

© Коллектив авторов, 2020

УДК 57.085.23

Лунёва К.А.^{1,2}, Клементьева О.Е.¹, Терновская К.Э.¹, Дубова Е.А.¹, Лунёв А.С.¹

Опыт ксенотрансплантационного гетеротопического моделирования колоректального рака различных клеточных типов у бестимусных мышей линии BALB/c nude

¹ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России,

123182, Москва, Россия, ул. Живописная, д. 46;

²ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина», 109472, Москва, Россия, ул. Академика Скрябина, д. 23

Введение. Высокий уровень заболеваемости колоректальным раком стимулирует поиск методов его своевременной диагностики и эффективной терапии, что, в свою очередь, предполагает использование адекватных животных моделей на стадиях разработки и доклинических исследований.

Методика. Для моделирования гетеротопических ксенографтов были использованы клеточные культуры колоректального рака человека линий DLD-1, HCT 116 и HT-29. В качестве носителей опухолевых моделей были взяты мыши линии BALB/c nude. Суспензию клеток вводили подкожно в область лопатки с помощью шприца.

Результаты. Полученные из Американской коллекции типовых культур (ATCC) клетки культивировали до достижения необходимого количества для моделирования ксенографтов (20 сут). Клетки линии HCT-116 культивировались активнее и образовывали монослой в 3 раза быстрее, чем клетки линии DLD-1 и HT-29. Выживаемость мышей после проведения процедуры подкожной ксенотрансплантации составляла 100%. Образование ксенографтов объемом около 1 см³ наблюдали на 17-е – 26-е сут после прививания клеток. Приживаемость введённых клеток составила 100% для линии HCT-116. Для клеток колоректального рака человека линий DLD-1 и HT-29 приживаемость составила 75% и 60%, соответственно.

Заключение. При экспериментальном моделировании подкожных гетеротопических ксенографтов колоректального рака человека на мышах линии BALB/c nude была получена высокая степень воспроизводимости при 100%-ной выживаемости животных-носителей.

Ключевые слова: гетеротопическое моделирование; колоректальный рак; модели опухолей; ксенотрансплантация; ксенографт

Для цитирования: Лунёва К.А., Клементьева О.Е., Терновская К.Э., Дубова Е.А., Лунёв А.С. Опыт ксенотрансплантационного гетеротопического моделирования колоректального рака различных клеточных типов у бестимусных мышей линии BALB/c nude. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(4): 148-152.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.148-152

Для корреспонденции: Лунёва Кристина Андреевна, e-mail: christfmbc@gmail.com

Участие авторов: Лунёва К.А., Терновская К.Э. – культивирование культур клеток, подготовка к перевивке, моделирование опухолевых очагов; Клементьева О.Е. – планирование и руководство выполненными исследованиями, Дубова Е.А. – проведение гистологического исследования образцов опухолевой ткани; Лунёв А.С. – моделирование опухолевых очагов, обработка полученных результатов. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках бюджетной тематики ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 19.05.2020

Принята к печати 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

Lunyova K.A.^{1,2}, Klementyeva O.E.¹, Ternovskaya K.E.¹, Dubova E.A.¹, Lunev A.S.¹

Xenograft heterotopic modeling of colorectal cancer of various cell types in athymic BALB/c nude mice

¹State Research Center, A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Zhivopisnaya Str. 46, Moscow 123098, Russian Federation;

²K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Akademika Skryabina Str. 23, Moscow 109472, Russian Federation

Introduction. The high prevalence of colorectal cancer (CC) stimulates scientists and physicians to search methods for CC diagnosis and effective therapy, which requires appropriate animal models at the stage of development and preclinical studies.

Methods. CC cell cultures (DLD-1, HCT 116, and HT-29) were used for heterotopic xenograft modeling in BALB/c nude mice. The cell suspension was injected subcutaneously with a syringe.

Results. CC cells from ATCC (American Type Culture Collection) were cultivated until obtaining the required number of cells for xenograft modeling (20 days). The HCT-116 cell culture developed more actively and formed a monolayer three times faster than DLD-1 and HT-29 cells. Survival of the mice after subcutaneous transplantation was 100%. Xenografts of approximately 1 cm³ volume formed at 17-26 days after grafting. Transplantability of the injected cells was 100% for HCT-116, 75% for DLD-1, and 60% for HT-29.

Conclusion. The experimental modeling of subcutaneous heterotopic CC xenografts in BALB/c nude mice showed a high level of reproducibility with absolute 100% – survival of recipient mice.

