

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-19-27>

# Определение циркулирующей опухолевой ДНК сингенной модели меланомы B16-F10 в плазме мышей линии C57BL6

К. М. Коноплина, А. А. Мальченкова, Н. А. Калинина, М. В. Пинюгина, Е. Н. Кособокова, В. С. Косоруков  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия,  
115522 Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Ксения Михайловна Коноплина [konoplinakm@gmail.com](mailto:konoplinakm@gmail.com)

**Введение.** Циркулирующая в плазме крови опухолевая ДНК (цоДНК) является потенциальным маркером для мониторинга опухолевого процесса. Однако возможность использования мышиной сингенной подкожной модели меланомы для оценки уровня цоДНК остается неясной.

**Цель исследования** – оценка уровня детектируемой цоДНК в мышиной сингенной модели меланомы B16-F10 методом цифровой капельной полимеразной цепной реакции (цкПЦР).

**Материалы и методы.** Для количественного определения цоДНК из клеток B16-F10 в плазме крови был разработан и валидирован метод цкПЦР. Для получения экспериментальных опухолей мышам линии C57BL6 подкожно вводили суспензию клеток линии мышиной меланомы B16-F10. Через день, на 7-, 14- и 21-й дни после перевивки опухоли у мышей отбирали кровь из ретроорбитального синуса. Из плазмы крови выделяли циркулирующую ДНК. На 21-й день после перевивки опухоли животных выводили из эксперимента.

**Результаты.** Разработан и валидирован метод цкПЦР для детекции цоДНК в сингенной модели меланомы B16-F10 у мышей линии C57BL6. Аналитический сигнал линейен в диапазоне 0,5–32 копии/мкл, значение  $R^2$  составило 0,997. Эмпирический предел обнаружения цоДНК составил 1 копию/мкл в присутствии 5 нг геномной ДНК нормальной ткани. Значения коэффициента вариации состояли в диапазоне от 44,5 % (для 1 копии/мкл) до 16,6 % (16 копий/мкл). Циркулирующая опухолевая ДНК в сингенной модели меланомы B16-F10 у мышей линии C57BL6 достоверно детектируется на 21-й день после перевивки опухолевых клеток ( $p = 0,004$ ). Уровень цоДНК коррелирует с объемом опухоли ( $r = 0,95$ ,  $p = 0,05$ ) и уровнем циркулирующей ДНК ( $r = 1$ ,  $p = 0,0$ ).

**Заключение.** Мышиная сингенная подкожная модель меланомы B16-F10 может использоваться для мониторинга уровня цоДНК при исследовании новых подходов для лечения меланомы.

**Ключевые слова:** цифровая капельная полимеразная цепная реакция, мышиная модель меланомы, B16-F10, циркулирующая опухолевая ДНК

**Для цитирования:** Коноплина К. М., Мальченкова А. А., Калинина Н. А. и др. Определение циркулирующей опухолевой ДНК сингенной модели меланомы B16-F10 в плазме мышей линии C57BL6. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(1):19–27. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-19-27>

## Detection of circulating tumor DNA of B16-F10 melanoma syngenic model in C57BL6 mice plasma

Ksenia M. Konoplina, Anastasia A. Malchenkova, Nadezhda A. Kalinina, Marina V. Pinyugina, Ekaterina N. Kosobokova, Vyacheslav S. Kosorukov

N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia

**Contacts:** Ksenia Mikhailovna Konoplina [konoplinakm@gmail.com](mailto:konoplinakm@gmail.com)

**Background.** Plasma circulating tumor DNA (ctDNA) is a potential marker for tumor process monitoring. However, the feasibility of using mouse syngenic subcutaneous melanoma model to assess ctDNA levels remains unclear.

**Aim.** To evaluate the feasibility of ctDNA detection in mouse B16-F10 melanoma model using droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR).

**Materials and methods.** We developed and validated a ddPCR assay to quantify plasma ctDNA from B16-F10 cells. To form experimental tumors, C57BL6 mice were inoculated with B16-F10 cells. On the first, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup> days after

tumor inoculation blood was collected by retroorbital sinus puncture. ctDNA was extracted from blood plasma. On the 21<sup>st</sup> day after tumor inoculation mice were sacrificed.

**Results.** We validated a ddPCR assay to quantify plasma ctDNA in B16-F10 melanoma syngeneic model in C57Bl6 mice. The assay linear range was 0.5–32 copies/ul,  $R^2 = 0.997$ . The empirical limit of detection of ctDNA was 1 copy/ul in 5 ng normal tissue genomic DNA background. The coefficient of variation values ranged from 44.5 % (1 copy/ul) to 16.6 % (16 copies/ul). Plasma ctDNA was detected on 21<sup>st</sup> day after tumor inoculation in B16-F10 melanoma syngeneic subcutaneous model ( $p = 0.004$ ). ctDNA concentration positively correlated with tumor volume ( $\rho = 0.95$ ,  $p = 0.05$ ) and total circulating DNA concentration ( $\rho = 1$ ,  $p = 0.0$ ).

**Conclusion.** B16-F10 melanoma syngeneic subcutaneous model in C57Bl6 mice can be used to monitor cDNA in studies of new approaches for melanoma treatment.

