

## Б. Экспериментальные исследования

© Коллектив авторов, 2021  
УДК 616-006.6:612.084:612.089-61  
doi: 10.37469/0507-3758-2021-67-1-127-133

Вопросы онкологии, 2021. Том 67, № 1

*А.С. Гончарова<sup>1</sup>, Т.П. Протасова<sup>1</sup>, Е.А. Лукбанова<sup>1</sup>, В.Г. Воловик<sup>1</sup>, М.В. Миндарь<sup>1</sup>,  
Д.В. Ходакова<sup>1</sup>, А.В. Волкова<sup>1</sup>, Е.В. Заикина<sup>1</sup>, С.В. Чапек<sup>2</sup>, Н.С. Карнаухов<sup>1</sup>,  
Д.С. Потемкин<sup>1</sup>, Н.Г. Васильченко<sup>1</sup>, А.Ю. Максимов<sup>1</sup>*

### Разработка метода получения ксеногенной опухолевой модели с использованием пористого металлического скаффолда

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону,

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Донской государственный технический университет» Министерства образования Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону

Цель исследования — разработка метода получения ксеногенной опухолевой модели путем подкожной трансплантации пористого металлического скаффолда, заселенного культуральными клетками карциномы легкого человека.

Материалы и методы. Проведено исследование на 14 бестимусных самцах мышей Balb c/nude в возрасте 8-90 недель, массой 20-24 г. Всем животным подкожно в правую переднебоковую область спины вводили культуральные клетки человеческой карциномы легкого А549. В качестве носителей опухолевых клеток у животных основной группы (гр. 1, n=4) служили скаффолды с диаметром пор 0,5 мм, изготовленные из титан-алюминий-ванадиевого сплава при помощи промышленного 3D-принтера. Скаффолды были засеяны  $3 \times 10^6$  клеток культуры А549 и после инкубации в течение 7 дней имплантированы животным-реципиентам. В качестве сравнения использовали результаты перевивки опухолевой культуры с матригелем (100 мкл) в двух группах животных с разной дозировкой клеточной суспензии: в максимальной для *in vivo* прививочной дозе ( $10 \times 10^6$  клеток на мышь, 2 гр., n=5) и половиной максимальной дозы ( $5 \times 10^6$  соответственно, 3 гр., n=5). Затем в течение 55 суток отслеживали динамику роста опухолей в группах подопытных мышей: объемы ксенографтов рассчитывали по формуле Шрека для эллипсоида. По окончании эксперимента животным была выполнена эктаназия методом цервикальной дислокации.

Результаты. Контроль динамики объемов полученных ксенографтов показал, что наибольшие значения показателя наблюдались у мышей с имплантированными скаффолдами. Самый медленный рост ксенографтов был отмечен у животных, получивших максималь-

ную прививочную дозу опухолевых клеток с матригелем. Результат гистологического исследования показал соответствие опухолевого материала, полученного от всех животных, карциноме легкого А549.

Заключение. Использование металлического пористого скаффолда, предварительно инкубированного с клетками культуры А549 и имплантированного подкожно бестимусным мышам Balb c/nude, позволяет получить хорошо растущие ксенографты, гистологически соответствующие моделируемой опухоли.

Ключевые слова: клеточная культура А549; подкожные ксенографты; бестимусные мыши; опухолевая модель; скаффолды; матригель

#### Введение

Важную роль в экспериментальной онкологии играет выбор адекватной тест-системы, так как от спектра ее свойств и характеристик зависит возможность корректного моделирования изучаемых биологических процессов. В течение долгого времени классическим объектом в таких исследованиях остаются сингенные и ксеногенные модели *in vivo*, создаваемые путем инокуляции или трансплантации опухолевого материала экспериментальным животным. В настоящее время достаточно прочно утвердилось мнение относительно целесообразности проведения доклинических испытаний противоопухолевых средств *in vivo* с применением ортотопических patient derived xenograft — так называемых PDX-моделей [1, 2]. В многочисленных исследованиях показано, что PDX наиболее полно воспроизводят возможные варианты терапевтического ответа, поскольку они сохраняют клеточную гетерогенность, архитектуру и молекулярные характеристики человеческих опухолей

[2, 3]. Тем не менее, наиболее удобным и распространенным способом моделирования опухолевого процесса по-прежнему остается подкожная ксенотрансплантация линий раковых клеток, позволяющая без больших временных затрат получать хорошо описываемую и легко контролируруемую экспериментальную модель [4, 5].