Keywords: heterotopic modeling; colorectal cancer; tumor models; xenotransplantation; xenograft

For citation: Lunyova K.A., Klementyeva O.E., Ternovskaya K.E., Dubova E.A., Lunev A.S. Xenograft heterotopic modeling of colorectal cancer of various cell types in athymic BALB/c nude mice. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 148-152. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.148-152

For correspondence: *Kristina A. Lunyova*, Scientific Researcher, State Researcher Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency; 46 Zhivopisnaya Str., Moscow 123098, Russian Federation, e-mail: christfmbc@gmail.com

Contribution: Lunyova K.A., Ternovskaya K.E. – cell culture cultivation, preparation for transplantation, modeling of tumor foci; Klementyeva O.E. – planning and management of performed studies, Dubova E.A. – histological study of tumor tissue samples; Lunev A.S. – modeling of tumor foci, results obtained. All the authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

Acknowledgment. Budget theme of the SRC – FMBC.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Information about the authors:

Lunyova K.A., <https://orcid.org/0000-0002-1256-9873>

Klementyeva O.E., <https://orcid.org/0000-0002-6604-0860>

Ternovskaya K.E., <https://orcid.org/0000-0001-9527-0596>

Dubova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-7115-538X>

Lunev A.S., <https://orcid.org/0000-0002-8392-8343>

Received 19.05.2020

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

Введение

Ключевым направлением при разработке современных препаратов для диагностики и терапии онкологических заболеваний, наряду с разработкой самой действующей субстанции или препарата, является экспериментальное моделирование опухолевого процесса на лабораторных животных. В настоящее время рак ободочной и прямой кишки трактуется совместно как рак толстого кишечника, но всё чаще к этим злокачественным новообразованиям применяют термин «колоректальный рак» (КРР). По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в мире ежегодно регистрируется более 500 тыс случаев колоректального рака [1, 2]. При всех достижениях современной медицины КРР занимает лидирующие позиции в распространенности, являясь во всем мире третьим среди онкологических заболеваний по частоте у мужчин и вторым по частоте у женщин [3]. Уровень смертности от этой патологии продолжает оставаться неутешительно высоким [4, 5].

Согласно Методическим указаниям по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ [6], обязательными моделями солидных новообразований для исследования противоопухолевых

препаратов, ориентированных на применение в клинике являются культуры клеток опухолей человека, адаптированных к росту *in vivo* и дающие подкожные ксенографты у иммунодефицитных мышей.

Моделирование КРР человека возможно при использовании стандартизированных коллекционных культур клеток. Основной принцип такого моделирования приведен в обзоре М. Perez с соавторами [7], причем инъекция суспензии опухолевых клеток может быть осуществлена как подкожно (гетеротопически), так и в слизистую толстой или слепой кишки мыши (ортотопически). Подкожное расположение ксенографта позволяет неинвазивно и максимально точно контролировать рост опухоли [8]. Также в ортотопической модели оценка терапевтической эффективности более сложна по сравнению с опухолевой моделью подкожного введения клеток [9].

В данной статье материал относится к гетеротопическому подходу создания ксенографтов КРР с использованием культур клеток, полученных из Американской коллекции типовых культур (АТСС).

Цель исследования – освоение методик культивирования различных линий колоректального рака человека с последующим подкожным ксенотрансплан-

тированием полученных клеточных культур и оценка возможности создания модельных гетеротопических ксеногraftов КРР человека на мышах линии BALB/c nude.

Методика

Все процедуры исследования соответствовали принципам надлежащей лабораторной практики [10]. Протокол исследования утвержден этической комиссией медицинского биофизического Центра им. А.И. Бурназяна. Для культивирования и последующей подкожной инъекции были взяты 3 линии клеток человеческого КРР, полученные из АТСС: DLD-1, НСТ 116 и НТ-29. После размораживания клетки переносили в промаркированные пробирки типа Эппендорф и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин (MiniSpin plus, Eppendorf, Германия). Надосадок удаляли, клетки ресуспендировали в 1 мл среды RPMI-1640 с глутамином gibco® (Thermo Fisher Scientific, США). В подготовленные, заранее промаркированные культуральные флаконы объемом 25 см³ (Corning, США) добавляли по 7 мл приготовленной питательной среды (RPMI-1640 с глутамином, 20% (в финальной концентрации) фетальной телячьей сыворотки gibco® (Thermo Fisher Scientific, США) и 100-кратный раствор антибиотика пенициллин-стрептомицин (ООО «НПП «ПанЭко»). В культуральные флаконы с питательной средой вносили по 200 мкл суспензии клеток (около $2 \cdot 10^5$ клеток) и ставили все флаконы в CO₂-инкубатор MCO-20AIC (Sanyo, Япония), поддерживающий заданную температуру 37 °С и концентрацию углекислого газа 5%.

