

# МОДЕЛИРОВАНИЕ ОРТОТОПИЧЕСКОГО РОСТА РАКА ПОЧКИ ЧЕЛОВЕКА С ПЕРЕВИВАЕМЫМ ШТАММОМ РПОЧ1 НА ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ МЫШАХ

Н.В. Андропова, С.М. Ситдикова, Л.Ф. Морозова, Н.Т. Райхлин, И.А. Букаева, И.Ж. Шубина,  
М.В. Киселевский, Е.М. Трещалина

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва,  
Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Елена Михайловна Трещалина [treshalina@yandex.ru](mailto:treshalina@yandex.ru)

**Введение.** Разработка новых ортотопических моделей опухолевого роста (surgical orthotopic implantation, SOI) открывает возможность доклинического изучения потенциального антиметастатического действия препаратов, в том числе направленных на лечение диссеминированного светлоклеточного рака почки, с использованием в качестве имплантата фрагмента опухоли или метастаза от пациента. Использование подкожного (п/к) ксенографта открывает возможность оптимизации SOI с расширением возможностей применения в эксперименте. Наличие п/к ксенографта РПОЧ1, охарактеризованного трансплантационно, морфологически, иммунологически и по чувствительности к классическим противоопухолевым цитостатикам в коллекции опухолевых штаммов ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, позволяет получить ортотопическую модель для полифункционального применения при доклиническом изучении новых специфических лекарств.

**Цель исследования** — подготовка и получение доклинической ортотопической модели светлоклеточного рака почки человека с имплантатом в виде п/к ксенографта РПОЧ1.

**Материалы и методы.** Использованы п/к РПОЧ1 и иммунодефицитные мыши-самки Balb/c nude разведения РОНЦ. Трансплантационные характеристики определены при пассивировании имплантата в паренхиму почки. О результативности ортотопической имплантации в динамике судили по кинетическим, патоморфологическим и иммунологическим характеристикам с применением методов световой микроскопии, проточной цитофлуориметрии и моноклональных антител (МКА, Caltag Laboratories) против соответствующих антигенов. Лекарственная чувствительность оценена по отношению к ингибиторам тирозинкиназ по стандартным показателям ( $T/C \leq 42\%$ , число полных регрессий).

**Результаты.** При ортотопической имплантации РПОЧ1 на 7, 14 и 21 с получены опухолевые узлы размерами  $5,0 \pm 1,0 \text{ мм}^3$ ,  $215,0 \pm 88,0 \text{ мм}^3$  и  $608,0 \pm 157,0 \text{ мм}^3$ . Гистологически опухоль представлена разделенными соединительно-ткаными прослойками, солидными полями крупных полиморфных клеток с митозами (10–15 в 1 очаге) и единичными очагами некрозов на 21 с. Повышенный в 1,5 раза на 14-е сутки у мышей уровень экспрессии NK1.1 и в 3,3 раза уровень CD8a свидетельствуют о тенденции к развитию индуцированной опухолевым ростом иммуносупрессии. Показана высокая чувствительность РПОЧ1 к сорафенибу и сунитинибу ( $T/C_{\min} = 2–30\%$ ).

**Заключение.** Получен ортотопический ксенографт светлоклеточного рака почки человека РПОЧ1 со 100 % прививаемостью, воспроизводимыми биологическими, характеристиками и чувствительностью к ингибиторам тирозинкиназ, пригодный для доклинического изучения различных средств, в том числе иммунологических, или комбинаций, направленных на лечение этой патологии.

**Ключевые слова:** ортотопический имплантат, рак почки человека

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-51-60

## MODELING OF ORTHOTOPICAL GROWTH OF HUMAN KIDNEY CANCER WITH SUBCUTANEOUS XENOGRAPTS RPOCH1 ON IMMUNODEFICIENT MICE

N. V. Andronova, S. M. Sitdikova, L. F. Morozova, N. T. Raichlin, I. A. Bukaeva, I. Zh. Shubina, M. V. Kiselevsky, H. M. Treshalina  
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia

**Introduction.** Creation of new orthotopic models of tumor growth (surgical orthotopic implantation, SOI) promotes pre-clinical studies of anti-metastatic functional potential of the drugs including those which aim to treat advanced clear-cell renal carcinoma with the use of patient's tumor or metastasis sample for implantation material. The use of subcutaneous (s. c.) xenograft contributes to SOI improvement and extends experimental opportunities. The collection of tumor strains of N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center that includes s. c. xenograft RPOCh1, which was characterized by transplantation, pathological, and immunological parameters and in terms of sensitivity towards classical antitumor cytostatics, presents the base for obtaining an orthotopic model for multifunctional usage in pre-clinical studies of specific medicines.

**Objective.** Preparation and obtaining an orthotopic model of human clear-cell renal carcinoma with the implant of subcutaneous xenograft RPoch1.

**Materials and methods.** The study used s. c. RPoch1 and immunodeficient female mice Balb/c nude on the N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center breeding. Transplantation characteristics were defined during implant passages into kidney parenchyma. The effectiveness of orthotopic implantation was estimated in the dynamics according to kinetic, pathological, morphological, and immunological parameters by light microscopy, flow cytometry, monoclonal antibodies (mAb, Caltag Laboratories) against corresponding antigens. Sensitivity to specific drugs was assessed against inhibitors of tyrosine kinases according to standard parameters ( $T/C \leq 42\%$ , total regressions).