В целях оптимизации процесса приживления культуральных клеток в организме животных-реципиентов применяют носители в виде гидрогелей или трехмерных матриц (скаффолдов) [6]. Такие носители позволяют не только уменьшать расход перевиваемого материала, но и получать ксенографты с фенотипическими характеристиками, соответствующими донорским опухолевым тканям [7]. В ряде работ показано, что применение 3D-каркасов, заселенных злокачественными клетками, приближает исследователей к моделированию не только клеточного фенотипа, но и тканевого, включая сложные опухоле-стромальные взаимодействия, ангиогенез, а также эпителиально-мезенхимальный переход, инвазию и метастазирование [4, 8, 9, 10].

Скаффолды из натурального материала успешно используются в качестве трехмерных матриц для изучения роста опухолевых клеток *in vitro* и моделирования микроокружения опухоли *in vivo* [11]. Однако остаточные антигенные свойства скаффолдов на основе ксеногенного внеклеточного матрикса остается главным препятствием к их широкому использованию [12, 13]. В качестве альтернативы 3D-матрицам естественного происхождения получили распространение биосовместимые неиммуногенные синтетические каркасы [14, 15]. Важными в выборе материала для носителя перевиваемых клеток в исследованиях *in vivo* являются такие характеристики, как хорошая приживляемость, отсутствие токсичности и туморогенности. Скаффолды из титан-алюминий-ванадиевого сплава отвечают вышеупомянутым требованиям [16, 17, 18], а их физические свойства обеспечивают возможность высокотемпературной стерилизации и повторно-го использования.

Целью исследования стала разработка и оценка эффективности метода получения ксеногенной опухолевой модели путем подкожной трансплантации бестимусным мышам пористого металлического скаффолда, заселенного клетками карциномы легкого человека в культуре A549.

### Материалы и методы

Исследование было проведено на 14 самцах бестимусных мышей Balb c/nude (рис. 1а) конвенционального содержания в возрасте 8-9 недель, массой 20-24 г. Все манипуляции с животными выполняли согласно правилам гуманного обращения и этики проведения исследований на позвоноч-

ных [19]. В эксперименте использовали минимальное количество особей, соблюдая правило 3R (replacement, reduction and refinement) [20].

Для получения подкожной опухолевой модели были использованы культуральные клетки карциномы легкого человека A549. Определение жизнеспособности и подсчет опухолевых клеток перед перевивкой осуществляли при помощи автоматического счетчика клеток EVE (Корея) по стандартной методике с трипановым синим.

В основной группе животных (1 гр., n=4) в качестве носителя злокачественных клеток были использованы скаффолды размером 8мм×4 мм×2мм с диаметром пор 5 мм (рис. 2), созданные методом лазерного плавления входящих в состав титана (90%), алюминия (6%) и ванадия (4%) (Ti6Al4V). Развитая шероховатая поверхность пор скаффолда создает условия для закрепления и роста клеточных колоний, а его пористопроницаемая структура обеспечивает проникновение питательных веществ из внешней среды (рис. 3).

Клетки культуральной линии рака легкого A549 засекали в количестве  $3 \times 10^6$  на каждый скаффолд и инкубировали в питательной среде RPMI в течение 7 суток при 37°C, 98% влажности и 5% содержании CO<sub>2</sub>. Затем скаффолды, заселенные клетками, имплантировали животным-реципиентам под кожу правой передне-боковой поверхности тела (рис. 1б). Процедура подкожной имплантации скаффолда была проведена с применением анестезии комплексным анестетиком для животных Золетил 100 в сочетании с премедикацией препаратом ксилазин.

В качестве сравнения использовали результаты перевивки опухолевой культуры A549 с матригелем (100 мкл на животное) в двух группах мышей (2-я и 3-я гр., по n=5 в каждой) с разными дозировками клеточной суспензии. Животным 2-й группы осуществляли подкожную инокуляцию злокачественных клеток в максимальном для перевивки *in vivo* количестве ( $10 \times 10^6$ ) [21, 22], тогда как в 3-й группе для этого использовали 50% от максимальной дозы ( $5 \times 10^6$  клеток на мышь соответственно).

