия целевого гена [36, 37]. Таким образом, эмбрион развивается во взрослую особь, организм которой может экспрессировать целевой ген во всех своих клетках и даже передавать его своим потомкам. Однако у этого подхода есть несколько недостатков. Основным из них является феномен эмбриональной смерти. Конститутивная, особенно билатеральная экспрессия некоторых генов может приводить к гибели в эмбриональном периоде, что делает невозможным изучение влияния мутаций на развитие опухоли у взрослых особей. Кроме того, не исключена индукция различных патологий за пределами интересующих тканей [37]. Еще одним недостатком этого подхода является невозможность контролировать уровень и характер экспрессии трансгена из-за случайного числа трансгенных копий и сайтов интеграции, что вызывает особую озабоченность, поскольку возможно возникновение неожиданного фенотипа в результате вторичных эффектов интеграции трансгена в чувствительные геномные сайты [37]. Конститутивные модели трансгенных мышей не могут имитировать спорадический многоэтапный онкогенез, потому что иницирующая мутация присутствует во всем организме с самого начала развития. С появлением условной и индуцируемой системы экспрессии генов исследователи получили более разумные подходы, позволяющие индуцировать соматические мутации тканеспецифическим и контролируемым во времени образом [38]. В частности, так называемая условная система экспрессии генов,

осуществляемая при помощи промоторов, специфичных для печени, которые управляют экспрессией онкогенов, позволяет влиять на экспрессию некоторых генов только в печени. К ним относят промоторы альбумина, металлотионеина, транстиретин и протеина LAP (liver activator protein) [38].

При использовании этого методологического подхода с применением энхансера/промотора альбумина были разработаны трансгенные мыши, которые специфически экспрессировали с-Мус в печени. В этом эксперименте экспрессия с-Мус привела к дисфункции печени от легкой до тяжелой степени у молодых мышей и гепатобластоме у старых [38, 39].

Далее, в более поздних работах по изучению сигнальных путей и их влиянию на туморогенез, была разработана модель с двойным трансгеном с использованием энхансера/промотора альбумина для с-Мус и промотора металлотионеина 1 для трансформирующего фактора роста альфа (TGF- α) в целях исследования взаимодействия между с-Мус и TGF- α и их роли в развитии ГЦК [39]. Эта модель характеризуется значительно более коротким промежутком времени формирования ГЦК по сравнению с трансгенными мышами, экспрессирующими с-Мус или TGF- α по отдельности. С использованием данной методики были разработаны также и другие трансгенные мыши, при помощи которых была убедительно продемонстрирована роль ряда онкогенов [39].

Применение специфичного для печени промотора позволяет онкогену экспрессироваться тканеспецифично в клетках печени, однако экспрессия онкогена с момента раннего эмбрионального развития может вызвать эмбриональную гибель или неожиданные аномальные характеристики, которые способны привести к отклонению модели от ГЦК человека. Исправить этот недостаток можно с помощью систем, которые осуществляют временной контроль экспрессии генов-мишеней, таких как регулируемая тамоксифеном или тетрациклином, а также система рекомбинации Cre-loxP [39].

В частности, тетрацилин-контролируемая система позволяет обратимо включать (Tet-On) и выключать (Tet-Off) экспрессию генов в присутствии тетрацилина или его производного доксициклина. Эта методика была использована при разработке трансгенной модели, которая экспрессировала с-Мус в печени, но не при введении доксициклина (модель Tet-Off с-Мус) [39]. Рак печени развивался у всех трансгенных мышей с повышенной экспрессией с-Мус примерно через 12 недель, однако через 4 дня после введения доксициклина клетки рака печени дифференцировались в нормальные гепатоциты с апоптозом и почти все были элиминированы в течение 2 недель [39]. С использованием другого варианта индуцированной экспрессии генов, а именно системы, контролируемой тамоксифеном, были получены трансгенные мыши, которые экспрессировали структурные

белки вируса гепатита С (core, E1, E2 и p7) при внутрибрюшинной инъекции тамоксифена [40]. Основным недостатком этой системы является токсичность тамоксифена: его избыточное количество может привести к летальному исходу или вызвать повреждение определенных тканей, таких как матка [40].