**Results.** After orthotopic implantation of RPoch1 on days 7, 14 and 21 the tumor lesions were registered with the size of  $5.0 \pm 1.0 \text{ mm}^3$ ,  $215.0 \pm 88.0 \text{ mm}^3$  and  $608.0 \pm 157.0 \text{ mm}^3$ . Histological examination showed that the tumor had separated connective tissue layers of solid areas of large polymorphic cells with mitosis (10–15 in a lesion) and single areas with necrosis on day 21. The 1.5-fold enhanced expression of NK1.1 in mice on day 14 and 3.3-fold increase of CD8a expression demonstrate the tendency to develop immune suppression induced by growing tumor. The results showed high sensitivity of RPoch1 to sorafenib and sunitinib ( $T/C_{\min} = 2–30\%$ ).

**Conclusion.** The authors obtained an orthotopic xenograft of human clear-cell renal carcinoma RPoch1 with 100 % transplantation potential, reproducible biological characteristics including immunological parameters and sensitivity to inhibitors of tyrosine kinases, which can be used for pre-clinical studies of various agents including immunological or different combinations of antitumor drugs against this cancer type.

**Key words:** orthotopic implant, human kidney cancer

## Введение

Ортотопические ксенографты получают, как правило, путем имплантации *ex tempore* фрагментов опухолей человека (операционный материал) разных локализаций иммунодефицитным мышам в тот орган, из которого получены (хирургическая ортотопическая имплантация, surgical orthotopic implantation, SOI). SOI используют на завершающем этапе доклинического изучения новых противоопухолевых препаратов для оценки действия на метастазирование или на клиническом этапе в рамках программы прогноза индивидуальной лекарственной чувствительности пациента в раннем послеоперационном периоде (колоректальный рак) [1]. Однако прогноз лекарственной чувствительности на этой модели оправдан только для противоопухолевых цитостатиков и существенно ограничен для иммунотерапевтических или таргетных средств [2]. Недостатком метода является также отсутствие гарантированной 100 % ортотопической имплантации операционного материала, так как имплантат в силу случайной выборки фрагмента опухоли может не содержать необходимого для опухолевого роста пула пролиферирующих клеток при смене микроокружения. Как правило, не представляется возможным повторно взять материал у пациента. Использование опухолевого материала с воспроизводимыми трансплантационными и биологическими характеристиками, например подкожного (п/к) ксенографта для получения ортотопической модели, позволило бы оптимизировать SOI. Не удалось найти подобные эксперименты в тематической литературе.

Нами апробирована возможность получения ортотопической модели рака почки человека с использованием п/к ксенографта РПоч1 из коллекции ФГБУ «Российский онкологический онкологический

центр им. Н.Н. Блохина» (РОНЦ им. Н.Н. Блохина) Минздрава России. Ксенографт получен из удаленного опухолевого узла пациента РОНЦ им. Н.Н. Блохина [3]. Важно также, что в коллекции есть депонированная во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов оригинальная клеточная линия РПоч1 (рег. № Н-165). Такая тест-система выигрышна еще и потому, что позволяет оценить антипролиферативное действие агента или комбинации последовательно на 1 модели *in vitro* / *in vivo*. Наиболее ценными являются оценка чувствительности модели к современному стандарту лечения (ингибиторам тирозинкиназ) и наличие онкомишени для апробации инновационных таргетных средств, например CTLA-4 – ключевой мишени иммунологического надзора (immune checkpoint blockade) для аналогов ипилимумаба [4].

Штамм РПоч1 имеет строение трабекулярно-папиллярной светлоклеточной аденокарциномы с узелками папиллярного рака. PAS+-окрашивание четко прослеживает базальные мембраны, на которых расположен многоядный и цилиндрический эпителий. Опухоль характеризуется общей продолжительностью клеточного цикла 28,2 ч со следующей продолжительностью фаз:  $G_1+1/2M - 8,5$  (8,3–8,9) %,  $S - 14,9$  (14,6–15,3) %,  $G_2+1/2M - 4,8$  (4,7–5,0) %. Пролиферативный пул в момент перевивки: 21,0 (20,4–23,1) % клеток. Уровень синтеза ДНК в клетках, определенный по интенсивности радиоактивной метки (импульс/минута):  $^3H$ -тимидин – 759 (629–1003),  $^3H$ -дезоксисуридин – 896 (805–1200). В опухоли определяются гормональные рецепторы человека к андрогенам (114,0), выражена экспрессия онкогенов *sis*, *p53*, *c-myc* и *myb*. П/к ксенографт отличается отсутствием чувствительности к классическим противоопухолевым цитостатикам: дактиномицину, блеомицину,

метотрексату, проспидину, гексаметилмеламину, винбластину, 5-фторурацилу, адриамицину и CCNU. Чувствительность к ингибиторам тирозинкиназ, современному стандарту лечения, ранее не определялась. В связи с этим целесообразно оценить состояние иммунологического надзора у мышей Balb/c nude с РПоч1 для изучения средств иммунотерапии и дополнить характеристику лекарственной чувствительности к ингибиторам тирозинкиназ. Полученные данные можно экстраполировать на ортотопическую модель, поскольку у клеток метастатических узлов и первичной опухоли лекарственная чувствительность идентична. С учетом иммунопривилегированной зоны подкапсульного пространства почки и для адекватного неоангио- и васкулогенеза имплантацию следует выполнять в паренхиме органа.

Приведенные выше свойства светлоклеточного рака почки человека РПоч1 *in vivo* открывают возможность модификации SOI, направленной на получение доклинической ортотопической модели с использованием п/к ксенографта. Полученная модель может применяться для прогноза эффективности различных фармакологических средств лечения первичного или метастатического светлоклеточного рака почки человека. В соответствии с этим сформулированы цель и задачи исследования.

**Цель исследования** — подготовка и получение доклинической ортотопической модели светлоклеточного рака почки человека с имплантатом в виде п/к ксенографта РПоч1.