Затем в течение 55 суток отслеживали динамику роста опухолей в группах подопытных животных. Объемы ксенографтов рассчитывали по формуле Шрека для эллипсоида:  $V = a \times b \times c \times \pi / 6$ , где V — объем опухоли (мм<sup>3</sup>), а, b, c — максимальные диаметры эллипсоида в трех плоскостях (мм) [23]. По окончании эксперимента животных подвергли эвтаназии методом дислокации шейных позвонков и выделили опухоли. Фрагменты опухолевых макропрепаратов поместили в 10% формалин на 24 ч, после чего готовили парафиновые блоки. Полученные из них микропрепараты окрашивали гематоксилином-эозином и проводили гистологическое исследование при увеличении  $\times 200$ ,  $\times 400$ .

Статистический анализ результатов исследования выполнили с помощью программы STATISTICA 12.0 (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде выборочного среднего значения, стандартного отклонения.

### Результаты

Контроль динамики объемов полученных ксенографтов на этапах исследования показал различные темпы опухолевого роста у животных изучаемых групп (рис. 4, табл.).

Очевидно, что с 14-х суток после перевивки опухолевого материала и на последующих этапах замеров опухолевых узлов наибольшие значения их объемов наблюдались у мышей с имплантированными скаффолдами (1 гр.). На 48-е сутки эксперимента средний объем опухолей у

животных 3 гр. заметно превысил (почти в 2 раза) значения данного показателя, полученного во 2-й гр., а на 55 сутки со дня перевивки опухолевого материала это соотношение составило уже 2,6 раза. Таким образом, самый медленный рост ксенографтов и наименьшие их объемы на этапах эксперимента (начиная с 41 суток) были отмечены у животных 2 гр., получивших максимальную прививочную дозу опухолевых клеток A549 с матригелем. Среднегрупповые значения объемов опухолей на этапах наблюдения отражены в табл.

Выделенные после эвтаназии подопытных животных макропрепараты опухолей представ-

ляли собой плотные образования с выраженной васкуляризацией, без участков некроза (рис. 5а). В результате проведенного гистологического исследования микропрепараты, полученные из ксенографтов мышей всех трех изучаемых групп, были охарактеризованы как низкодифференцированная немелкоклеточная карцинома солидного строения (рис. 6), что соответствует паспортной характеристике использованной для прививки культуральной клеточной линии карциномы легкого человека A549. Отличительной характеристикой микрокартины опухолей, выросших на скаффолдах, являлась инвазия в жировую ткань.

**Таблица. Среднегрупповые значения объемов опухолей на этапах наблюдения**

Группы животных	Объем опухолей (мм <sup>3</sup> ) на этапах наблюдения (сутки после перевивки)				
	14 сут.	28 сут.	41 сут.	48 сут.	55 сут.
I (n=4)	91±17,35	250±51,32	586±60,25	961±83,16	1233±123,87
II (n=5)	45,88±4,86	44,91±5,11	95,95±16,89	168,43±43,03	237,19±57,91
III (n=5)	45,75±3,98	39,81±7,61	126,5±11,08	333,88±31,82	611,64±79,72



Рис. 1. Мыши линии Balb c/nude, использованные в исследовании: а) интактное животное; б) животное в процессе имплантации скаффолда, заселенного культурой клеток карциномы легкого A549

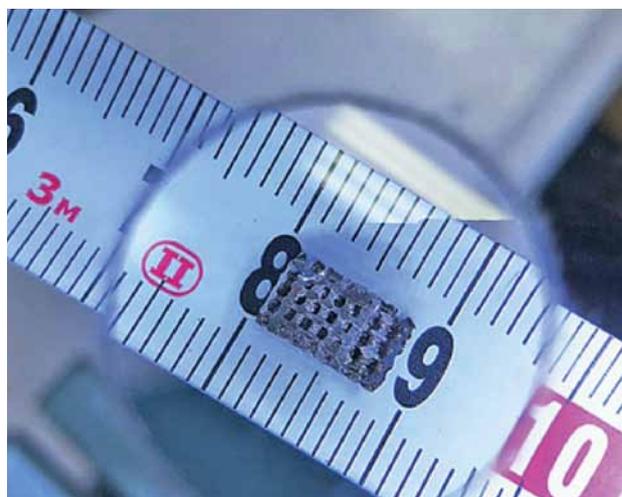
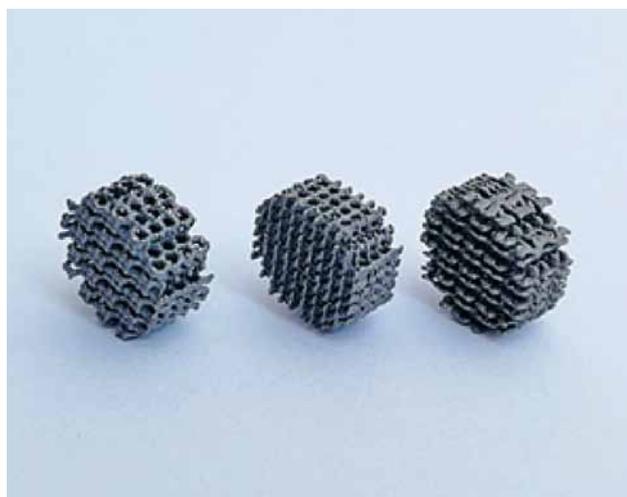


