

УДК 57.089.6  
DOI: 10.56871/5294.2022.59.77.004

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ В ОРГАНИЗМЕ МЫШЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ RENCA

© Армен Алексанович Овсепян, Екатерина Олеговна Пчелинцева, Евгения Николаевна Бочарова, Елена Валерьевна Белянина, Елена Ивановна Каторкина, Максим Валерьевич Лыков

ГЕНЕРИУМ, R&D парк. 601125, Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Владимирская, д. 14

**Контактная информация:** Елена Валерьевна Белянина — к.в.н., научный сотрудник Центра доклинических исследований.  
E-mail: belyanina@ibcgenerium.ru

Поступила: 04.05.2022

Одобрена: 17.06.2022

Принята к печати: 19.08.2022

**Резюме.** Почечно-клеточная карцинома составляет 97% от всех опухолей почки у взрослых людей. Ведущую роль в лечении почечно-клеточной карциномы занимает хирургическая резекция первичной опухоли, однако не для всех пациентов применимо данное лечение. Во многих случаях показана лекарственная терапия пероральным таргетным препаратом сунитиниб — «золотой стандарт» лечения почечно-клеточной карциномы. Сунитиниб — противоопухолевое средство, низкомолекулярный ингибитор различных (более 80) тирозинкиназ, участвующих в процессе роста опухоли, патологического ангиогенеза и образования метастазов [3]. Сунитиниб составляет основу противоопухолевого препарата, выпускаемого под торговым названием Сутент® (МНН: Сунитиниб, Pfizer Italia S.r.l. (Италия)). К сожалению, при длительном применении к данному препарату развивается резистентность. Таким образом, актуальной остается задача поиска новых, высокоэффективных противоопухолевых препаратов и методов их применения в терапии почечно-клеточной карциномы, оценки их безопасности и эффективности на этапах доклинических и клинических исследований [2, 4, 5, 7].

**Цель:** разработка ортотопической модели почечно-клеточной карциномы RENCA у мышей с последующей терапией препаратом Сутент®. Данный препарат используется в качестве «позитивного контроля» в лечении экспериментальной почечно-клеточной карциномы, что в дальнейшем даст возможность изучать другие противоопухолевые препараты и подходы в терапии почечно-клеточной карциномы. В работе использовали 60 самок мышей линии BALB/c в возрасте 10–12 недель (две экспериментальные группы): 1-я — «инокуляция опухолевых клеток» (n=30); 2-я — «инокуляция опухолевых клеток + Сутент®» (n=30). Для инокуляции использовали опухолевые клетки линии RENCA. На 21-е и 28-е сутки после инокуляции клеток опухоли проводили патоморфологический и гистологический анализ. По результатам проведенного исследования была отработана хирургическая ортотопическая модель почечно-клеточной карциномы RENCA. Модель характеризуется 100% прививаемостью первичной опухоли с медианой выживаемости 28–30 дней. На данной модели показана эффективность препарата Сутент®. Отработана схема и дозы применения данного препарата в сопряжении с используемой дозой опухолевых клеток. **Выводы.** Данная модель может быть использована в качестве *in vivo* тест-системы для доклинической оценки эффективности разрабатываемых новых противоопухолевых препаратов, а также схем лечения почечно-клеточной карциномы при комплексной терапии.

**Ключевые слова:** почечно-клеточная карцинома; ортотопическая модель; экспериментальные животные; клеточная линия RENCA; Сутент®.

## EXPERIMENTAL MODELING OF RENAL CELL CARCINOMA IN MICE USING THE RENCA CELL LINE

© Armen A. Ovsepyan, Ekaterina O. Pchelintseva, Evgenia N. Bocharova, Elena V. Belyanina, Elena I. Katorkina, Maxim V. Lykov

GENERIUM, R&D park. 601125, Vladimir region, Petushinsky district, village Volginsky, ul. Vladimirskaaya, 14

Contact information: Elena V. Belyanina — Ph.D., Researcher at the Center for Preclinical Research. E-mail: belyanina@ibcgenerium.ru