**Задачи:**

- оценка чувствительности п/к ксенографта перевиваемого рака почки человека РПоч1 к ингибиторам тирозинкиназ;
- определение основных характеристик ортотопического роста п/к ксенографта РПоч1 человека в почке мышей Balb/c nude с патоморфологической идентификацией;
- определение показателей иммунологического надзора при ортотопическом росте п/к рака почки человека РПоч1 у мышей Balb/c nude.

**Материалы и методы**

**Оценка чувствительности подкожного ксенографта перевиваемого рака почки человека РПоч1 к ингибиторам тирозинкиназ**

П/к ксенографт перевиваемого рака почки человека РПоч1 трансплантировали по стандартной методике всем взятым в опыт животным, которых ранжировали по группам. Одну из групп оставляли без специфического лечения и считали контрольной. Остальные группы получали ингибиторы тирозинкиназ, входящие в стандарты лечения диссеминированного рака почки человека [5–8].

**Использованные препараты:**

- нексавар (сорафениб, Bayer Health Care AG, Bayer Schering Pharma AG, Германия), 1 упаковка, содержащая 112 таблеток по 200 мг;
- сутент (сунитиниб, Pfizer, США, Pfizer Italia, Италия), 1 флакон, содержащий 30 капсул по 12,5 мг и 2 упаковки, содержащие по 28 капсул по 25 мг.

Препараты вводили мышам перорально металлическим зондом в оптимальных схемах применения. Проведено по 1 циклу лечения с сорафенибом или сунитинибом. Кроме того, выполнено последовательное лечение сорафенибом и сунитинибом для моделирования клинической ситуации, при которой сунитиниб назначают во 2-й линии после малоэффективного курса сорафениба в 1-й линии лечения.

Один цикл лечения включал 15-дневный курс введения сорафениба или 10-дневный курс сунитиниба с началом через 72 ч после трансплантации опухоли. Две линии лечения выполняли последовательно, применяя цитостатики при перекрывающейся экспоненциальную фазу роста опухоли сокращенной схеме лечения и уменьшенных соответственно суммарных дозах препаратов. Первую линию лечения начинали через 72 ч после трансплантации опухоли, 2-ю — сразу после окончания 1-й, т. е. на 8-е сутки после трансплантации опухоли.

Для проведения экспериментов составлены следующие группы численностью 10–15 мышей:

- группа 1 — контроль роста опухоли;
- группа 2 получала 1 цикл лечения сорафенибом в желудок ежедневно 15 дней, суммарные дозы — 150–450 мг/кг;
- группа 3 получала 1 цикл лечения сунитинибом в желудок ежедневно 10 дней, суммарные дозы — 200–800 мг/кг;
- группа 4 получала 2 линии лечения ежедневно по 5 дней сорафенибом в желудок в суммарной дозе 50 мг/кг (1-я линия) + сунитиниб в суммарной дозе 100 мг/кг (2-я линия). Общая продолжительность 2 линий лечения — 10 дней.

Оценку эффективности проводили с использованием стандартных показателей Т/С, % (treatment/control, критерий  $T/C \leq 42\%$  [2]) и числа полных регрессий в сравнении с контролем. Для вычисления показателей многократно измеряли объем опухоли, рассчитывая индивидуальный и средний объемы в каждой группе.

Оценка переносимости лечения выполнена путем визуального контроля за поведением и состоянием животных в процессе и после лечения, а также по результатам аутопсии внутренних органов.

По завершению экспериментов все животные были умерщвлены передозировкой эфирного наркоза с соблюдением принятых в международной практике гуманных методов.

### Биологические характеристики ортотопического роста РПоч1

О результативности ортотопической имплантации судили по кинетическим и патоморфологическим характеристикам. Материал для трансплантации получали из 3-го пассажа п/к ксенографта рака почки человека РПоч1 иммунодефицитным мышам Balb/c nude [3, 9]. Фрагмент опухолевого узла объемом  $1,0 \text{ мм}^3$ , извлеченного у наркотизированной мыши при соблюдении правил асептики и антисептики, использовали *ex tempore* в качестве материала для ортотопической трансплантации. В условиях билатерального ламинара мышей-реципиентов ( $n = 30$ ), находящихся под золотильным наркозом, фиксировали на операционном столике. Кожу обрабатывали 70 % раствором этилового спирта и делали разрез в поясничной области. Кожу отсепарировали, вскрывали заднюю брюшную стенку между веточками поясничных нервов над просвечивающей почкой. Почку захватывали мягким малым глазным пинцетом и в области задней поверхности верхнего полюса делали брюшистым скальпелем разрез глубиной 2–3 мм, через который помещали в паренхиму почки заранее приготовленный фрагмент для трансплантации. Мышцы и кожу послойно ушивали непрерывным швом. После трансплантации за мышами наблюдали в течение 28 дней с ежедневным контролем поведения и состояния.

Кинетику роста РПоч1 в почке определяют по среднему объему опухолевого узла на 7-е ( $n = 10$ ), 14-е ( $n = 10$ ) и 21-е ( $n = 10$ ) сутки после трансплантации опухоли. Мышей умерщвляли дислокацией шейных позвонков, извлекали почку с опухолью и измеряли объем опухолевого узла в 3 проекциях ( $V_{\text{ср}} = a \times b \times c$ ).

Патоморфологическое исследование опухолевых узлов в почке на 14-е и 21-е сутки после трансплантации проводили методом световой микроскопии (Polivar, Австрия) окрашенных гематоксилином и эозином срезов.

Статистический анализ данных выполняли с помощью стандартного метода Фишера.