Еще одна генетическая манипуляция для создания трансгенных животных – система рекомбинации Cre-loxP [40]. Рекомбинация Cre-LoxP представляет собой сайт-специфическую рекомбиназную технологию, позволяющую модифицировать ДНК путем выполнения делеций, вставок, транслокаций и инверсий. Система состоит из одного фермента, рекомбиназы Cre, которая взаимодействует с парой коротких последовательностей-мишеней, называемых Lox. Правильное размещение последовательностей Lox позволяет генам активироваться, подавляться или заменяться другими генами. Метод Cre-loxP использовали в работе Liang et al. (2021) для определения функциональной роли белка T-box 3 (TBX3) в онкогенезе печени [41]. По сравнению с другими индуцибельными системами, позволяющими влиять на экспрессию генов, Cre-LoxP отличается относительно низкой технической сложностью. Более того, исследователи могут добиться не только точного временного контроля, но и жесткой регуляции уровня экспрессии определенного гена [42, 43].

Также для получения мышей с модифицированным геномом используют технику гидродинамической инъекции в хвостовую вену (Hydrodynamic tail vein injection HTVI). Этот метод, позволяющий напрямую доставлять гены в печень мышей, широко используется для создания GEMM-моделей при изучении патологий печени [43]. Суть метода заключается в выполнении быстрой инъекции большого объема раствора, содержащего плазмиды ДНК, кодирующие интересующий ген, в боковую хвостовую вену мыши [43, 44]. Введенный раствор попадает непосредственно в нижнюю полую вену, вызывает преходящую дисфункцию сердца и застой в сердце, в результате чего раствор вытесняется в большую печеночную вену ретроградным движением. Гидродинамическое давление, создаваемое быстрой инъекцией, увеличивает отверстия синусоидов печени, а также проницаемость эндотелия капилляров и создает временные мембранные поры, которые позволяют плазмидам ДНК проходить через эти поры и достигать внутриклеточного компартмента гепатоцитов [43, 44]. Хотя HTVI вызывает временную дисфункцию сердца и структурную деформацию печени, это не влияет на долгосрочное состояние здоровья мышей, так как восстановление нормальных функций этих органов происходит примерно через неделю после инъекции. Метод HTVI применяли для получения трансгенных животных в работе по изучению роли РНК-связывающего мотива гена Y-хромосомы (RBMV) при ГЦК [44]. Также HTVI проводили для разработки мышечных моделей ГЦК в исследовании молекулярной передачи сигналов, которая определяет эффективность доставки лекарств в печень.

Одна из основных проблем НТВИ заключается в том, что долговременную экспрессию генов в гепатоцитах трудно поддерживать, поскольку плазмиды, доставленные в гепатоциты, будут постепенно деградировать, и экспрессия генов в конечном итоге отключится [44]. Система транспозонов «Sleeping beauty» (SB) часто используется вместе с НТВИ для решения этой проблемы, поскольку она обеспечивает хромосомную интеграцию интересующего гена и их стабильную экспрессию в гепатоцитах [44]. Для системы транспозонов SB требуются две плазмиды: одна кодирует транспозазу SB, а другая плазида функционирует как транспозон, кодирующий интересующий ген, окруженный двумя последовательностями инвертированных/прямых повторов [45]. Эти две плазмиды необходимо совместно вводить в печень при помощи НТВИ. Система транспозонов SB вместе с НТВИ обычно используется для интеграции онкогенов в геном мыши для их конститутивной сверхэкспрессии и последующей индукции развития ГЦК. В частности, систему SB применили для получения мышей с активированными протоонкогенами АКТ и *c-Met* в рамках исследования противоопухолевой эффективности остола, являющегося производным кумарина [45].