Рис. 2. Скаффолды, полученные методом лазерного плавления титана, алюминия и ванадия (Ti-6Al-4V): а) макроструктура; б) размеры

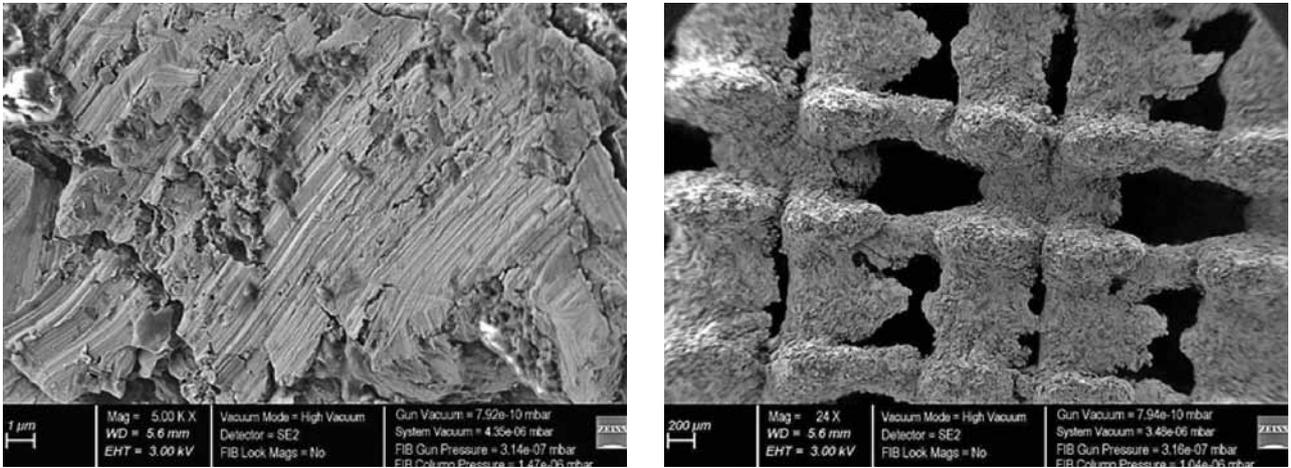


Рис. 3. Микроструктура пористого скаффолда (электронная микроскопия): а)  $\times 10000$ ; б)  $\times 500$