**Keywords:** digital droplet polymerase chain reaction, mouse melanoma model, B16-F10, circulating tumor DNA

**For citation:** Konoplina K.M., Malchenkova A.A., Kalinina N.A. et al. Detection of circulating tumor DNA of B16-F10 melanoma syngenic model in C57Bl6 mice plasma. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2024;23(1):19–27. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-19-27>

## Введение

Циркулирующая опухолевая ДНК (цоДНК) как один из вариантов жидкостной биопсии имеет большой потенциал стать биомаркером для мониторинга динамики опухолевого процесса при меланоме. Результаты доклинических исследований [1] с участием пациентов, больных меланомой, показали, что с помощью цоДНК возможно прогнозировать выживаемость больных, обнаруживать минимальную остаточную болезнь и ранний рецидив, проводить мониторинг ответа и прогнозировать ответ на таргетную терапию и иммунотерапию, выявлять варианты, ассоциированные с резистентностью, подбирать лекарственную терапию.

Для изучения возможностей цоДНК как биомаркера используют различные животные экспериментальные модели. Так, с помощью сложных доклинических моделей опухолей с использованием кроликов [2, 3], PDX-мышей [4], ортотопических мышинных ксенографтов [5], генно-инженерных мышей [6] оценивали возможность применения указанных моделей для детекции и мониторинга цоДНК при определенном виде рака. При исследовании фундаментальных механизмов и кинетики выделения цоДНК в кровь широко используются ксенографтные мышинные модели опухолей [7–11].

Сингенные мышинные модели опухолей представляют собой опухоли, полученные из мышинных опухолевых клеток, перевитых подкожно либо ортотопически иммунокомпетентным мышам генетически идентичного штамма. Такие модели являются относительно простыми и недорогими и широко используются в доклинических исследованиях противоопухолевых препаратов и поиске биомаркеров в области иммунотерапии [12]. Однако возможность использования мышинной сингенной подкожной модели для оценки уровня цоДНК остается неясной.

Сингенная подкожная модель мышинной меланомы B16-F10 используется в доклинических исследо-

ваниях для изучения локального роста опухоли и развития спонтанных метастазов. Ранее для данной модели были выявлены соматические мутации, присутствующие только в опухолях и отсутствующие в нормальной ткани [13], в рамках разработки биоинформатического подхода для предсказания иммуногенных пептидов как компонентов потенциальных персонализированных противоопухолевых вакцин. С помощью выявленных мутаций были предсказаны и синтезированы соответствующие неоантигенные пептиды. Иммуногенность и противоопухолевый эффект вакцин на основе полученных пептидов оценивали на мышинной модели меланомы B16-F10. Показано, что неоантигенные пептидные вакцины в сочетании с адьювантом Poly (I:C) вызывают стимуляцию клеточного иммунного ответа, что, однако, не во всех случаях приводило к развитию противоопухолевого ответа [14]. Исследование иммуногенности отдельных неоантигенных пептидов обнаружило, что иммуногенность *in vivo* не коррелирует с рейтингом, полученным в результате биоинформатического анализа [15].

Циркулирующая опухолевая ДНК рассматривается как потенциальный биомаркер ответа на персонализированную противоопухолевую иммунотерапию [16]. Для оценки ответа на персонализированную иммунотерапию на основе как отдельных неоантигенных пептидов, так и их комбинаций в модели мышинной меланомы B16-F10 было необходимо оценить возможность использования данной мышинной модели для детекции и мониторинга уровней цоДНК.

**Цель исследования** – оценка уровня детектируемой цоДНК в мышинной сингенной модели меланомы B16-F10 методом цифровой капельной полимеразной цепной реакции (цкПЦР).

## Материалы и методы

**Клеточная культура.** Клеточную линию мышинной меланомы B16-F10 из биоресурсной коллекции

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России культивировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10 % фетальной телячьей сыворотки Nucleon (GE Healthcare, США) при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> до достижения 80 % монослоя. Перед экспериментом клеточную линию проверяли на контаминацию микоплазмой с помощью набора MycoReport («Евроген», Россия). Для введения мышам готовили суспензию с концентрацией 2 млн клеток в 1,0 мл среды 199 («ПанЭко», Россия) без добавок.

#### Получение подкожной модели меланомы B16-F10.

Опыты, проводимые на животных, выполнены в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, от 1986 г. Протоколы опытов утверждены на заседании локального этического комитета ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

В эксперименте использовали мышей линии C57Bl6 – самок возрастом 6–7 нед весом 20–26 г – из разведения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Животные содержались на стандартном гранулированном сухом корме. Животных разделили на две группы:

- 1-я группа (контроль) – мыши без опухоли, которым вводили подкожно в правый бок 0,5 мл среды 199 ( $n = 4$ );
- 2-я группа – мыши с подкожно перевитой меланомой B16-F10, которым вводили подкожно в правый бок 1 млн опухолевых клеток в 0,5 мл среды 199 ( $n = 10$ ).

После появления у животных пальпируемых опухолей проводили измерение размеров опухолей (длина, ширина, высота) с помощью калипера. Объем опухоли рассчитывали по следующей формуле [17]:

$$V = a \times b \times c \times \frac{\pi}{6},$$

где  $V$  – объем опухоли (мм<sup>3</sup>),  $a$  – длина опухоли (мм),  $b$  – ширина опухоли (мм),  $c$  – высота опухоли (мм).