Для выполнения еще одной востребованной модификации генома, а именно нокаута генов, используют методику редактирования генов, известную как система CRISPR-Cas9 [46]. Система CRISPR-Cas9 состоит из двух компонентов: направляющей РНК (guide RNA, gRNA) и эндонуклеазы Cas9 [46]. Направляющая РНК направляет Cas9 для создания двухцепочечных разрывов в ДНК-мишени, эти разрывы устраняются механизмами репарации ДНК, как правило, путем негомологичного соединения концов [46]. Это ведет к возникновению мутации в виде небольших делеций или вставок, что приводит к потере функции и нокауту гена. Важно отметить, что для доставки CRISPR-Cas9 в печень мыши можно использовать НТВИ, чтобы точно нокаутировать гены-супрессоры опухоли и индуцировать образование ГЦК. Например, посредством использования редактирования генов на основе CRISPR в сочетании с НТВИ в гепатоцитах мыши была вызвана потеря активности гена *Pten* для изучения его роли в гепатоканцерогенезе [47].

Генно-инженерные технологии также применяют для создания трансгенных мышей, несущих гены вируса гепатита В (ВГВ) или С (ВГС), которые, как известно, являются факторами риска возникновения ГЦК [47].

Тропизм ВГВ и ВГС сильно ограничен, и мыши не могут быть инфицированы этими вирусами естественным путем, в связи с чем необходима модификация их генома, что делает их более подходящими для исследований вирус-ассоциированного гепатокарциногенеза *in vivo*.

Одна из первых трансгенных мышинных моделей со сверхэкспрессией полипептида оболочки вируса поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) была получена Chisari et al.

(1987) [48]. HBsAg-трансгенных (HBs-tg) мышей использовали для демонстрации важности адаптивной иммунной толерантности [49].

Что касается связанного с ВГС гепатокарциногенеза, Y. Kamegaya et al. (2005) разработали два варианта трансгенных мышей: одна экспрессировала только ядерный core-белок, а другая экспрессировала как core-белок, так и белки оболочки вируса E1/E2 [50]. В обеих моделях развились опухоли ГЦК, но более высокая опухолевая нагрузка наблюдалась у трансгенных мышей, которые экспрессировали как core, так и E1/E2 [50].

Анализ литературных данных показал, что за последние несколько десятилетий, безусловно, был достигнут значительный прогресс в разработке различных вариантов GEMM, способных воспроизводить молекулярно-генетические особенности, характерные для патогенеза ГЦК. Традиционная методология GEMM требует ряда трудоемких и ресурсоемких процедур, которые увеличивают время разработки новых моделей рака печени. Ожидается, что дальнейшее развитие GEM моделей расширит наши знания о генетических механизмах, лежащих в основе гепатоканцерогенеза, и обеспечит новую терапевтическую стратегию, нацеленную на гены, которые поддерживают рак печени и способствуют его развитию.

Заключение

Идеальная животная модель должна точно воспроизводить ключевые биологические особенности рака печени, адекватно имитировать микроокружение опухоли, быть доступной и простой в использовании. Все существующие модели рака печени можно рассматривать как ценные и прогностические инструменты, если их правильно использовать и принимать во внимание имеющиеся ограничения. GEMM незаменимы для изучения молекулярных механизмов развития рака печени; индуцированные модели имитируют особенности ГЦК человека, вызванной экологическими факторами и особенностями пищевого поведения, позволяя изучать воспалительные реакции и микроокружение опухоли; как подкожные, так и ортотопические ксенографты и аллогграфты могут применяться для тестирования новых терапевтических стратегий; ортотопические модели подходят для исследований процесса метастазирования ГЦК. Предполагаем, что применение комбинации нескольких вариантов моделей может представлять наиболее эффективное решение для изучения формирования, особенностей течения и лечения рака печени.