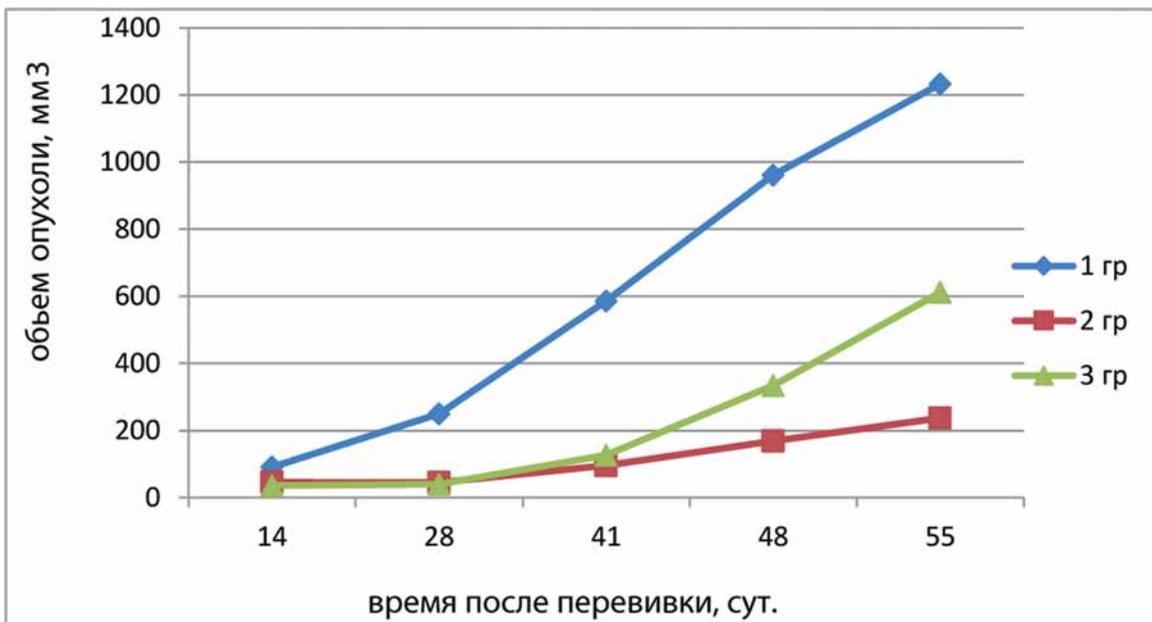


Рис. 4. Динамика роста ксенографтов в изучаемых группах животных (объемы опухолей на этапах эксперимента)



Рис. 5. Подкожный ксенографт рака легкого A549, выросший на титановом скаффолде: а — вид животного основной группы на 55-е сутки после имплантации скаффолда; б — макропрепарат опухоли

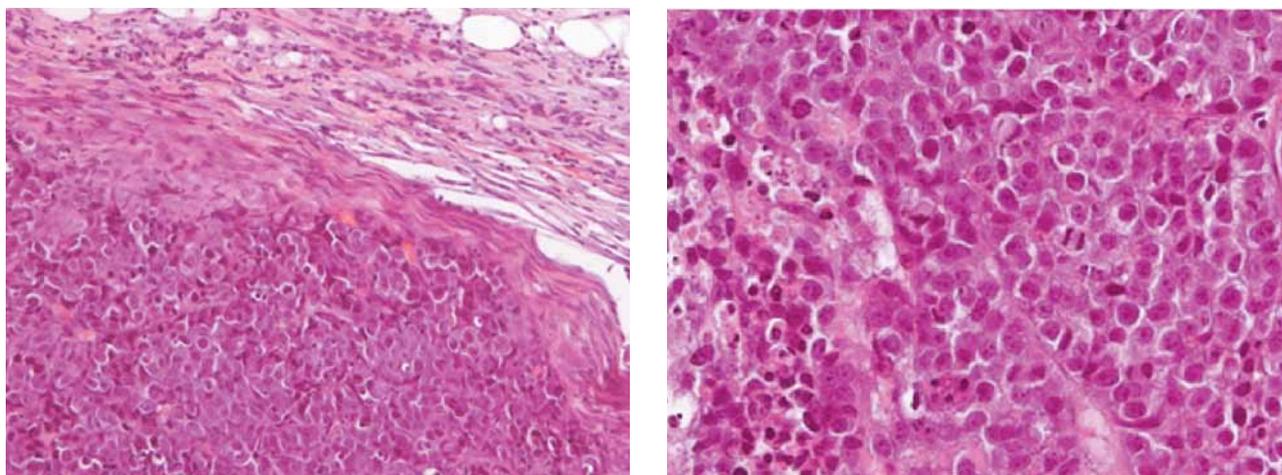


Рис. 6. Микропрепараты подкожных ксенографтов карциномы легкого A549, выросших на скаффолдах (окраска гематоксилином-эозином): а —  $\times 200$ ; б —  $\times 400$

### Обсуждение результатов

Получение животных опухолевых моделей с использованием злокачественных клеток человеческого происхождения является необходимым звеном в обеспечении платформы для экспериментальной онкологии. Разрабатываемые ксеногенные модели *in vivo* должны отвечать задачам конкретного исследования, обеспечивать решение поставленной проблемы. Помимо адекватного моделирования биологии ксеногенной опухоли, важными аспектами являются стабильность и скорость злокачественного роста, включая время выхода опухолевых узлов. Последнее обстоятельство имеет принципиальное значения в планировании сроков эксперимента, что связано с наличием животных необходимого возраста и веса, а также другими экономическими составляющими процесса научного исследования.