На 21-й день после перевивки опухоли животных выводили из эксперимента, собирали образцы опухолевой ткани и нормальной ткани кожи (ухо). Полученные образцы ткани хранили при температуре –80 °С до выделения геномной ДНК (гДНК).

**Получение крови и выделение плазмы.** Забор крови осуществляли из ретроорбитального синуса через день, на 7-, 14- и 21-й дни после перевивки опухоли с помощью пастеровской пипетки, обработанной этилендиаминтетрауксусной кислотой – ЭДТА (0,5 М, рН 8,55) в физиологическом растворе («ПанЭко», Россия). Кровь помещали в пробирки, содержащие 8 мкл 0,5 М ЭДТА, инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин и центрифугировали

при 1700 g в течение 15 мин. Из полученной плазмы сразу выделяли циркулирующую ДНК (цДНК).

**Выделение ДНК.** Из образцов плазмы выделяли цДНК с помощью набора PME free-circulating DNA Kit (Analytik Jena, Германия). Из биоматериала опухоли и нормальной ткани выделяли геномную ДНК с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Германия). Непосредственно после выделения определяли концентрацию цДНК и гДНК с помощью флуориметра Qubit 4.0 и набора Qubit™ dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Качество выделенной ДНК определяли с помощью нанофотометра NP 80 (Implen, Германия) по соотношению оптического поглощения на длинах волн 260/280 и 260/230. Образцы выделенной ДНК хранили при температуре –20 °С.

#### Цифровая капельная полимеразная цепная реакция.

Для детекции цДНК использовали набор праймеров и TaqMan-зондов, специфичных для варианта chr7:109894747T>G в гене *Dennd5a* (замена p.D1250A), ранее выявленного в качестве соматической мутации, возникающей в сингенной модели мышинной меланомы B16-F10 [13] и подтвержденной методом прямого секвенирования по Сэнгеру. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов: прямой праймер 5'-TCAGAGGTCAGATGTCAATG-3', обратный праймер 5'-GCCTGTGTCTTTCTTTTCCC-3', TaqMan-зонд на референсную последовательность 5'-HEX-ACATGTATGAGGACGTGGCGCTG-BHQ1-3', TaqMan-зонд на мутантную последовательность 5'-FAM-ACATGTATGAGGCCGTGGCGCTG-BHQ1-3'.

Цифровую капельную ПЦР проводили на платформе QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad, США). Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 1x смесь ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) (Bio-Rad, США), 0,8 мкМ смеси праймеров, 0,4 мкМ каждого TaqMan-зонда и 1–8,3 мкл геномной или цДНК либо смеси геномной и плазмидной ДНК.

**Подбор условий амплификации цифровой капельной полимеразной цепной реакции.** Для подбора оптимальной температуры отжига праймеров и TaqMan-зондов проводили цкПЦР с гДНК опухолевого материала и нормальной ткани (кожи) в температурном градиенте при условиях амплификации: 95 °С, 10 мин; 40 циклов при 94 °С, 30 с – градиент 52 °С – 62 °С, 1 мин; 98 °С, 10 мин.

**Оценка параметров цифровой капельной полимеразной цепной реакции.** Анализ линейности аналитического сигнала, эмпирическое определение чувствительности (предела обнаружения), оценку точности (повторяемости, промежуточной прецизионности) проводили с помощью серии разведений плазмиды, содержащей последовательность гена *Dennd5a* с мутацией, на фоне 5 нг гДНК нормальной мышинной ткани.

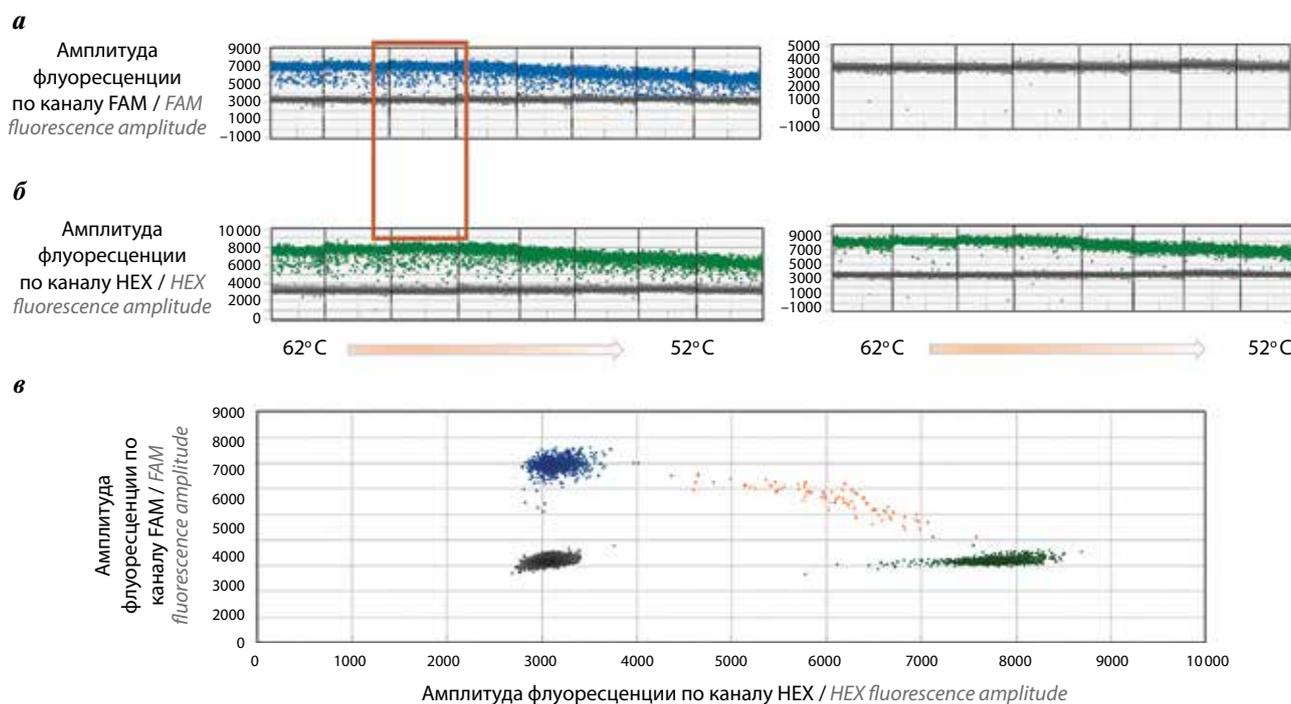
**Количественное определение циркулирующей опухолевой ДНК.** При количественном определении цоДНК в экспериментальных образцах использовали контроли: без матрицы (вода без нуклеаз), положительный (смесь плазмиды с мутацией и гДНК нормальной ткани), отрицательный (геномная ДНК нормальной ткани). Анализ полученных капель проводили с помощью программного обеспечения QuantaSoft версии 1.7.4 (Bio-Rad, США). Количество копий цДНК с мутацией, суммарно содержащееся в элюате, нормировали на объем плазмы, из которого была выделена цДНК.