### Методика иммунологического исследования

Иммунологическое исследование касалось оценки поверхностных маркеров спленоцитов мышей с ортотопически трансплантированным перевиваемым раком почки человека РПоч1 ( $n = 5$ ). Использован метод проточной цитофлуориметрии с лазерным проточным цитометром FACSCanto II™ (Becton Dickinson & Co, США) с программным пакетом BD FACSDiva [10]. Уровень экспрессии поверхностных маркеров изучаемых клеток определяют при помощи моноклональных антител (МКА, Caltag Laboratories)

против соответствующих антигенов в сравнении с интактными животными ( $n = 5$ ).

Мышинные спленоциты отмывают холодным фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с 1 % фетальной телячьей сывороткой (ФТС) и инкубируют с МКА, конъюгированными с красителем флуоресцеин изотиоционатом (FITC) или фикоэритрином (PE) согласно инструкции производителя. Отмывают 2 раза холодным ФСБ с 1 % ФТС. Клетки фиксируют в ФСБ, содержащем 1 % раствор параформальдегида. На проточном цитометре определяют уровень экспрессии дифференцировочных антигенов лимфоцитов CD3, CD4, CD8a, CD19, NK1.1, активационных антигенов CD38, молекул главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) класса II; костимулирующих молекул CD40, CD80/B7–1, CD86/B7–2. Данные анализируют после выделения соответствующего гейта клеточной популяции в режиме dot/plot – распределения клеток по их линейному прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию. При учете результатов подсчитывают 5000 событий в гейте. Данные представляют процентное содержание клеток, экспрессирующих определенный маркер, в общем пуле гейтированных клеток.

### Результаты

#### Оценка чувствительности подкожного ксенографта перевиваемого рака почки человека РПоч1 к ингибиторам тирозинкиназ

Показано, что п/к ксенографт перевиваемого рака почки человека РПоч1 обладает высокой чувствительностью к противоопухолевой химиотерапии ингибиторами тирозинкиназы – сорафенибом и сунитинибом.

Сорафениб при 15-кратном курсе в разовых дозах 10–30 мг/кг (суммарно 150–450 мг/кг) вызывал достоверный противоопухолевый эффект в течение 9 дней после окончания введения,  $T/C_{\text{min}} = 9–28 \%$ . Переносимость лечения была удовлетворительной при разовой дозе 10 мг/кг (суммарно 150 мг/кг), более высокие дозы были эффективными, но сопровождалась токсичностью (табл. 1).

Сунитиниб при 10-кратном курсе в разовых дозах 20–80 мг/кг (суммарно 200–800 мг/кг) также был эффективен и приводил к  $T/C_{\text{min}} = 2–23 \%$ , достоверному лишь на 1 срок при разовой дозе 40 мг/кг (суммарно 400 мг/кг). При разовых дозах 40 и 80 мг/кг сунитиниб вызывал дозозависимую гибель мышей после 5 приемов препарата в рамках 10-кратного курса с характерными для препарата побочными эффектами (окраской кожных покровов) (табл. 2).

При проведении 2 линий лечения с последовательным применением сорафениба и сунитиниба 5-кратным курсом на 5-е сутки после окончания лечения получено достоверное ингибирование роста



Таблица 1. Чувствительность п/к ксенографта перевиваемого рака почки человека РПоч1 к сорафенибу

Группа	Разовая доза*	Средний объем опухоли на сутки после трансплантации			Т/С, %, на сутки после окончания лечения			Гибель от токсичности
		18	22	26	1	5	9	
Контроль (вода)	0,3 мл	335 (83–587)	509 (109–909)	1032 (840–1225)	100	100	100	—
Сорафениб	10 мг/кг	31 (8–175)	137 (87–187)	288 (175–490)**	9	27	28**	0/10
	20 мг/кг	51 (18–84)	94 (26–162)	154 (64–528)**	15	18	15**	2/10 10 с
	30 мг/кг	57 (24–90)	90 (50–130)	324 (27–504)**	17	18	31**	7/10*** 8, 13 с

\*Лечение ежедневно на 3–18-й дни после трансплантации опухоли, \*\* $p < 0,05$ ; \*\*\*картина гибели — уменьшение массы селезенки, дистрофия печени;  $n = 10$ .

опухоли, Т/С = 30 % ( $p < 0,05$ ). Этот эффект удерживался до 14 сут на уровне Т/С = 27–33 % ( $p < 0,05$ ) (табл. 3, 4).

Определение основных характеристик ортотопического роста п/к ксенографта РПоч1 человека в почке мышей Balb/c nude с патоморфологической идентификацией.

Развитие опухолевых узлов перевиваемого рака почки человека РПоч1 в почке иммунодефицитных мышей Balb/c nude демонстрируют следующие рисунки. На рис. 1 показана массовая доля опухоли по отношению к ткани почки в течение 3 нед после трансплантации. Опухолевые узлы в почке визуализируются уже на 7-е сутки после ортотопической трансплантации фрагментов объемом 1,0 мм<sup>3</sup>, которые занимают не более 1/5–1/7 почки. На 14-е сутки после трансплантации опухолевые узлы занимают более половины ткани почки либо практически одинаковой с ней величины. Значимой динамики до 21-х суток не выявлено.

Кинетика роста опухолевых узлов РПоч1 в почке в течение 3 нед после трансплантации представлена в табл. 5. Видно, что на 7-е сутки опухолевые узлы достигают 9,0 мм<sup>3</sup>,  $V_{\text{ср}} = 5,0 \pm 1,0$  мм<sup>3</sup>. На 14-е сутки после трансплантации максимальный объем опухолевых узлов составил 486,0 мм<sup>3</sup> при  $V_{\text{ср}} = 215,0 \pm 88,0$  мм<sup>3</sup>.