Received: 04.05.2022

Revised: 17.06.2022

Accepted: 19.08.2022

**Abstract.** Renal cell carcinoma accounts for 97% of all kidney tumors in adults. Surgical resection of the primary tumor plays a leading role in the treatment of renal cell carcinoma; however, this treatment is not applicable for all patients. In many cases, drug therapy with the oral targeted drug sunitinib is indicated — the “gold standard” for the treatment of renal cell carcinoma. Sunitinib is an antitumor agent, a low-molecular inhibitor of various (more than 80) tyrosine kinases involved in the process of tumor growth, pathological angiogenesis and metastasis formation [3]. Sunitinib forms the basis of an antitumor drug produced under the trade name Sutent® (INN: Sunitinib, Pfizer Italia S.r.l. (Italy)). Unfortunately, with prolonged use of this drug, resistance develops. Thus, the task of finding new, highly effective antitumor drugs and methods of their use in the therapy of renal cell carcinoma, assessing their safety and effectiveness at the stages of preclinical and clinical studies remains urgent [2, 4, 5, 7]. The aim is to develop an orthotopic model of RENCA renal cell carcinoma in mice with subsequent therapy with Sutent®. This drug is used as a “positive control” in the treatment of experimental renal cell carcinoma, which in the future will make it possible to study other antitumor drugs and approaches in the therapy of renal cell carcinoma. 60 female BALB/c mice aged 10–12 weeks were used in the study (2 experimental groups): 1 — “inoculation of tumor cells” (n=30); 2 — “inoculation of tumor cells+Sutent®” (n=30). Tumor cells of the RENCA line were used for inoculation. On the 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> days after inoculation of tumor cells, pathomorphological and histological analysis was performed. According to the results of the study, a surgical orthotopic model of RENCA renal cell carcinoma was developed. The model is characterized by 100% inoculation of the primary tumor with a median survival of 28–30 days. This model shows the effectiveness of the drug Sutent®. The scheme and dosage of the use of this drug in conjunction with the dose of tumor cells used has been worked out. **Conclusions:** This model can be used as an *in vivo* test system for preclinical evaluation of the effectiveness of new anticancer drugs being developed, as well as treatment regimens for renal cell carcinoma in complex therapy.

**Key words:** renal cell carcinoma; orthotopic model; experimental animals; RENCA cell line; Sutent®.

## ВВЕДЕНИЕ

Заболеемость почечно-клеточным раком (ПКР) продолжает неуклонно расти, что связано как с улучшением диагностики, так и с ростом истинной заболеваемости. Число заболевших во всем мире ежегодно увеличивается на 2%, а смертность превышает 100 тыс. человек в год. По темпам прироста онкологической заболеваемости в России ПКР устойчиво занимает третье место (35,83%) после рака предстательной и щитовидной желез [7]. Ежегодно в России от ПКР умирают более 8 тыс. человек.

ПКР — одно из самых тяжелых заболеваний в онкоурологической практике: на момент первичной диагностики более 30% пациентов имеют обширное метастатическое развитие болезни. У 50% из вновь диагностированных пациентов заболевание переходит в метастатическую стадию в течение первого года от постановки диагноза. Как правило, в тактике лечения даже самой радикальной операции оказывается недостаточно. Необходимы дальнейшие действия, такие как химиотерапия, иммунотерапия и использование гормональных средств [4, 7].

Решением задач в области поиска эффективных способов лечения онкологических заболеваний занимается экспериментальная онкология и биомедицина. В этом поиске значимое место уделяется созданию ортотопических экспе-

риментальных моделей, у которых адекватно формируется микроокружение опухоли. Одной из таких моделей является модель почечно-клеточной карциномы RENCA [4, 6].

«Золотым стандартом» в лечении метастатического рака почки является сунитиниб (Сутент®). Однако при длительном применении у пациентов к данному препарату развивается резистентность, что сводит на нет усилия по лечению ПКР. Таким образом, актуальной остается задача поиска и разработки новых высокоэффективных методов фармакологической терапии, а также модификация уже существующих методов для достижения наибольшего эффекта в терапии ПКР.