В качестве носителей гетеротопических моделей колоректального рака были использованы мыши самки линии BALB/c nude в возрасте 6-8 нед, массой тела $19 \pm 1,8$ г, полученные из питомника лабораторных животных «Пушино» ФИБХ РАН. Мыши были включены в эксперимент после 3-дневной адаптации с последующей оценкой состояния здоровья по внешним и клиническим признакам. Иммунодефицитных мышей содержали в пластмассовых клетках, установленных в системе индивидуально вентилируемых клеток (ИВК) GA30CAGES 6LAYERS×5 (3W, КНР), укомплектованной вентиляционным блоком с НЕРА-фильтром. Для кормления использован стерильный гранулированный корм марки «Чара», имеющий сертификат соответствия – единственная в России диета, способная выдерживать стерилизацию паром в автоклаве, что делает ее незаменимой при содержании мелких лабораторных грызунов SPF-категории [11], и питьевая вода [12], стерилизованная УФ. Доступ к воде

и корму свободный. Температура и влажность воздуха поддерживается автоматически изолирующей системой (22-26 °С и 30-60%, соответственно). Перемещение животных вне системы ИВК осуществляли в изолирующих клетках. Работу с животными проводили в ламинарном боксе системы vis-a-vis, (Бокс микробиологической безопасности БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2 (241.120), ЗАО «Ламинарные системы», Россия) обеспечивающем защиту продукта от оператора. Все манипуляции с животными, в том числе, связанные с их эвтаназией, выполняли согласно Европейской Конвенции по их защите, изложенной в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС) [13].

Оценка роста клеточных культур in vitro и их подготовка к моделированию колоректального рака на мышах. Клетки культивировали до достижения необходимого количества для создания моделей КРР на мышах (20 сут). Активный рост был отмечен в флаконах с клетками линии НСТ-116, в которых уже на 4-е сут сформировался монослой. В флаконах с линиями клеток DLD-1 и НТ-29 монослой формировался на 11-е сут.

Для подготовки суспензии клеток для подкожной ксенотрансплантации сливали из культуральных флаконов питательную среду, промывали раствором Версена (ООО «НПП «ПанЭко») и добавляли по 3 мл 0,25%-ного раствора Трипсина-ЭДТА (ООО «НПП «ПанЭко») для снятия прикрепленных клеток с поверхности флаконов. Оставляли на 5 мин. Открепившиеся клетки переносили в промаркированные пробирки типа Эппендорф и центрифугировали при 150g в течение 5 мин. Надосадок удаляли. Клетки ресуспендировали в питательной среде. К суспензии клеток каждой линии добавляли Matrigel® (Corning, США) в соотношении 1:1. Для каждой подкожной инъекции было взято около $3 \cdot 10^6$ клеток в 0,2 мл объема.

Гетеротопическая ксенотрансплантация клеток колоректального рака мышам линии BALB/c nude. Перед инъекцией клетки с мышами извлекали из системы ИВК и переносили в ламинарный бокс системы vis-a-vis, в котором проводили все последующие манипуляции с мышами. Интактным мышам подкожно в область правой лопатки вводили суспензию клеток из заранее подготовленных шприцов. Животных рассаживали в промаркированные клетки, с обязательным указанием даты введения и наименования линии клеток, пола и количества животных. Развитие моделируемых опухолевых очагов контролировали каждые 2 дня.

Результаты наблюдения за мышами после подкожного введения суспензии опухолевых клеток показали, что операция ксенотрансплантации хорошо пере-



Рис. 1. Фотография мыши линии BALB/c nude с привитым подкожным ксенографтом колоректального рака человека линии НСТ 116.

носятся животными, выживаемость – 100%. Приживаемость подкожных ксенографтов КРР человека у мышей BALB/c nude в первой генерации составила 100% для линии клеток НСТ 116, 75% для линии клеток DLD-1 и 60% для линии клеток НТ-29. Формирование ксенографтов объемом ≥ 1 см³ регистрировали у опытных мышей, начиная с 17 суток после процедуры трансплантации для НСТ 116 и с 26 суток для линий клеток DLD-1 и НТ-29.