Таблица 2. Чувствительность п/к ксенографта перевиваемого рака почки человека РПоч1 к сунитинибу

Группа	Разовая доза*	Средний объем опухоли, мм <sup>3</sup> , на сутки после трансплантации			Т/С, %, на сутки по- сле окончания лечения			Гибель от токсичности		
		18	22	26	5	9	13	Число павших	Сутки по отношению к лечению	
									после начала	после окончания
Контроль	Вода 0,3 мл	335 (83—587)	509 (109—909)	1032 (840—1225)	100	100	100	—	—	—
Сунитиниб	20 мг/кг	43 (б. разброс)	279 (б. разброс)	437 (33—841)	13	55	43	3/10	7	2—4
					n = 7					
Сунитиниб	40 мг/кг	21 (б. разброс)	39 (б. разброс)	148 (45—392) **	6	8	14**	7/10***	10	5, 8, 12
					n = 3					
Сунитиниб	80 мг/кг	77	330	672	23	65	65	8/10***	1, 5	1, 8
					n = 2					

\*Лечение ежедневно на 3–12-й дни после трансплантации опухоли. \*\* $p < 0,05$ . \*\*\* При дозе 40 мг/кг после 5 введений появилась интенсивная желтовато-зеленоватая окраска кожных покровов; картина гибели: понос, окраска кожных покровов и органов брюшной полости (кишечника, передней брюшной стенки, признаки геморрагического колита), уменьшение массы селезенки, дистрофия печени. \*\*\* При дозе 40 мг/кг некоторое уменьшение массы тела, слабая желтовато-зеленоватая окраска кожных покровов; картина гибели: уменьшение массы селезенки, раздражение кишечника; при дозе 80 мг/кг после 5 введений появилась интенсивная желтовато-зеленоватая окраска кожных покровов; картина гибели: понос, интенсивная окраска кожных покровов и органов брюшной полости (кишечника, передней брюшной стенки, признаки геморрагического колита), уменьшение массы селезенки, раздражение кишечника, дистрофия печени.

**Таблица 3.** Чувствительность п/к ксенографта перевиваемого рака почки человека РПоч1 к последовательному лечению сорафенибом и сунитинибом

Группа	Режим лечения	Средний объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) на сутки после трансплантации опухоли				Т/С, %, на сутки после окончания лечения			
		1	2	3	4	1	2	3	4
Контроль	Вода 0,3 мл 10 дн.	926 (824–1028)	1058 (915–1201)	1246 (1159–1333)	1526 (1430–1622)	100			
Сорафениб + сунитиниб	10 × 5 20 × 5	276 (228–324)	288 (226–350)	343 (281–405)	504 (404–604)	30*	27*	28*	33*

**Примечание.** Отличие от контроля достоверно, \* $p < 0,05$ . Контроль: измерения опухолей после перевивки (сутки): 1–18, 2–20, 3–22, 4–27. Расчет Т/С, % (сутки после окончания лечения): 1, 3, 5, 10.

**Таблица 4.** Воспроизводимость чувствительности п/к ксенографта перевиваемого рака почки человека РПоч1 к ингибиторам тирозинкиназ

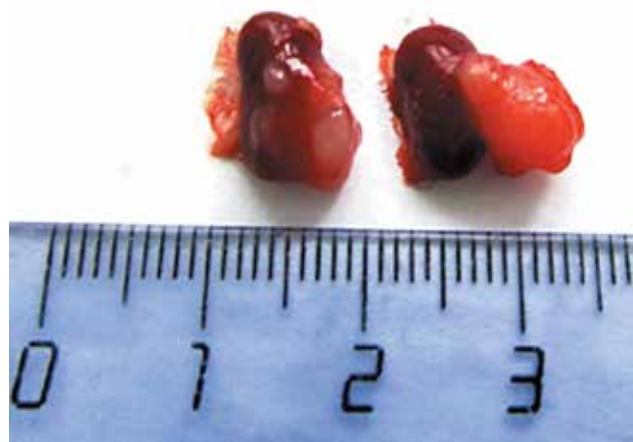
Группы	Разовая доза*	Средний объем опухоли на сутки после трансплантации				Т/С, %, на сутки после окончания лечения			
		18	20	22	27	1	3	5	10
Контроль	Вода 0,3 мл	1068 (868–1268)	1341 (1161–1521)	1418 (1242–1594)	2015 (1801–2229)	100			
1-й опыт: сорафениб + сунитиниб	10 × 5 20 × 5	276 (228–324)	288 (226–350)	343 (281–405)	504 (404–604)	30*	27*	28*	33*
2-й опыт: сорафениб + сунитиниб	10 × 5 20 × 5	374 (276–472)	388 (292–484)	397 (319–475)	605 (515–695)	35*	29*	28*	30*

**Примечание:**  $n = 10–12$ , лечение ежедневно на 3–18-й дни после трансплантации опухоли, \* $p < 0,05$ .

На 21-е сутки максимальный объем опухолевых узлов составил 936,0 мм<sup>3</sup> при  $V_{cp} = 608,0 \pm 157,0$  мм<sup>3</sup>.

Гистологическая картина опухолевых узлов РПоч1 в ткани почки на 14-е и 21-е сутки после трансплантации показала следующее. На 14-е сутки после ортотопической трансплантации рака почки человека РПоч1 в ткани почки различаются корковый

и мозговой слои (рис. 2). В корковом слое видны почечные тельца (клубочки), окруженные тонкой капсулой и содержащие мелкие кровеносные сосуды (капилляры). Клубочки окружены большим количеством извитых канальцев, являющихся частью нефрона. В мозговом слое преобладают продольно расположенные канальцы. В почке имеются кровеносные сосуды, местами полнокровные. Почка окружена капсулой. В ткани почки обнаружены 1–2 участка разрастания опухоли. Эти участки мелкие, располагаются под капсулой, состоят из полиморфных опухолевых клеток, растущих в виде солидных полей. В отдельных участках опухоли встречаются единичные митозы. На 21-е сутки после трансплантации опухолевые разрастания крупные, занимают большую часть ткани почки. Ее сохранившиеся участки содержат извитые и прямые канальцы, почечные клубочки, кровеносные сосуды. Местами почечная ткань сдавлена. Опухоль состоит из крупных полиморфных клеток, образующих солидные поля, которые в некоторых местах разделены тонкими соединительно-ткаными прослойками, имеются единичные мелкие очаги некрозов. Во многих участках опухоли встречаются митозы, их количество достигает 10–15 в 1 очаге.