## ЦЕЛЬ

Разработка ортотопической модели почечно-клеточной карциномы RENCA у мышей, включая отработку «позитивного контроля» (терапия Сутент®) для последующего изучения эффективности новых противоопухолевых препаратов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** В качестве биологических тест-систем (БТС) в эксперименте использовали мышей линии BALB/c SPF-категории (specified pathogen free), 60 самок, в возрасте 10–12 недель, полученных из НПП «Питомник лабораторных животных»



аиалиа ИБХ РАН, г. Пушкино. Животные содержались в индивидуально вентилируемых клетках из полисульфона Sealsafe, ivcblueline 461×274×228 мм (производство TECHNIPLAST.P.A.). Помещения, в которых содержались животные, соответствуют классу чистоты D, в них контролировались температура (20–26 °С), влажность воздуха (30–70%), освещенность (12/12 ч), кратность воздухообмена (×11 без рециркуляции). Контроль климатических параметров осуществлялся в соответствии с утвержденной в АО «ГЕНЕРИУМ» стандартной операционной процедурой (СОП). Раздача корма и воды проводилась в фиксированное время с 9:00 до 12:00. Доступ к воде и корму без ограничений. Подстил менялся 1 раз в неделю.

Содержание, уход за животными и экспериментальное моделирование проводили в соответствии с международными европейскими биоэтическими стандартами, российскими этическими стандартами по содержанию и обращению с лабораторными животными, нормами и правилами, указанными в «Политике работы с животными АО «ГЕНЕРИУМ»».

**Дизайн исследования.** Рандомизация экспериментальных животных осуществлялась при помощи метода случайных чисел. Каждому животному, участвующему в исследовании, присваивался индивидуальный номер. Для моделирования почечно-клеточной карциномы в организме мышей использовалась клеточная линия RENCA (Кат. № CRL-2947, ATCC®, США) в дозировке  $1 \times 10^5$  клеток/мышь в 15 мкл PBS.

Выбор дозы опухолевых клеток обусловлен ранее проведенными исследованиями [1], а также целями и задачами АО «ГЕНЕРИУМ» в контексте оценки лечебного влияния разрабатываемых лекарственных препаратов или соединений на опухолевый процесс.

В рамках данного исследования клетки культивировались в среде DMEM/F12 с 10% FBS до достижения 90% конфлюэнтности. Затем клетки были сняты трипсином, дважды отмыты в фосфатно-солевом буфере (PBS). Их концентрация оценивалась с использованием гемоцитометра.

Было сформировано две группы животных:

1-я группа (n=30) — инокуляция опухолевых клеток ( $1 \times 10^5$  клеток/мышь в 15 мкл PBS);

2-я группа (n=30) — инокуляция опухолевых клеток ( $1 \times 10^5$  клеток/мышь в 15 мкл PBS) + пероральное введение Сутента® (МНН: Сунитиниб, Пфайзер Италия С.р.Л. (Италия)) 3 раза в неделю в дозе 40 мг/кг в течение 21 дня. Содержимое капсул Сутент® (12,5 мг) предварительно растворяли до требуемой концентрации действующего вещества. В качестве растворителя использовали PBS и 5% раствор глюкозы (1 таблетку PBS растворяли в 100 мл 5% глюкозы). Для получения дозы 40 мг/кг содержимое 1 капсулы Сутент® растворяли в 6 мл растворителя.

На 21-е и 28-е сутки после инокуляции клеток опухоли проводили патоморфологический и гистологический анализ. Мышей подвергали эвтаназии при помощи CO<sub>2</sub> камеры. Затем проводили патоморфологическое исследование, взвешивание почек и отбор материала для гистологическо-

го исследования. Подготовка гистологического материала и изготовление препаратов осуществлялись по стандартным методикам.

**Ортопическая трансплантация клеток почечной карциномы.** При подготовке БТС к работе для общей анестезии использовали инъекционный золетил-ксилазиновый наркоз (8–10 мкл на 1 кг массы тела), что соответствует 26,4–30 мг/кг по золетилу (ВИРБАК, Франция) и 21,6–27 мг/кг по ксилазину [3]. Пред- и послеоперационную аналгезию проводили с помощью Флекспрофена® (ООО «ВИК-здоровье животных», Россия) (2,5% раствор для инъекций) путем внутрибрюшинной инъекции в дозе 2–5 мг на 1 кг массы тела.