Результаты, полученные в ходе нашего исследования, продемонстрировали эффективность перевивки человеческих опухолевых культуральных клеток карциномы легкого на пористом металлическом носителе. Мы полагаем, что предварительная 7-дневная инкубация скаффолда со злокачественными клетками *ex vivo* способствовала сокращению латентного периода выхода опухоли после трансплантации опухолевого материала под кожу животных-доноров. Использование такого подхода к перевивке клеточного материала может позволить быстрее получать опухоли необходимого размера и сокращать сроки проведения исследований.

Помимо значительного уменьшения расхода культуральных злокачественных клеток для эффективной перевивки животным-реципиентам и получения хорошо растущей опухолевой модели, применение металлического пористого скаффолда позволяет обходиться без дорогостоящего, требующего определенных условий использова-

ния матригеля. В свою очередь, механическая прочность и возможность высокотемпературной стерилизации скаффолдов делают возможным их повторное использование, что также способствует снижению расходов на проведение исследований.

Кроме того оказалось, что при подкожной перевивке опухолевых клеток с матригелем в качестве носителя использование их в меньшем от рекомендованной дозы количестве позволяет получить лучший результат. Это выражалось в достижении к 55 дню эксперимента опухолями у животных 3-й группы больших (в 2,5 раза) размеров по сравнению со 2-й группой. Медленный рост ксенографтов во 2 группе животных может быть связан с высокой плотностью злокачественных клеток в ограниченном объеме матригеля [24], следствием которой являлось контактное ингибирование их роста и размножения.

### Заключение

Таким образом, использование металлических пористых скаффолдов, предварительно инкубированных с клетками культуры A549 в исходном количестве  $3 \times 10^6$  и имплантированных подкожно бестимусным мышам Balb c/nude, позволяет получать ксеногенную опухолевую модель, характеризующуюся быстрым экспоненциальным ростом и гистологически подтвержденным соответствием моделируемой опухоли. Применение максимальной прививочной дозы клеток A549 для перевивки с матригелем является нецелесообразным ввиду очевидного отставания роста опухолевых узлов от показателей в группах животных не только с трансплантацией опухолевого материала на скаффолдах, но и с инокуляцией клеток в меньшем на 50% количестве в сочетании с аналогичным носителем.

*Финансирование исследования. Работа выполнена за счет средств ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ. Скаффолды были предоставлены ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет» Министерства образования РФ.*

*Конфликт интересов. Авторы не имеют конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить.*