**Рис. 1.** Опухолевые узлы ортотопического ксенографта перевиваемого рака почки человека РПоч1 на 14-е сутки после трансплантации, максимальный объем 486,0 мм<sup>3</sup>

Результаты морфологического исследования дают основание считать, что период между 14-ми и 21-ми сутками опухолевого роста в почке является наиболее благоприятным для проведения терапии, направленной на подавление цитопролиферации ортотопической опухоли.

**Определение показателей иммунологического надзора при ортотопическом росте подкожного рака почки человека РПоч1 у мышей Balb/c nude**

Иммунологические показатели мышей Balb/c nude с ортотопическим ксенографтом перевиваемого рака почки человека РПоч1 представлены в табл. 6 и на рис. 3 и 4. Результаты иммунофенотипирования спленоцитов селезенки иммунодефицитных мышей с ортотопически трансплантированным ксенографтом перевиваемого рака почки человека РПоч1 представлены в табл. 6. Видно, что на 14-е сутки после трансплантации уровень экспрессии маркеров иммунитета у мышей возрастает: NK1.1 — в 1,5 раза, CD8a — в 3,3 раза. Показатели активации макрофагального звена и маркеры активационных антигенов CD38 и МНС II свидетельствуют о тенденции к снижению числа клеток, экспрессирующих эти антигены.

Рисунок в формате DotPlot: ось x, y — логарифмическая шкала, интенсивность флуоресценции MFI представляет экспрессию поверхностных клеточных маркеров, конъюгированных с FITC или PE.

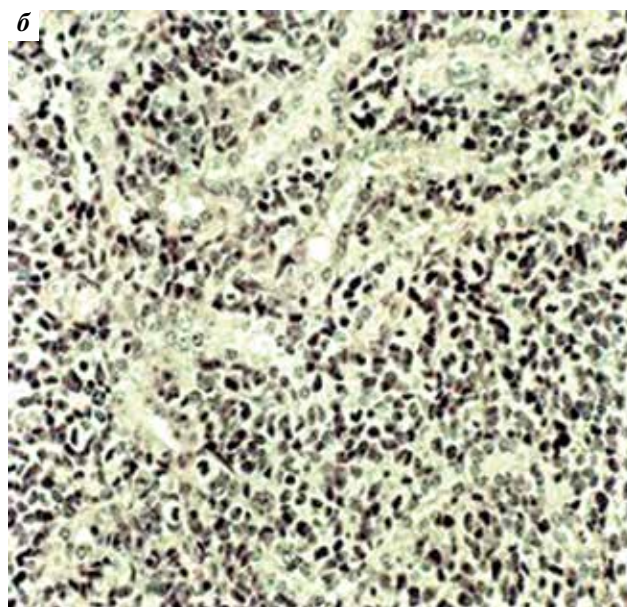
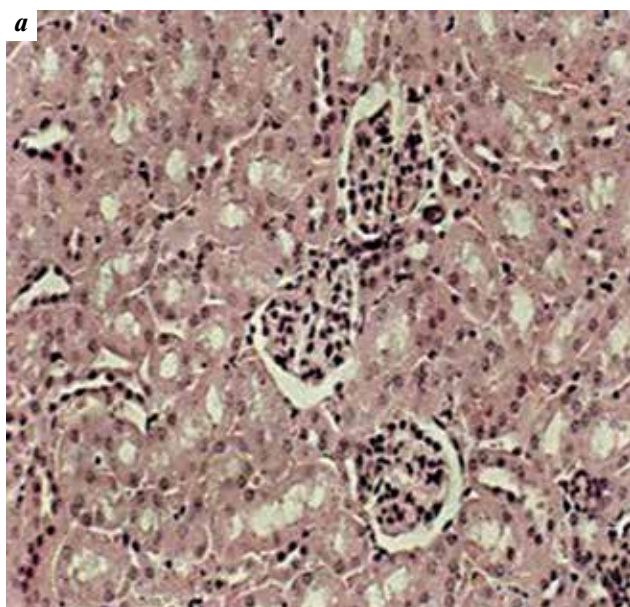
Полученные данные свидетельствуют о том, что на фоне некоторого оживления исходно дефектного врожденного иммунитета гибридных иммунодефицитных мышей Balb/c nude ортотопический ксено-

**Таблица 5.** Кинетика роста ортотопического ксенографта перевиваемого рака почки человека РПоч1 у иммунодефицитных мышей Balb/c nude

Номер мыши	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ), 1 пассаж на сутки после имплантации фрагмента			
	7	14	21	28
1	3,0	270,0	840,0	2808,0
2	3,0	160,0	420,0	2244,0
3	3,0	486,0	936,0	—
4	9,0	288,0	280,0	—
5	4,0	120,0	539,0	—
6	3,0	120,0	448,0	—
7	6,0	210,0	504,0	—
8	6,0	192,0	864,0	—
9	6,0	140,0	648,0	—
10	4,0	168,0	—	—
Среднее арифм.	5,0 ± 1,0	215,0 ± 88,0	608,0 ± 157,0	2526,0 ± 750,0

*Примечание.* Прочерк означает, что исследование не проводилось.