**Статистический анализ.** Статистический анализ проводили с помощью программы Microsoft Excel и языка Python. Данные со смещенным и нормальным распределением представлены в виде медианы  $\pm$  межквартильный размах и среднего  $\pm$  стандартное отклонение соответственно. Для анализа различий между медианными значениями уровней мутантной цДНК в контрольной и экспериментальной группах использовали критерий Манна–Уитни ( $\alpha = 0,05$ ).

Для анализа корреляции объема опухоли и количества цоДНК, количества общей цДНК и цоДНК использовали критерий Спирмена.

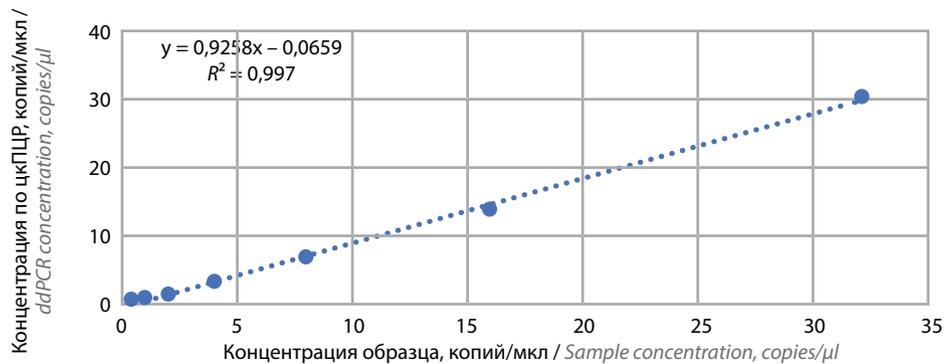
## Результаты и обсуждение

**Метод цифровой капельной полимеразной цепной реакции для количественного определения циркулирующей опухолевой ДНК.** При разработке метода цкПЦР для количественного определения цоДНК использовали набор праймеров и TaqMan-зондов, специфичных для варианта chr7:109894747T>G в гене *Dennd5a* (замена p.D1250A), ранее выявленного в качестве соматической мутации, возникающей в сингенной модели мышинной меланомы B16-F10 [13]. Подбор оптимальной температуры отжига осуществляли с помощью температурного градиента. Температура отжига, при которой наблюдалось максимальное расстояние между кластерами капель при наименьшем количестве неспецифичных капель, составила 60,1 °C (рис. 1) и использовалась в последующих экспериментах.



**Рис. 1.** Подбор оптимальной температуры отжига праймеров и Taq-зондов: а, б — одномерные графики амплитуд флуоресценции капель, содержащих геномную ДНК опухолевой и нормальной мышинной ткани соответственно при различных температурах отжига; при температуре 60,1 °C (выделено оранжевым цветом) расстояние между кластерами капель было максимальным, количество неспецифичных капель — минимальным для образцов геномной ДНК опухолевой и нормальной ткани; в — двухмерный график амплитуд флуоресценции капель, содержащих геномную ДНК опухолевой мышинной ткани, при температуре отжига 60,1 °C. Цветовое обозначение капель: серые — не содержат ДНК-матрицу; синие — содержат только ДНК-матрицу с мутацией (FAM); зеленые — содержат только ДНК-матрицу дикого типа (HEX); оранжевые — содержат ДНК-матрицы и с мутацией, и дикого типа