После наступления глубокого хирургического наркоза готовили операционное поле. Для этого выщипывали БТС в пояснично-крестцовой области, используя триммер Aescular Exasta (Aescular, Германия), кожу обрабатывали кожным антисептиком ОКТЕНИДЕРМ® (ГмбХ, Германия), на глаза наносили повязку моделирующую гелевую Normigel® (Molnlycke health care, Гетеборг, Швеция).

Далее мышь фиксировали в боковом положении на операционном столике, драпировали операционное поле и приступали к кожному разрезу.

Рассекали кожу с подкожной клетчаткой в области проекции почки длиной 1,0–1,5 см, используя прямые глазные ножницы.

Пинцетом для мышц по Лейдхеккеру/пинцетом для мышц по Элшингу выполняли захват брюшных мышц, приподнимали их и делали разрез, используя хирургические ножницы, таким образом, чтобы избежать кровотечения и повреждения подлежащих внутренних органов.

Используя капсульный пинцет и пинцет для завязывания нитей по Теннанту, изогнутый под углом, осторожно, избегая повреждения и кровоподтеков, выводили почку в область операционной раны и фиксировали ее там, используя ватную палочку.

Используя одноразовый инсулиновый шприц (0,3 мл) с иглой 30G (BD Micro-Fine™ Plus Demi, США) делали прокол почки по большой кривизне углублялись в толщу органа таким образом, чтобы игла оказалась в субкапсулярной области почки на противоположной от места прокола стороне.

Осторожно и медленно вводили суспензию клеток, избегая возможного повреждения почечной капсулы. После введения на несколько секунд оставляли иглу в органе для уравновешивания давления и уменьшения возможного вытекания введенной суспензии. Объем введения 10–15 мкл (рис. 1).

Удаляли иглу, и с помощью ватной палочки тампонируют место прокола на несколько секунд с целью остановки возможного кровотечения и вытекания введенной суспензии клеток.

Используя капсульный пинцет и пинцет для завязывания нитей по Теннанту, изогнутый под углом, осторожно помещали почку обратно в брюшную полость.

Ставили двурядный непрерывный шов (мышечный и кожный) при помощи рассасывающейся хирургической нити

Merfil 5/0 [4, 6]. Подкожно вводили раствор натрия хлорида для инфузии 0,9% в объеме 0,5 мл.

До выхода из наркоза животных помещали в камеру блока подогрева TAILHRATB (Biorac Systems. Inc., США) с принудительной подачей кислорода (при помощи медицинского кислородного концентратора NewLife). После выхода из наркоза животное пересаживали в клетку содержания.

**Статистическая обработка результатов.** Полученные в ходе работы данные проверены на нормальность распределения. Тип распределения определялся критерием Колмогорова–Смирнова, Шапиро–Уилка. Статистический анализ включал в себя вычисление среднего значения, стандартного отклонения. Для сравнения значений использовался параметрический показатель — *t*-критерий Стьюдента, так как выборка соответствует закону нормального распределения. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Статистическая обработка данных проводилась с использованием IBM SPSS Statistics (23 v, IBM Corp., США).