графт перевиваемого рака почки человека РПоч1 в стадии активной пролиферации вызывает иммунодепрессию, характерную для начала диссеминированного процесса.

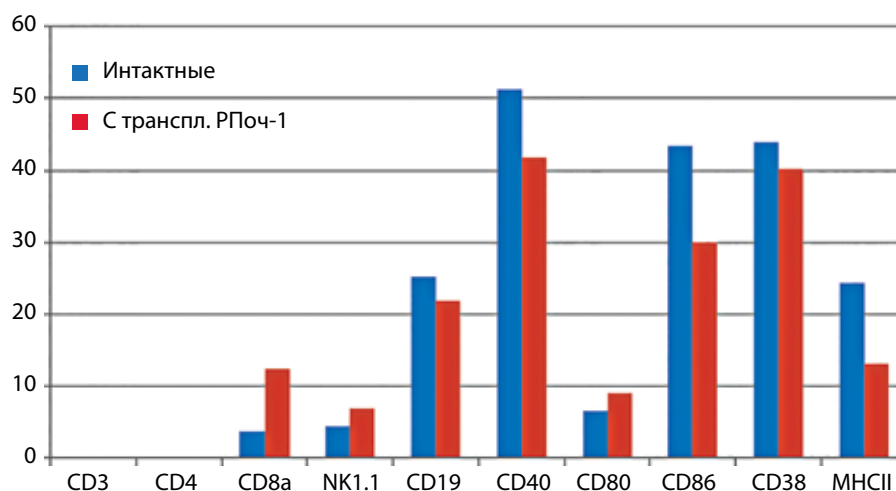


**Рис. 2.** Почка с ортотопическим ксенографтом перевиваемого рака почки человека РПоч1 на 14-е сутки после трансплантации, ×200

**Таблица 6.** Субпопуляции спленоцитов, экспрессирующих поверхностные антигены у иммунодефицитных мышей Balb/c nude с ортотопическим ксенографтом перевиваемого рака почки человека РПоч1

Маркер	Интактные животные (M ± m)	Животные с трансплантированным раком почки РПоч1 (M ± m)
CD3	0,0	0,0
CD4	0,0	0,0
CD8a	3,8 ± 1,6	12,4 ± 1,1
NK1.1	4,5 ± 1,6	6,9 ± 1,7
CD19	25,3 ± 3,7	21,8 ± 2,9
CD40	51,3 ± 4,4	41,8 ± 1,6
CD80	6,5 ± 2,9	9,0 ± 2,2
CD86	43,4 ± 2,6	30,1 ± 3,2
CD38	44,0 ± 3,1	40,2 ± 2,4
МНС II	24,4 ± 1,6	13,1 ± 1,5

**Примечание.** Поверхностные клеточные маркеры: CD3 – зрелые T-лимфоциты; CD4 – T-хелперы; NK1.1 – натуральные киллеры; CD8a экспрессируется на НК-клетках, есть данные об экспрессии на незрелых дендритных клетках (ДК); CD19 – В-лимфоциты; CD40 – ко-стимулирующая молекула антигенпрезентирующих клеток (АПК); CD80 – ко-стимулирующая молекула АПК, может экспрессироваться на активированных В-лимфоцитах; CD86 – ко-стимулирующая молекула АПК, может экспрессироваться на активированных В-лимфоцитах; CD38 – активационный антиген, экспрессируется на НК-клетках, В-лимфоцитах; МНС II – молекула гистосовместимости II класса, ограниченно экспрессируется на клетках некоторых типов, включая дендритные клетки и В-лимфоциты.



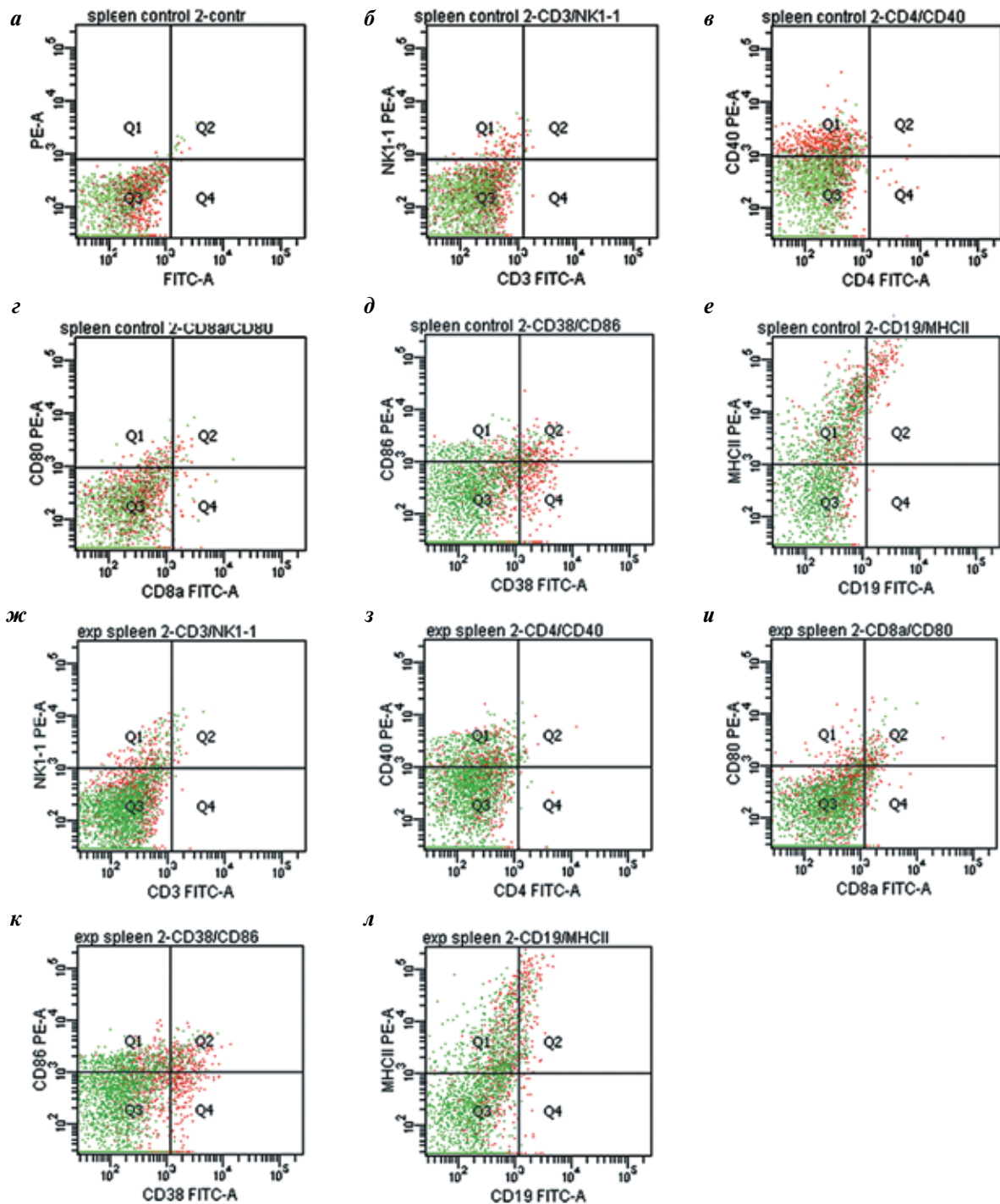
**Рис. 3.** Содержание различных субпопуляций спленоцитов у мышей Balb/c nude с ортотопическим ксенографтом перевиваемого рака почки человека РПоч1 и у интактных мышей