#### ЛИТЕРАТУРА

- Jung J., Seol H.S., Chang S. The Generation and Application of Patient-Derived Xenograft Model for Cancer Research. *Cancer Res Treat.* 2018;50(1):1-10. doi:10.4143/crt.2017.307.
- Кит О.И., Гончарова А.С., Ткачев С.Ю., Протасова Т.П. Методы моделирования увеальной меланомы. *Вопросы онкологии.* 2019; 65(4): 498-503 [Kit O.I., Goncharova A.S., Tkachev S.Yu., Protasova T.P. Methods of modeling uveal melanoma. *Questions of Oncology.* 2019; 65(4): 498-503 (In Russ.)].
- Spaw M., Anant S., Thomas S.M. Stromal contributions to the carcinogenic process. *Mol Carcinog.* 2017;56(4):1199-1213. doi:10.1002/mc.22583.
- Ravi M., Ramesh A., Pattabhi A. Contributions of 3D Cell Cultures for Cancer Research. *J Cell Physiol.* 2017;232(10):2679-2697. doi:10.1002/jcp.25664.
- Андронов Н.В., Морозова Л.Ф., Сураева Н.М. и др. Способность клеток беспигментной меланомы кожи человека линии mel ibr/braf+ и ее субклона к росту у иммунодефицитных мышей balb/c nude при подкожной имплантации. *Российский биотерапевтический журнал.* 2017; 16(2): 60-65 [Andronova N.V., Morozova L.F., Suraeva N.M. et al. The Ability of human skin cells of the Mel ibr/braf+ line and its subclone to grow in immunodeficient BALB/C nude mice during subcutaneous implantation. *Russian biotherapeutic journal.* 2017; 16(2): 60-65. doi: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-60-65 (In Russ.)].
- Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши balb/c nude и моделирование различных вариантов опухолевого роста для доклинических исследований. *Российский биотерапевтический журнал.* 2017; 16(2): 6-13 [Treshchalina E.M. Immunodeficiency mice balb/c nude and modeling of various variants of tumor growth for preclinical research. *Russian biotherapeutic journal.* 2017; 16(2): 6-13 (In Russ.)].
- Takai A., Fako V., Dang H. et al. Three-dimensional Organotypic Culture Models of Human Hepatocellular Carcinoma. *Sci Rep.* 2016;6:21174. doi:10.1038/srep21174.
- Fong E.L., Harrington D.A., Farach-Carson M.C., Yu H. Heralding a new paradigm in 3D tumor modeling. *Biomaterials.* 2016;108:197-213. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.08.052.
- Gomez-Roman N., Stevenson K., Gilmour L. et al. A novel 3D human glioblastoma cell culture system for modeling drug and radiation responses. *Neuro Oncol.* 2017;19(2):229-241. doi:10.1093/neuonc/now164.
- Рябая О.О., Прокофьева А.А., Хоченков Д.А. и др. Роль эпителиально-мезенхимального перехода и аутофагии в противоопухолевом ответе клеточных линий меланомы на таргетное ингибирование MEK и mTOR киназ. *Сибирский онкологический журнал.* 2019; 18(3): 54-63. [Ryabaya O.O., Prokofieva A.A., Khochenkov D.A. et al. The Role of epithelial-mesenchymal transition and autophagy in the antitumor response of melanoma cell lines to targeted inhibition of MEK and mTOR kinases. *Siberian cancer journal.* 2019; 18(3): 54-63. doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-3-54-63 (In Russ.)].
- Wang R.M., Johnson T.D., He J. et al. Humanized mouse model for assessing the human immune response to xenogeneic and allogeneic decellularized biomaterials. *Biomaterials.* 2017;129:98-110. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.03.016.
- Lü W.D., Sun R.F., Hu Y.R. et al. Photooxidatively crosslinked acellular tumor extracellular matrices as potential tumor engineering scaffolds. *Acta Biomater.* 2018;71:460-473. doi:10.1016/j.actbio.2018.03.020.
- Dalglish A.J., Parvizi M., Lopera-Higuita M. et al. Graft-specific immune tolerance is determined by residual antigenicity of xenogeneic extracellular matrix scaffolds. *Acta Biomater.* 2018;79:253-264. doi:10.1016/j.actbio.2018.08.016.
- Karuppaiah K., Sinha J. Scaffolds in the management of massive rotator cuff tears: current concepts and literature review. *EFORT Open Rev.* 2019;4(9):557-566. doi:10.1302/2058-5241.4.180040.
- Kuevda E.V., Gubareva E.A., Grigoriev T.E. et al. Application of recellularized non-woven materials from collagen-enriched polylactide for creation of tissue-engineered diaphragm constructs. *Sovremennye tehnologii v medicine. [Modern technologies in medicine].* 2019; 11(2): 35-43. <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.05>.
- Решетов И.В., Старцева О.И., Истранов А.Л. и др. Разработка трехмерного биосовместимого матрикса для задач реконструктивной хирургии. *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии.* 2018. (3): 9-23 [Reshetov I.V., Startseva O.I., Istranov A.L. et al. Development of a three-dimensional biocompatible matrix for reconstructive surgery tasks. *Annals of plastic, reconstructive and aesthetic surgery.* 2018. (3): 9-23 (In Russ.)].
- Андронов Н.В., Райхлин Н.Т., Трещалина Е.М. и др. Результаты изучения онкогенных потенциалов медицинских клеточных препаратов на иммунодефицитных мышцах. *Российский биотерапевтический журнал.* 2010; 9(2): 29-33 [Andronova N.V., Raichlin N.T., Treshchalina E.M. et al. Results of studying oncogenic potencies of medical cell preparations on immunodeficient mice. *Russian biotherapeutic journal.* 2010; 9(2): 29-33 (In Russ.)].
- Еманов А.А., Стогов М.В., Кузнецов В.П. и др. Оценка приживаемости и безопасности применения оссеоинтегрированных чрескожных имплантатов из разных сплавов. *Биомедицина.* 2017; (4): 77-82 [Emanov A.A., Stogov M.V., Kuznetsov V.P. et al. Evaluation of survival and safety of osseointegrated percutaneous implants from different alloys. *Biomedicina.* 2017; (4): 77-82 (In Russ.)].
- Большаков О.П. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. ВОЗ, 2000. Рекомендации комитетам по этике, проводящим экспертизу биомедицинских исследований. *Качественная клиническая практика.* 2002; 9: 1-15 [Bolshakov O.P. Didactic and ethical aspects of research on biomodels and