Список литературы

1. Cho K., Ro S.W., Seo S.H., Jeon, Y., Moon H., Kim D.Y., Kim, S.U. Genetically engineered mouse models for liver cancer // *Cancers*. 2019. Vol. 12. № 1. P. 14. DOI: 10.3390/cancers12010014.

2. Li X., Ramadori P., Pfister D., Seehawer M., Zender L., Heikenwalder M. The immunological and metabolic landscape in primary and metastatic liver cancer // *Nature Reviews Cancer*. 2021. Vol. 21. № 9. P. 541-557. DOI: 10.1038/s41568-021-00383-9.
3. Whitlock R.S., Yang T., Vasudevan S.A., Woodfield S.E. Animal modeling of pediatric liver cancer // *Cancers*. 2020. Vol. 12. № 2. P. 273. DOI: 10.3390/cancers12020273.
4. Кит О.И., Жукова Г.В., Максимов А.Ю., Гончарова А.С., Златник Е.Ю., Новикова И.А., Лукбанова Е.А. Гуманизированные животные как модели экспериментальной онкологии (обзор литературы) // *Сибирский онкологический журнал*. 2021. Т. 20. № 6. С. 141-150. DOI: 10.21294/1814-4861-2021-20-6-141-150.
5. Zhou Y., Xia J., Xu S., She T., Zhang Y., Sun Y., Wen M., Jiang T., Xiong Y., Lei J. Experimental mouse models for translational human cancer research // *Frontiers in Immunology*. 2023. Vol. 14. P. 25. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1095388.
6. Fornari F., Giovannini C., Piscaglia F., Gramantieri L. Animal Models of Hepatocellular Carcinoma: Current Applications in Clinical Research // *Journal of Hepatocellular Carcinoma*. 2022. P. 1263-1278. DOI: 10.2147/JHC.S347946.
7. Bao Y.L., Wang L., Pan H.T., Zhang T.R., Chen Y.H., Xu S.J., Mao X.L., Li S.W. Animal and organoid models of liver fibrosis // *Frontiers in physiology*. 2021. Vol. 12. P. 666138. DOI: 10.3389/fphys.2021.666138.
8. Liu K., Chen J., McCaughan G.W. Animal models for hepatocellular carcinoma arising from alcoholic and metabolic liver diseases // *Hepatoma Research*. 2020. Vol. 6. P. 7. DOI: 10.20517/2394-5079.2019.39.
9. You Y., Zhu F., Li Z., Zhang L., Xie Y., Chinnathambi A., Alahmadi T.A., Lu B. Phyllanthin prevents diethylnitrosamine (DEN) induced liver carcinogenesis in rats and induces apoptotic cell death in HepG2 cells // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021. Vol. 137. P. 111335. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111335.
10. Song J., Ding W., Liu B., Liu D., Xia Z., Zhang L., Cui L., Luo Y., Jia X., Feng L. Anticancer effect of caudatin in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats // *Molecular Medicine Reports*. 2020. Vol. 22. № 2. P. 697-706. DOI: 10.3892/mmr.2020.11135.
11. Zhang R., Wu T., Yang J., Liu M., Luo J, Chi Ma, Ma X.Y., Xu G., Zheng S. Effect of gambogic acid in attenuating diethylnitrosamine (DEN)-induced hepatocellular carcinoma in rat model // *Arabian Journal of Chemistry*. 2023. Vol. 16. № 4. P. 104644. DOI: 10.1016/j.arabjc.2023.104644.
12. Sivakumari K., Janani P., Rajesh S. DEN-Induced Hepatocellular Carcinoma in Animal Model // *Handbook of Animal Models and its Uses in Cancer Research*. 2022. 433 p.