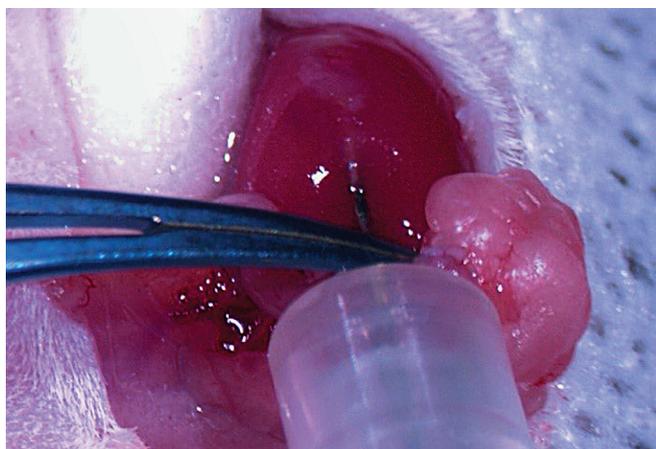


Рис. 1. Инокуляция опухолевых клеток под капсулу почки по большой кривизне

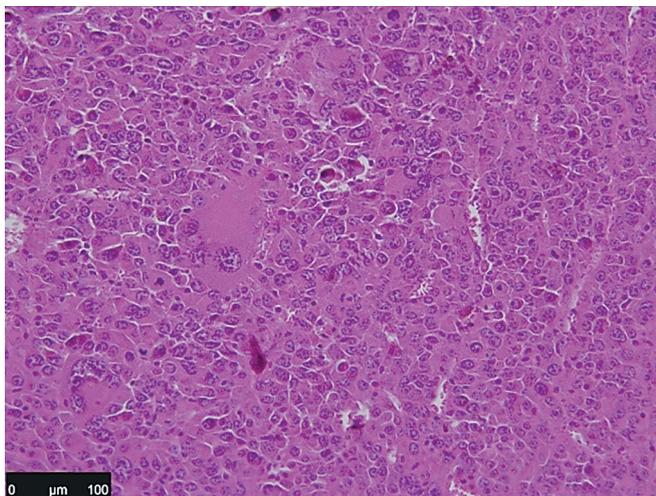


Рис. 2. Морфология первичной опухоли (28-е сутки). Окраска гематоксилином–эозином, увеличение  $\times 40$

## РЕЗУЛЬТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

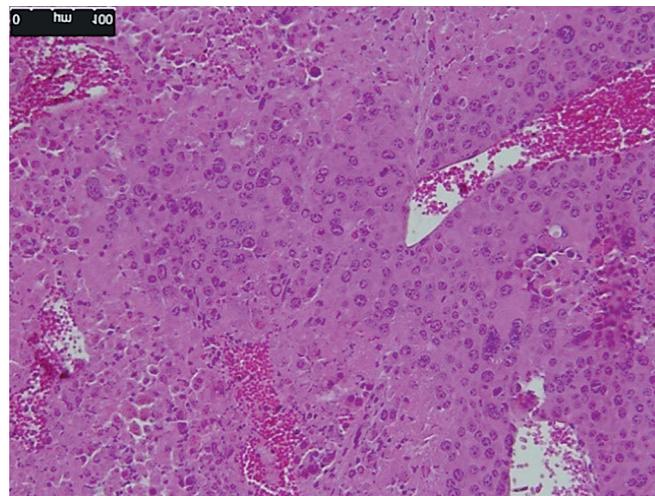
По результатам патоморфологического исследования на 21-е сутки установлено, что масса опухолевой почки в 1-й группе без использования Сутента® —  $1,82 \pm 0,35$  г, во 2-й группе с применением Сутента® —  $0,73 \pm 0,28$  г и была достоверно ниже, чем в 1-й группе без Сутента®.

На 28-й день показатели массы опухолевой почки были равны  $3,3 \pm 0,4$  и  $1,66 \pm 0,82$  г для 1-й и 2-й групп соответственно. При этом в 1-й группе без использования Сутента® была зарегистрирована 80% смертность, в то время как во 2-й группе она составляла 0%. При проведении гистологического анализа установлено, что морфология ткани опухоли на гистологических срезах схожа у животных всех групп на обоих сроках. Клетки опухоли довольно плотно прилегают друг к другу; наблюдается минимальное количество межклеточного вещества. Клетки, как правило, округлой формы с одним крупным ядром, в котором представлены 1–3 крупных ядрышка. В ядре преобладает эухроматин, пристеночно выявляется гетерохроматин, а также глыбки гетерохроматина, диффузно расположенные в ядре.

Встречаются очень крупные клетки с ядрами неправильных форм. Таким образом, опухоли животных можно отнести к IV типу по градации ядер по Фурману. Ткань опухоли содержит много сосудов. Большое количество митозов указывает, что ткань опухоли активно пролиферирующая. Помимо опухолевой ткани вышеописанного строения встречаются участки некротического распада опухоли (рис. 2).