**Fig. 1.** Optimizing primers and TaqMan probes annealing temperature: а, б — 1-D fluorescence amplitude plots of droplets containing genomic DNA from mouse tumor tissue and mouse normal tissue, respectively, at different annealing temperatures; at a temperature of 60.1 °C (highlighted in orange), the distance between droplet clusters was maximum, and the number of nonspecific droplets was minimum for genomic DNA samples of tumor and normal tissue; в — 2-D fluorescence amplitude plot of droplets containing genomic DNA of tumor mouse tissue at an annealing temperature of 60.1 °C. Droplets color designation: gray — double-negative droplets containing no targeted DNA templates; blue — droplets containing only mutant DNA template (FAM); green — droplets containing only wild-type DNA template (HEX); orange — double-positive droplets containing both wild-type and mutant DNA templates



**Рис. 2.** Линейность аналитического сигнала. По оси абсцисс – расчетные значения концентраций (копии/мкл) по цифровой капельной полимеразной цепной реакции (цкПЦР), по оси ординат – средние экспериментальные значения концентраций (не менее трех повторов)

**Fig. 2.** Linearity of the analytical signal. Theoretical concentration values (copies/μl) are on the abscissa axis, mean digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR) concentration values (minimum three replications) are on the ordinate axis

Для определения линейности аналитического сигнала проводили регрессионный анализ с помощью программного пакета Microsoft Excel. Аналитический сигнал линеен в диапазоне 0,5–32 копии/мкл, значение  $R^2$  составило 0,997 (рис. 2). Значение линейности  $R^2 > 0,99$  соответствует требованию стандарта ISO 20395:2019 (E).

Предел обнаружения цДНК определяли эмпирически относительно верхней планки погрешности отрицательного контроля (гДНК нормальной ткани). Предел обнаружения составил 1 копию/мкл в присутствии 5 нг гДНК нормальной ткани (рис. 3).

Для оценки промежуточной прецизионности метода рассчитывали коэффициенты вариации (см. таблицу). Значения коэффициента вариации состояли в диапазоне от 44,5 % (для 1 копии/мкл) до 16,6 % (16 копий/мкл).

Разработанный и валидированный метод цкПЦР позволяет достоверно определять абсолютное количество копий ДНК с соматической мутацией в гене *Dennd5a*, возникающей в сингенной подкожной модели мышинной меланомы V16-F10, с точностью до 1 копии в 1 мкл реакционной смеси.

**Определение уровня циркулирующей опухолевой ДНК в плазме.** В сингенной модели меланомы V16-F10 у мышей линии C57Bl6 цДНК достоверно детектируется на 21-й день после перевивки опухолевых клеток по сравнению с контролем ( $p = 0,004$ ; рис. 4).

Уровень цДНК в экспериментальной группе незначимо отличается от такового в контрольной группе на протяжении 21 дня роста опухоли (для 21 дня  $p = 0,07$ ; рис. 5).

Уровень цДНК положительно коррелирует с объемом опухоли (рис. 6) и уровнем общей цДНК (рис. 7).

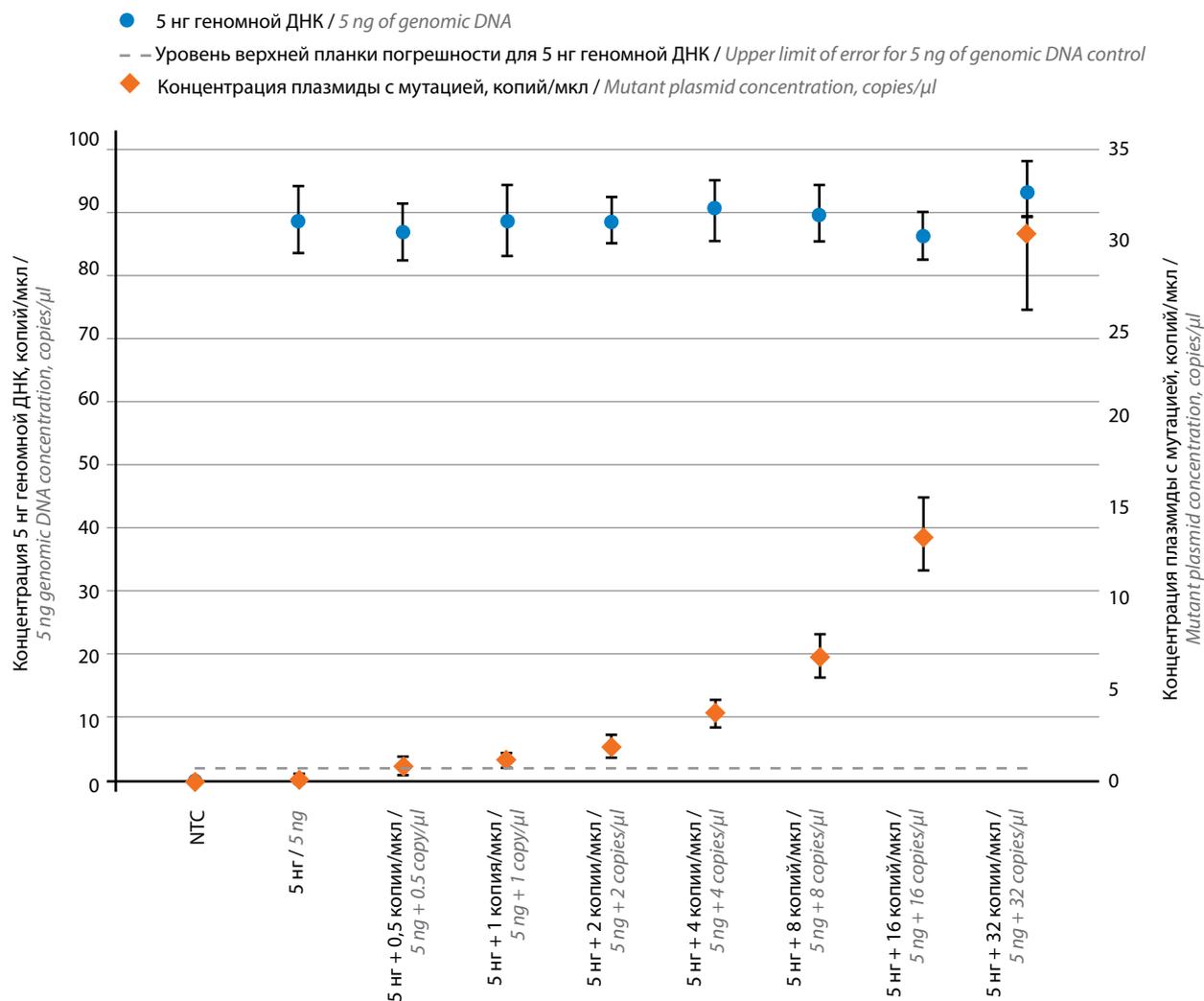
Клеточная линия мышинной меланомы V16-F10 имеет наименьшее время удвоения среди линий