13. Liu K., Chen J., McCaughan G.W. Animal models for hepatocellular carcinoma arising from alcoholic and metabolic liver diseases // *Hepatoma Research*. 2020. Vol. 6. P. 7. DOI: 10.20517/2394-5079.2019.39.
14. Fu H., Tang B., Lang J., Du Y., Cao B., Jin L., Fang M., Hu Z., Cheng C., Liu X., Shou Q. High-fat diet promotes macrophage-mediated hepatic inflammation and aggravates diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in mice // *Frontiers in Nutrition*. 2020. Vol. 7. P. 585306. DOI: 10.3389/fnut.2020.585306.
15. Ribas V., de la Rosa L.C., Robles D., Núñez S., Segalés P., Insausti-Urkia N., Solsona-Vilarrasa E., Fernández-Checa J.C., García-Ruiz C. Dietary and genetic cholesterol loading rather than steatosis promotes liver tumorigenesis and NASH-driven HCC // *Cancers*. 2021. Vol. 13. № 16. P. 4091. DOI: 10.3390/cancers13164091.
16. Macek Jilkova Z., Kurma K., Decaens T. Animal models of hepatocellular carcinoma: the role of immune system and tumor microenvironment // *Cancers*. 2019. Vol. 11. № 10. P. 1487. DOI: 10.3390/cancers11101487.
17. Pan B., Wei X., Xu X. Patient-derived xenograft models in hepatopancreatobiliary cancer // *Cancer Cell International*. 2022. Vol. 22. № 1. P. 41. DOI: 10.1186/s12935-022-02454-9.
18. Li J., Lee Y., Li Y., Jiang Y., Lu H., Zang W., Zhao X., Liu L., Chen Y., Tan H., Yang Z., Zhang M.Q., Mak T.W., Ni L., Dong C. Co-inhibitory molecule B7 superfamily member 1 expressed by tumor-infiltrating myeloid cells induces dysfunction of anti-tumor CD8⁺ T cells // *Immunity*. 2018. Vol. 48. № 4. P. 773-786. e5. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.03.018.
19. Hage C., Hoves S., Ashoff M., Schandl V., Hört S., Rieder N., Heichinger C., Berrera M., Ries C.H., Kiessling F., Pöschinger T. Characterizing responsive and refractory orthotopic mouse models of hepatocellular carcinoma in cancer immunotherapy // *PLoS One*. 2019. Vol. 14. № 7. P. e0219517. DOI: 10.1371/journal.pone.0219517.
20. Li E., Lin L., Chen C.W., Ou, D.L. Mouse models for immunotherapy in hepatocellular carcinoma // *Cancers*. 2019. Vol. 11. № 11. P. 1800. DOI: 10.3390/cancers11111800.
21. Bresnahan E., Lindblad K.E., Ruiz de Galarreta M., Lujambio A. Mouse Models of Oncoimmunology in Hepatocellular Carcinoma HCC Oncoimmunology Models // *Clinical Cancer Research*. 2020. Vol. 26. № 20. P. 5276-5286. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-19-2923.
22. Abdolahi S., Ghazvinian Z., Muhammadnejad S., Saleh M., Asadzadeh Aghdaei H., Baghaei K. Patient-derived xenograft (PDX) models, applications and challenges in cancer research // *Journal of Translational Medicine*. 2022. Vol. 20. № 1. P. 206. DOI: 10.1186/s12967-022-03405-8.
23. Bresnahan E., Ramadori P., Heikenwalder M., Zender L., Lujambio A. Novel patient-derived preclinical models of liver cancer // *Journal of hepatology*. 2020. Vol. 72. № 2. P. 239-249. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.09.028.