Фотография мыши с подкожным ксенографтом КРР линии НСТ 116 представлена на **рис. 1**.

По достижении ксенографтов размером ≥ 1 см³, мышей подвергали эвтаназии, опухоли удаляли и помещали в промаркированные пробирки с 10% раствором формалина. Образцы ксенографтов мышей были переданы в патологоанатомическое отделение ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России на гистологическое исследование. Образцы опухолевых тканей мышей с ксенографтами DLD-1 и НСТ 116 гистологически соответствовали «низкодифференцированным аденокарциномам».

Образец опухолевой ткани мыши с ксенографтом НТ-29 соответствовал «умереннодифференцированной аденокарциноме» (**рис. 2**).

Заключение

Была получена высокая степень воспроизводимости подкожных гетеротопических опухолей – моделей колоректального рака человека клеточных линий НСТ 116, DLD-1 и НТ-29 на мышах линии BALB/c nude. Выживаемость опытных животных после ксенотрансплантации была 100%-ной.

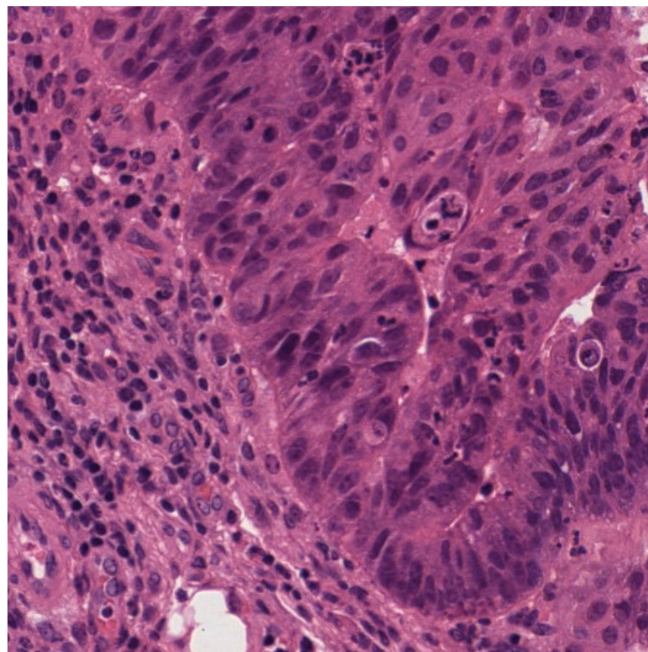


Рис.2. Гистосрез ксенографта колоректального рака линии НТ-29, привитого мыши линии BALB/c nude. Окраска гематоксилин-эозином, ув. 400.

Литература

- Осипов В.А., Абдулаев М.А., Авдеев А.М., Косачев И.Д., Напалков А.Н., Варзин С.А. и др. Результаты хирургического лечения больных колоректальным раком, осложненным кишечной непроходимостью и кровотечением. *Вестник СПбГУ. Серия 11. Медицина*. 2014; 3: 104-17.
- Денисенко В.Л., Гаин Ю.М. Осложнения колоректального рака: проблемы и перспективы. *Новости хирургии*. 2011; 1: 103-11.
- Алиев Ф.Ш., Десятов Е.Н., Крутских А.Г., Алиев В.Ф., Лейманченко П.И. Эпидемиология колоректального рака: мировые и региональные тенденции. *Медицинская наука и образование Урала*. 2016; 4: 125-8.
- International Expert Summit: Improving Outcomes in the Treatment and Management of Metastatic Colorectal Cancer. A Report Based on an International Expert Summit Convened in Berlin, July 2013*. Berlin, July 22-23, 2013. Cambridge: The Angiogenesis Foundation, 2013.
- Федоров В.Э., Поделякин К.А. Эпидемиологические аспекты колоректального рака (Обзор). *Медицинский альманах*. 2017; 4(49): 145-8.
- Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К., Андропова Н.В., Гарин А.М. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. В кн.: Хабриев Р.У., ред. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. 2 изд. М.: ОАО изд. Медицина; 2005. С. 637–51.
- Perez M., Navas L., Carnero A. Patient-derived xenografts as models for personalized medicine research in cancer. *Cancer Transl. Med.* 2016; 2(6): 197-202.
- Hackl C., Man S., Francia G., Milsom C., Xu P., Kerbel R.S. Metronomic oral topotecan prolongs survival and reduces liver metastasis.