- laboratory animals. WHO, 2000. Recommendations to ethics committees that review biomedical research. Good clinical practice. 2002; 9: 1–15 (In Russ.).
20. Workman P, Aboagye E.O., Balkwill F. et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer*. 2010;102(11):1555-1577. doi:10.1038/sj.bjc.6605642.
  21. Михайлова Л.М., Меркулова И.Б., Ермакова Н.П. и др. Методические подходы к исследованию опухоленности клеточных линий и биопрепаратов на их основе при доклинической оценке безопасности. *Российский биотерапевтический журнал*. 2010;9(2):13-18 [Mikhailova L.M., Merkulova I.B., Ermakova N.P. et al. Methodological approaches to the study of tumorigenicity of cell lines and biologics based on them in preclinical safety assessment. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal — Russian biotherapeutic journal*. 2010;9(2):13-18 (In Russ.)].
  22. Jiang F, Yu Q., Chu Y. et al. MicroRNA-98-5p inhibits proliferation and metastasis in non-small cell lung cancer by targeting TGFBR1. *Int J Oncol*. 2019;54(1):128-138. doi:10.3892/ijo.2018.4610.
  23. Юркштович Т.Л., Кладиев А.А., Голуб Н.В. и др. Гидрогелевый противоопухолевый препарат. Патент № 2442686. Опубликовано: 20.02.2012. Бюл. № 5. [Yurkshtovich T. L., Kladiev A.A., Golub N.V. et al. Hydrogel antitumor drug. Patent No. 2442686. Published: 20.02.2012. Bull. No. 5 (Russ.)].
  24. Lee G.H., Han S-B., Lee J-H. et al. Cancer Mechanobiology: Microenvironmental Sensing and Metastasis. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, Just Accepted Manuscript. 14 Jan 2019. doi: 10.1021/acsbomaterials.8b01230.

*A.S. Goncharova<sup>1</sup>, T.P. Protasova<sup>1</sup>, E.A. Lukbanova<sup>1</sup>, V.G. Volovik<sup>1</sup>, M.V. Mindar<sup>1</sup>, D.V. Khodakova<sup>1</sup>, A.V. Volkova<sup>1</sup>, E.V. Zaikina<sup>1</sup>, S.V. Chapek<sup>2</sup>, N.S. Karnaukhov<sup>1</sup>, D.S. Potemkin<sup>1</sup>, N.G. Vasilchenko<sup>1</sup>, A.Yu. Maksimov<sup>1</sup>*

### **Development of method for creating tumor xenograft model with porous metal scaffold**

<sup>1</sup>National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don,

<sup>2</sup>Don State Technical University, Rostov-on-Don

Aim of the study — the development of a method for obtaining a tumor xenograft model by a subcutaneous transplantation of a porous metal scaffold populated with cultured human lung carcinoma cells.

Material and methods. The study included 14 athymic male Balb c/nude mice aged 8-90 weeks, weighing 20-24 g. All animals received injections with cultured human A549 lung carcinoma cells subcutaneously into the right anterolateral area of the back. In animals of the main group (gr.1, n=4), scaffolds with a pore diameter of 0.5 mm made of titanium-aluminum-vanadium alloy using an industrial 3D printer served as carriers of tumor cells. Scaffolds were seeded with 3 million A549 culture cells, and were implanted into the recipient animals after the 7-day incubation. Results were compared with the results of the tumor culture transplantation with Matrigel (100 mL) in two groups of animals with varying cell suspension dosages: the maximum vaccination dose for in vivo ( $10 \times 10^6$  cells per mouse, gr.2, n=5) and half the maximum dose ( $5 \times 10^6$  cells per mouse, gr.3, n=5). Then, the dynamics of tumor growth in the groups of experimental mice was monitored for 55 days: xenograft volumes were calculated using the Shrek's formula for an ellipsoid. At the end of the experiment, the animals were euthanized by cervical dislocation.

Results. Monitoring of the dynamics of xenograft volumes demonstrated the maximal values in mice with implanted scaffolds. The slowest xenograft growth was registered in animals with the maximum vaccination dose of tumor cells with Matrigel. Histological study showed that tumor material obtained from all animals corresponded to A549 lung carcinoma.

Conclusions. Porous metal scaffolds, previously incubated with A549 culture cells and implanted subcutaneously in athymic Balb c/nude mice, allows obtaining rapidly growing xenografts with histologically confirmed correspondence to the original tumor.

Key words: A549 cell culture; subcutaneous xenografts; athymic mice; tumor model; scaffolds; Matrigel