В лёгких и других органах ткань метастазов схожего строения — активно пролиферирующая и высоко васкуляризованная.

На срезах лёгких у животных 1-й группы выявлено 5–11 метастазов (рис. 3, а). В среднем по группе площадь метастазов на срезе лёгкого составляет 34,5%. У животных 2-й группы количество метастазов на срезе лёгких варьирует от 1 до 10 и составляет в среднем по группе 12,2% от площади среза (рис. 3, б).



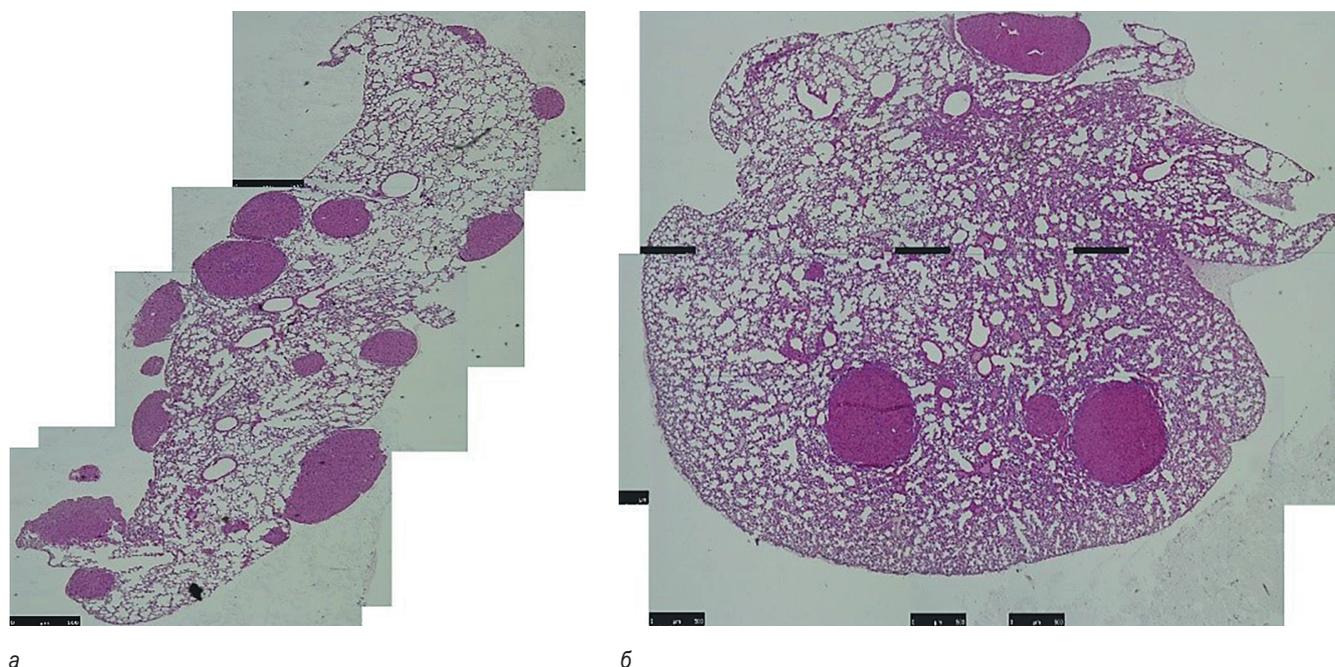


Рис. 3. Коллаж фотографий среза лёгкого (28-е сутки): а — срез лёгких животных 1-й группы; б — срез лёгких животных 2-й группы. Окраска гематоксилином–эозином, увеличение  $\times 10$

## ВЫВОДЫ

Таким образом, полученные экспериментальные данные показали, что нами:

1. Отработана хирургическая ортотопическая модель почечно-клеточной карциномы RENCA с использованием мышей линии BALB/c.
2. Отработана схема и дозы применения препарата Сунтент<sup>®</sup>, приводящая к статистически значимому уменьшению массы опухолевой почки, как на 21-е, так и на 28-е сутки опухолевого процесса.
3. Достигнуто значимое снижение смертности в предложенной модели на 28-е сутки опухолевого процесса (80% против 0% в группах 1 и 2)
4. Гистологическая картина свидетельствует об идентичности первичной опухоли и метастазов.
5. Наличие метастазов свидетельствует о высокой степени агрессивности опухоли, что важно при оценке лечебных возможностей тестируемых препаратов.