клеток V16 [18] и наибольший метастатический потенциал [19]. Сингенная подкожная модель мышинной меланомы на основе клеточной линии V16-F10 широко используется для изучения метастазирования и образования опухолей.

Ранее было показано, что в мышинной подкожной модели меланомы V16-F10 циркулирующие опухолевые клетки детектируются на 4-е сутки после подкожной перевивки опухолевых клеток [20]. Полученные нами результаты показали, что цДНК достоверно детектировалась на 21-е сутки после перевивки опухолевых клеток. Отсутствие детектируемых уровней цДНК на ранних этапах роста опухоли может быть обусловлено разными причинами.

Так, уровень неопухолевой цДНК достоверно не отличался от такового в контрольной группе на протяжении 21 дня эксперимента (см. рис. 5). На мышинной ксенографтной модели рака легкого было показано, что точность определения мутантного варианта в цДНК зависит от концентрации общей цДНК [10]. При низких значениях общей цДНК более вероятно получить ложный отрицательный результат. Возможно, мы наблюдали низкие значения неопухолевой цДНК, поскольку образцы полученной цДНК были контаминированы гДНК, не отделенной по причине одного этапа центрифугирования во время пробоподготовки [21]. Помимо того, на уровень детектируемой цДНК мог повлиять тип используемых опухолевых клеток. I. Labga и соавт. [11] на мышинной ксенографтной модели гепатоцеллюлярной карциномы показали, что выброс цДНК в кровоток отличается для различных клеточных линий. На момент написания статьи авторам не известны литературные данные о способности различных типов клеток V16 высвобождать цДНК.

Механизмы выделения цДНК в кровоток до конца не изучены, и существующие в настоящее



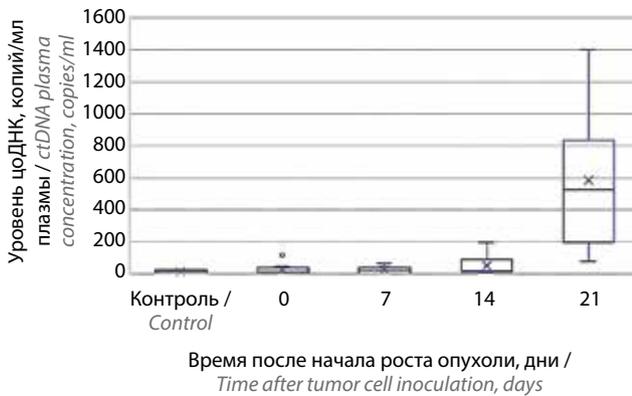
**Рис. 3.** Эмпирическое определение предела обнаружения с помощью серии разведений плазмиды, содержащей мутантный вариант, на фоне 5 нг геномной ДНК нормальной ткани. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение (не менее двух повторов)

**Fig. 3.** Empirical determination of limit of detection using serial dilutions of a plasmid with mutation variant in *Dennd5a* gene in 5 ng normal tissue genomic DNA. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (minimum two replications)

Промежуточная прецизионность метода цифровой капельной полимеразной цепной реакции для обнаружения циркулирующей опухолевой ДНК меланомы B16-F10

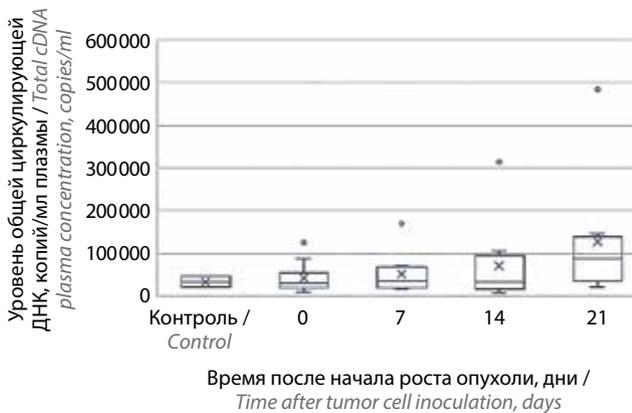
Between-run precision of droplet digital polymerase chain reaction assay for B16-F10 melanoma circulating tumor DNA detection