24. He X.X., Chang Y., Meng F.Y., Wang M.Y., Xie Q.H., Tang F., Lin J.S. MicroRNA-375 targets AEG-1 in hepatocellular carcinoma and suppresses liver cancer cell growth in vitro and in vivo // *Oncogene*. 2012. Vol. 31. № 28. P. 3357-3369. DOI: 10.1038/onc.2011.500.
25. Zhang X., Zhu X.J., Zhong Z., Du J.C., Fang G.X., Cui X.L., Guan L.T., Hu Y.Y., Wang H.Y., Zhang P.L. Small Molecule-Induced Differentiation as a Potential Therapy for Liver Cancer // *Advanced Science*. 2022. Vol. 9. № 15. P. 2103619. DOI: 10.1002/advs.202103619.
26. Blidisel A., Marcovici I., Coricovac D., Hut F., Dehelean C.A., Cretu O.M. Experimental models of hepatocellular carcinoma—a preclinical perspective // *Cancers*. 2021. Vol. 13. № 15. P. 3651. DOI: 10.3390/cancers13153651.
27. Gu C.Y., Lee T K.W. Preclinical mouse models of hepatocellular carcinoma: an overview and update // *Experimental Cell Research*. 2022. P. 113042. DOI: 10.1016/j.yexcr.2022.113042.
28. Hu H., Qiu Y, Guo M., Huang Y., Fang L., Peng Z., Ji W., Xu Y., Shen S., Yan Y., Huang X., Zheng J., Su C. Targeted Hsp70 expression combined with CIK-activated immune reconstruction synergistically exerts antitumor efficacy in patient-derived hepatocellular carcinoma xenograft mouse models // *Oncotarget*. 2015. Vol. 6. № 2. P. 1079. DOI: 10.18632/oncotarget.2835.
29. Gao H., Korn J.M., Ferretti S., Monahan J.E., Wang Y., Singh M., Zhang C., Schnell C., Yang G., Zhang Y., Balbin O.A., Barbe S., Cai H., Casey F., Chatterjee S, Chiang D.Y., Chuai S., Cogan S.M., Collins S.D., Dammassa E., Ebel N., Embry M., Green J., Kauffmann A., Kowal C., Leary R.J., Lehar J., Liang Y., Loo A., Lorenzana E., Robert McDonald E 3rd, McLaughlin M.E., Merkin J., Meyer R., Naylor T.L., Patawaran M., Reddy A., Röelli C., Ruddy D.A., Salangsang F., Santacroce F., Singh A.P., Tang Y., Tinetto W., Tobler S., Velazquez R., Venkatesan K., Von Arx F., Wang H.Q., Wang Z., Wiesmann M., Wyss D., Xu F., Bitter H., Atadja P., Lees E., Hofmann F., Li E., Keen N., Cozens R., Jensen M.R., Pryer N.K., Williams J.A., Sellers W.R. High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response // *Nature medicine*. 2015. Vol. 21. № 11. P. 1318-1325. DOI: 10.1038/nm.3954.
30. Кечерюкова Т.М., Гурова С.В., Гончарова А.С., Максимов А.Ю., Галина А.В., Романова М.В., Ходакова Д.В., Колесников Е.Н., Гусарева М.А., Зинькович М.С., Шалашная Е.В. Сравнительная оценка методов создания ортотопической модели рака печени // *Современные проблемы науки и образования*. 2023. № 2. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=32565> (дата обращения: 10.06.2023). DOI:10.17513/spno.32565.
31. 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.