- sis in improved preclinical orthotopic and adjuvant therapy colon cancer models. *Gut*. 2013; 62: 259-71.
9. Bibby M.C. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur. J. Cancer*. 2004; 40: 852-7.
 10. *Государственный стандарт РФ ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики*. М.: Стандартинформ; 2019.
 11. *Питомник лабораторных животных «Пуццино»*. Поставщики кормов. Доступно по: <http://www.spf-animals.ru/about/providers/feed/>
 12. *Государственный стандарт РФ ГОСТ Р 51232-98. Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества*. М.: Стандартинформ; 2010.
 13. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. ЕЭС, Страсбург, 1986. *Ланималогия*. 1993; 1: 1-29

References

1. Osipov V.A., Abdulaev M.A., Avdeev A.M., Kosachev I.D., Napalkov A.N., Varzin S.A. et al. Results of surgical treatment of patients with colorectal cancer complicated by intestinal obstruction and bleeding. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Series 11. Meditsina*. 2014; 3: 104-17. (in Russian)
2. Denisenko V.L., Gain Ju.M. Complications of colorectal cancer: problems and prospects. *Novosti khirurgii*. 2011; 1: 103-11. (in Russian)
3. Aliev F.Sh., Desjatov E.N., Krutskikh A.G., Aliev V.F., Lejmanchenko P.I. Epidemiology of colorectal cancer: global and regional trends. *Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urala*. 2016; 4: 125-8. (in Russian)
4. *International Expert Summit: Improving Outcomes in the Treatment and Management of Metastatic Colorectal Cancer. A Report Based on an International Expert Summit Convened in Berlin, July 2013*. Berlin, July 22-23, 2013. Cambridge: The Angiogenesis Foundation, 2013.
5. Fedorov V.E., Podelyakin K.A. Epidemiological aspects of colorectal cancer (Review). *Meditsinskiy almanakh*. 2017; 4(49): 145-8. (in Russian)
6. Treshhalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K., Andronova N.V., Garin A.M. Methodological guidelines for the study of antitumor activity of pharmacological substances. In the book: Habriev R.U., ed. *Guide to experimental (preclinical) study of new pharmacological substances*. 2 ed. Moscow: OAO izd. Meditsina; 2005: 637-51. (in Russian)
7. Perez M., Navas L., Carnero A. Patient-derived xenografts as models for personalized medicine research in cancer. *Cancer Transl. Med.* 2016; 2(6): 197-202.
8. Hackl C., Man S., Francia G., Milsom C., Xu P., Kerbel R.S. Metronomic oral toptotecan prolongs survival and reduces liver metastasis in improved preclinical orthotopic and adjuvant therapy colon cancer models. *Gut*. 2013; 62: 259-71.
9. Bibby M.C. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur. J. Cancer*. 2004; 40: 852-7.
10. *10.State Standart 33044-2014. Principles of good laboratory practice. [Printsiy nadelzhashchey laboratornoy praktiki]*. Moscow: Standartinform Publ.; 2019. (in Russian)
11. *11.Nursery of laboratory animals "Pushchino"*. Feed suppliers. Available at: <http://www.spf-animals.ru/about/providers/feed/>
12. *12.State Standart 33044-2014. Drinking water. General requirements for the organization and methods of quality control. [Voda pit'evaya. Obshchie trebovaniya k organizatsii i metodam kontrolya kachestva]*. Moscow: Standartinform Publ.; 2010. (in Russian)
13. European Convention for the Protection Vertebrate Animals Use for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg, 1986. *Lanimalogiya*. 1993; 1: 1-29. (in Russian)

Сведения об авторах:

Лунёва Кристина Андреевна, науч. сотр. лаб. доклинических и клинических исследований радиофармпрепаратов отделения радиационных технологий медицинского назначения ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России; аспирант каф. химии им. проф. С.И. Афонского и проф. А.Г. Малахова ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА им. К.И. Скрябина, e-mail: christfmbc@gmail.com;

Клементьева Ольга Евгеньевна, канд. биол. наук, зав. лаб. доклинических и клинических исследований радиофармпрепаратов ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, e-mail: klementyeva.olga@gmail.com;

Терниовская Кристина Эдуардовна, инженер лаб. доклинических и клинических исследований радиофармпрепаратов ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, e-mail: violet_mak@mail.ru;

Дубова Елена Алексеевна, доктор мед. наук, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, e-mail: dubovaea@gmail.com;

Лунёв Александр Сергеевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. доклинических и клинических исследований радиофармпрепаратов ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, e-mail: mr.alekslunev@gmail.com.