Образец Sample	Среднее значение, копий/мкл Mean value, copies/ $\mu$ l	Коэффициент вариации, % Coefficient of variation, %
5 нг + 1 копия/мкл 5 ng + 1 copy/ $\mu$ l	1,0	44,5
5 нг + 2 копии/мкл 5 ng + 2 copies/ $\mu$ l	1,9	38,0
5 нг + 4 копии/мкл 5 ng + 4 copies/ $\mu$ l	3,5	25,9
5 нг + 8 копий/мкл 5 ng + 8 copies/ $\mu$ l	6,9	16,1
5 нг + 16 копий/мкл 5 ng + 16 copies/ $\mu$ l	13,4	16,6



**Рис. 4.** Уровни циркулирующей опухолевой ДНК (цОДНК) в плазме крови мышей

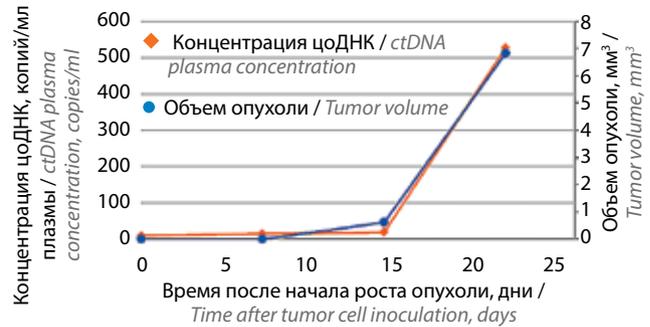
**Fig. 4.** Mice blood plasma circulating tumor DNA (ctDNA) levels



**Рис. 5.** Уровни общей циркулирующей ДНК в плазме крови мышей

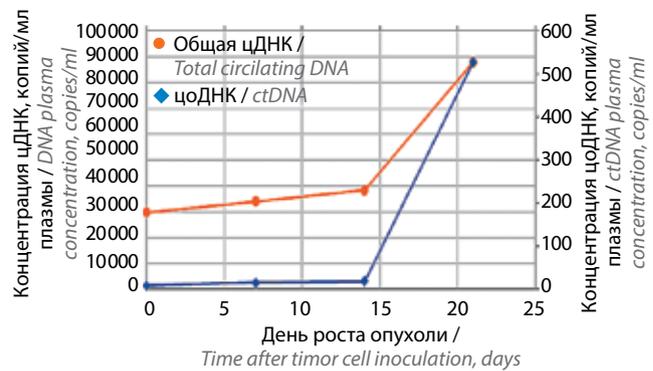
**Fig. 5.** Mice blood plasma total circulating DNA levels

время технические подходы не обладают достаточной чувствительностью и специфичностью для обнаружения цОДНК на ранних стадиях развития опухоли [22]. Тем не менее полученные нами результаты показали возможность достоверного определения уровня цОДНК в мышинной подкожной модели меланомы В16-F10. При корректировке протокола выделения цДНК из крови возможна детекция цОДНК на более ранних стадиях.



**Рис. 6.** Корреляция уровня цОДНК и объема опухоли ( $\rho = 0,95, p = 0,05$ ). Данные представлены в виде медианных значений (не менее двух повторов)

**Fig. 6.** Circulating tumor DNA and tumor volume correlation ( $\rho = 0,95, p = 0,05$ ). Data are presented as median values (minimum two replicates)



**Рис. 7.** Корреляция уровня цОДНК и общей цДНК ( $\rho = 1, p = 0,0$ ). Данные представлены в виде медианных значений (не менее двух повторов)

**Fig. 7.** Circulating tumor DNA and total circulating DNA correlation ( $\rho = 1, p = 0,0$ ). Data are presented as median values (minimum two replicates)

### Заключение

Разработанный метод цкПЦР позволяет выявлять цОДНК у мышей линии С57В16 с моделью сингенной подкожной меланомы В16-F10 и может использоваться для мониторинга уровня цОДНК при изучении динамики роста опухоли на фоне таргетной и иммунотерапии, детекции рецидивов и остаточной опухоли.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tivey A., Britton F., Scott J.-A. et al. Circulating tumour DNA in melanoma – clinic ready? *Curr Oncol Rep* 2022;24(3):363–73. DOI: 10.1007/s11912-021-01151-6
2. Bustamante P., Tsering T., Coblentz J. et al. Circulating tumor DNA tracking through driver mutations as a liquid biopsy-based biomarker for uveal melanoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2021;40(1):196. DOI: 10.1186/s13046-021-01984-w
3. Muhanna N., Eu D., Chan H.H.L. et al. Cell-free DNA and circulating tumor cell kinetics in a pre-clinical head and neck cancer model undergoing radiation therapy. *BMC Cancer* 2021;21(1):1075. DOI: 10.1186/s12885-021-08791-8
4. Ruhen O., Lak N.S.M., Stutterheim J. et al. Molecular characterization of circulating tumor DNA in pediatric