### Заключение

В результате проведенных исследований на иммунодефицитных мышях Balb/c nude разведения ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработана новая оригинальная методика получения ортотопического ксенографта, позволяющая оптимизировать технологию SOI. Воспроизводимый ортотопический рост п/к ксенографта рака РПоч1 человека в почке иммунодефицитной мыши Balb/c nude получен с помощью трансплантационных манипуляций под контролем таких биологических характерис-

тик, как прививаемость, контроль параметров роста, элементы иммунологического надзора и чувствительность к ингибиторам специфических тирозинкиназ. Принципиальным отличием методики от SOI, использующей опухолевый материал от пациента в качестве имплантата, является имплантат в виде п/к ксенографта с гарантированной 100 % ортотопической имплантацией, воспроизводимыми биологическими, в том числе иммунологическими, характеристиками и известной лекарственной чувствительностью. Это открывает возможность не только





**Рис. 4.** Экспрессия различных маркеров (данные проточной цитометрии) на субпопуляции спленоцитов мышей Balb/c nude с ортотопическим ксенографтом перевиваемого рака почки человека РПоч1 и у intactных мышей: а – intactные животные, контроль; б – intactные животные, двойная метка CD3/NK1.1; в – intactные животные, двойная метка CD4/CD40; г – intactные животные, двойная метка CD8a/CD80; д – intactные животные, двойная метка CD38/CD86; е – intactные животные, двойная метка CD19/MHC II; ж – животные с трансплантированной опухолью, CD3/NK1.1; з – животные с трансплантированной опухолью, двойная метка CD4/CD40; и – животные с трансплантированной опухолью, двойная метка CD8a/CD80; к – животные с трансплантированной опухолью, двойная метка CD38/CD86; л – животные с трансплантированной опухолью, двойная метка CD19/MHC II

исследовать на такой модели антиметастатическое действие агентов и составлять прогноз эффективности, но и отрабатывать на доклиническом этапе

биодоступность новых средств, в том числе иммунологических, или комбинаций, направленных на лечение этой патологии.

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Survey of antitumor and toxicity test systems. EORTC. Screening and Pharmacology Group 1989; Oct.: 23–25.
2. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. С. 642–657.
3. Трещалина Е.М. Коллекция опухолевых штаммов человека. Под ред. М.И. Давыдова. М.: Практическая медицина, 2009. С. 37–38.
4. Самойленко И.В., Харкевич Г.Ю., Демидов Л.В. Применение блокатора рецепторов CTLA4 в лечении больных метастатической меланомой. Российский медицинский журнал 2015;1:4–9.
5. Носов Д.А. Рак почки. В кн.: Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Под ред. Н.И. Переводчиковой, В.А. Горбуновой. М.: Практическая медицина, 2015. С. 294–300.
6. Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and approval. Ed. by B.A. Teicher, P.A. Andrews. 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2004. 450 p.
7. Michel S.M., Vervenn E.W., De Santis M. et al. SWITCH: A randomized sequential open-label study to evaluate efficacy safety of sorafenib (SO)/sunitinib (SU) versus SU/SO in the treatment of metastatic renal cell cancer (mRCC). J Clin Oncol 2014;32(4):393. DOI: 10.1016/j.eururo.2015.04.017. PMID: 25952317.
8. Rini B.I., Escudier B., Tomczar P. et al. Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. Lancet 2011;378(9807):1931–9. DOI: 10.1016/S0140–6736(11) 61613–9. PMID: 22056247.
9. Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши разведения РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Возможности использования. М.: Издательская группа РОНЦ, 2010.
10. Шубина И.Ж., Чикилева И.О., Михайлова И.Н. и др. Активированные натуральные киллеры в клеточной иммунотерапии. Российский иммунологический журнал 2012;6(15);1:71–9.