32. Cramer T. Impact of dietary carbohydrate restriction on the pathobiology of Hepatocellular Carcinoma: The gut-liver axis and beyond // *Seminars in Immunology*. Academic Press, 2023. Vol. 66. P. 101736. DOI: 10.1016/j.smim.2023.101736.
33. Tan K.V., Yang X., Chan C.Y., Shi J., Chang H.C., Chiu K.W.H., Man K. Non-invasive PET/MR Imaging in an Orthotopic Mouse Model of Hepatocellular Carcinoma // *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2022. № 186. P. e63958. DOI: 10.3791/63958.
34. 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.
35. Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A., Ruddle F.H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1980. Vol. 77. № 12. P. 7380-7384. DOI: 10.1073/pnas.77.12.7380.
36. Lamprecht Tratar U., Horvat S., Cemazar M. Transgenic mouse models in cancer research // *Frontiers in oncology*. 2018. Vol. 8. P. 268. DOI: 10.3389/fonc.2018.00268.
37. Zhang H.E., Henderson J.M., Gorrell M.D. Animal models for hepatocellular carcinoma // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2019. Vol. 1865. № 5. P. 993-1002. DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.08.009.
38. 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. DOI: 10.18632/oncotarget.4202.
39. Shachaf C.M., Kopelman A.M., Arvanitis C., Karlsson A., Beer S., Mandl S., Bachmann M.H., Borowsky A.D., Ruebner B., Cardi R.D., Yang Q., Bishop J.M., Contag C.H., Felsher D.W. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer // *Nature*. 2004. Vol. 431. № 7012. P. 1112-1117. DOI: 10.1038/nature03043.
40. Hayashi S., McMahon A.P. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse // *Developmental biology*. 2002. Vol. 244. № 2. P. 305-318. DOI: 10.1006/dbio.2002.0597.
41. Liang B., Zhou Y., Qian M., Xu M., Wang J., Zhang Y., Song X., Wang H., Lin S., Ren C., Monga S.P., Wang B., Evert M., Chen Y., Chen X., Huang Z., Calvisi D.F., Chen X. TBX3 functions as a tumor suppressor downstream of activated CTNNB1 mutants during hepatocarcinogenesis // *Journal of hepatology*. 2021. Vol. 75. № 1. P. 120-131. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.01.044.
42. Kido T., Tabatabai Z L., Chen X., Lau Y.F.C. Potential dual functional roles of the Y-linked RBMY in hepatocarcinogenesis // *Cancer science*. 2020. Vol. 111. № 8. P. 2987-2999. DOI: 10.1111/cas.14506.

43. Cho K., Ro S.W., Lee H.W., Moon H., Han S, Kim H.R., Ahn S.H., Park J.Y., Kim D.Y. YAP/TAZ suppress drug penetration into hepatocellular carcinoma through stromal activation // *Hepatology*. 2021. Vol. 74. № 5. P. 2605-2621. DOI: 10.1002/hep.32000.
44. Gu C.Y., Lee T.K.W. Preclinical mouse models of hepatocellular carcinoma: an overview and update // *Experimental Cell Research*. 2022. P. 113042. DOI: 10.1016/j.yexcr.2022.113042.
45. Mo Y., Wu Y., Li X., Rao H., Tian X., Wu D., Qiu Z., Zheng G., Hu J. Osthole delays hepatocarcinogenesis in mice by suppressing AKT/FASN axis and ERK phosphorylation // *European Journal of Pharmacology*. 2020. Vol. 867. P. 172788. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.172788.
46. Janik E., Niemcewicz M., Ceremuga M., Krzowski L., Saluk-Bijak J., Bijak M. Various aspects of a gene editing system—crispr–cas9 // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21. № 24. P. 9604. DOI: 10.3390/ijms21249604.
47. Macek Jilkova Z., Kurma K., Decaens T. Animal models of hepatocellular carcinoma: the role of immune system and tumor microenvironment // *Cancers*. 2019. Vol. 11. № 10. P. 1487. DOI: 10.3390/cancers11101487.
48. Chisari F.V., Filippi P., Buras J., McLachlan A., Popper H., Pinkert C.A., Palmiter R.D., Brinster R.L. Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987. Vol. 84. № 19. P. 6909-6913. DOI: 10.1073/pnas.84.19.6909.
49. Zong L., Peng H., Sun C., Li F., Zheng M., Chen Y., Wei H., Sun R., Tian Z. Breakdown of adaptive immunotolerance induces hepatocellular carcinoma in HBsAg-tg mice // *Nature Communications*. 2019. Vol. 10. № 1. P. 221. DOI: 10.1038/s41467-018-08096-8.
50. Kamegaya Y., Hiasa Y., Zukerberg L., Fowler N., Blackard J.T., Lin W., Choe W.H., Schmidt E.V., Chung R.T. Hepatitis C virus acts as a tumor accelerator by blocking apoptosis in a mouse model of hepatocarcinogenesis // *Hepatology*. 2005. Vol. 41. № 3. P. 660-667. DOI: 10.1002/hep.20621.