Исходя из вышеописанного, полученные результаты позволяют предположить, что данная модель может быть использована для тестирования различных препаратов и схем лечения применительно к почечно-клеточной карциноме с дальнейшим их позиционированием в клинической практике.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Овсепян А.А., Катorkина Е.И., Анисимова Е.О. и др. Применение ортотопической модели почечно-клеточной карциномы RENCA в научно-исследовательской и прикладной деятельнос-

ти ООО «МБЦ «Генериум». Российский биотерапевтический журнал. Материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А.Ю. Барышникова. М.; 2016; 1(15): 79–80.

2. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под общей ред. члена-корр. РАМН проф. Р.У. Хабриева. 2 изд., перераб. и доп. М.: Медицина; 2005.
3. Betschart-Volfensberger R., Stekol'nikov A.A., Nechaev A.Ju. Veterinary anesthesiology. St. Petersburg: SpetsLit; 2010.
4. Brenda C. Salumbides, Kristin M. Lehet, Georges Ndikuyezu and Roberto Pili; Pre-Clinical Models of Renal Carcinoma and Their Utility in Drug Development; Publication Name: Current Protocols in Pharmacology Unit Number. December 200.
5. Jonathan C. Welti, Thomas Powles, Shane Foo, Morgane Gourlaouen, Natasha Preece, Julie Foster et al. Contrasting effects of sunitinib within in vivo models of metastasis. *Angiogenesis*. 2012; 15: 623–41.
6. Published December 2009. Unit 14.13. DOI: 10.1002/0471141755.ph1413s47.
7. Alyaev Yu., Shpot E.V. Renal Cell Carcinoma. Past, Present and Fut. 2010; 8–9: 14–9.

## REFERENCES

1. Ovsepyan A.A., Katorkina Ye.I., Anisimova Ye.O. i dr. Primeneniye ortotopicheskoy modeli pochechno-kletochnoy kartsinomy RENCA v nauchno-issledovatel'skoy i prikladnoy deyatel'nosti ООО «MBTS

- "Generium"». [Application of the RENCA orthotopic model of renal cell carcinoma in research and applied activities of Generium IBC LLC]. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal. Materialy XIII Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem «Otechestvennyye protivopukholevyye preparaty» pamyati A.Yu. Baryshnikova*. Moskva; 2016; 1(15): 79–80. (in Russian).
2. Treshchalina Ye.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. i dr. Metodicheskiye ukazaniya po izucheniyu protivopukholevoy aktivnosti farmakologicheskikh veshchestv. [Methodical instructions for the study of antitumor activity of pharmacological substances]. V kn.: *Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv. Pod obshchey red. chlenkorr. RAMN prof. R.U. Khabriyeva. 2 izd., pererab. i dop Moskva: Meditsina Publ.; 2005.* (in Russian).
  3. Betshart-Volfensberger R., Stekol'nikov A.A., Nechaev A.Ju. *Veterinary anesthesiology*. St. Petersburg: SpetsLit Publ.; 2010.
  4. Brenda C. Salumbides, Kristin M. Lehet, Georges Ndikuyeze and Roberto Pili; *Pre-Clinical Models of Renal Carcinoma and Their Utility in Drug Development*; Publication Name: *Current Protocols in Pharmacology* Unit Number. December 200.
  5. Jonathan C. Welti, Thomas Powles, Shane Foo, Morgane Gourlaouen, Natasha Preece, Julie Foster et al. *Contrasting effects of sunitinib within in vivo models of metastasis*. *Angiogenesis*. 2012; 15: 623–41.
  6. Published December 2009. Unit 14.13 DOI: 10.1002/0471141755.ph1413s47.
  7. Alyaev Yu., Shpot E.V. *Renal Cell Carcinoma. Past, Present and Fut*. 2010; 8–9: 14–9.