- rhhabdomyosarcoma: A feasibility study. *JCO Precis Oncol* 2022;6:e2100534. DOI: 10.1200/PO.21.00534
5. Eun Y.-G., Yoon Y.J., Won K.Y., Lee Y.C. Circulating tumor DNA in saliva in an orthotopic head and neck cancer mouse model. *Anticancer Res* 2020;40(1):191–9. DOI: 10.21873/anticancer.13940
  6. Rakhit C.P., Trigg R.M., Le Quesne J. et al. Early detection of pre-malignant lesions in a KRAS<sup>G12D</sup>-driven mouse lung cancer model by monitoring circulating free DNA. *Dis Model Mech* 2019;12(2):dmm036863. DOI: 10.1242/dmm.036863
  7. Thierry A.R., Mouliere F., Gongora C. et al. Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Res* 2010;38(18):6159–75. DOI: 10.1093/nar/gkq421
  8. Terasawa H., Kinugasa H., Nouse K. et al. Circulating tumor DNA dynamics analysis in a xenograft mouse model with esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2021;27(41):7134–43. DOI: 10.3748/wjg.v27.i41.7134
  9. Gasparello J., Allegretti M., Tremante E. et al. Liquid biopsy in mice bearing colorectal carcinoma xenografts: Gateways regulating the levels of circulating tumor DNA (ctDNA) and miRNA (ctmiRNA). *J Exp Clin Cancer Res* 2018;37(1):124. DOI: 10.1186/s13046-018-0788-1
  10. Wei L., Xie L., Wang X. et al. Circulating tumor DNA measurement provides reliable mutation detection in mice with human lung cancer xenografts. *Lab Invest* 2018;98(7):935–46. DOI: 10.1038/s41374-018-0041-8
  11. Labгаа I., von Felden J., Craig A.J. et al. Experimental models of liquid biopsy in hepatocellular carcinoma reveal clone-dependent release of circulating tumor DNA. *Hepatology* 2021;5(6):1095–105. DOI: 10.1002/hep4.1692
  12. Olson B., Li Y., Lin Y. et al. Mouse models for cancer immunotherapy research. *Cancer Discov* 2018;8(11):1358–65. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-0044
  13. Косоруков В.С., Барышникова М.А., Кособокова Е.Н. и др. Выявление иммуногенных мутантных неоантигенов в геноме меланомы мышей. *Российский биотерапевтический журнал* 2019;18(3):23–30. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-23-30  
Kosorukov V.S., Baryshnikova M.A., Kosobokova E.N. et al. Identification of immunogenic mutant neoantigens in the genome of murine melanoma. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2019;18(3):23–30. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-23-30
  14. Барышникова М.А., Рудакова А.А., Соколова З.А. и др. Оценка противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов для создания модели противомеланомной вакцины. *Российский биотерапевтический журнал* 2019;18(4):76–81. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-76-81  
Baryshnikova M.A., Rudakova A.A., Sokolova Z.A. et al. Evaluation of the antitumor efficacy of synthetic neoantigen peptides for the melanoma vaccine model *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2019;18(4):76–81. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-76-81
  15. Рудакова А.А., Барышникова М.А., Соколова З.А. и др. Оценка иммуногенности синтетических неоантигенных пептидов для модели противомеланомной вакцины. *Российский биотерапевтический журнал* 2021;20(2):61–8. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-61-68  
Rudakova A.A., Baryshnikova M.A., Sokolova Z.A. et al. Evaluation of immunogenicity of synthetic neoantigen peptides for the melanoma vaccine model. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2021;20(2):61–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-61-68
  16. Stadler J.-C., Belloum Y., Deitert B. et al. Current and future clinical applications of ctDNA in immuno-oncology. *Cancer Res* 2022;82(3):349–58. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-21-1718
  17. Tomayko M.M., Reynolds C.P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989;24(3):148–54. DOI: 10.1007/BF00300234
  18. Danciu C., Falamas A., Dehelean C. et al. A characterization of four B16 murine melanoma cell sublines molecular fingerprint and proliferation behavior. *Cancer Cell Int* 2013;13:75. DOI: 10.1186/1475-2867-13-75
  19. Nicolson G.L., Brunson K.W., Fidler I.J. Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. *Cancer Res* 1978;38(11 Pt 2):4105–11. PMID: 359132
  20. Nedosekin D.A., Sarimollaoglu M., Ye J.-H. et al. *In vivo* ultrafast photoacoustic flow cytometry of circulating human melanoma cells using near-infrared high-pulse rate lasers. *Cytometry A* 2011;79(10):825–33. DOI: 10.1002/cyto.a.21102
  21. Herrera L.J., Raja S., Gooding W.E. et al. Quantitative analysis of circulating plasma DNA as a tumor marker in thoracic malignancies. *Clin Chem* 2005;51(1):113–8. DOI: 10.1373/clinchem.2004.039263
  22. Sánchez-Herrero E., Serna-Blasco R., Robado de Lope L. et al. Circulating tumor DNA as a cancer biomarker: An overview of biological features and factors that may impact on ctDNA analysis. *Front Oncol* 2022;12:943253. DOI: 10.3389/fonc.2022.943253

#### Вклад авторов

К.М. Коноплина: разработка дизайна исследования, получение, обработка, анализ и интерпретация данных, написание и редактирование текста рукописи;

А.А. Мальченкова: предоставление материалов исследования, получение, обработка, анализ и интерпретация данных, написание текста рукописи;

Н.А. Калинина, М.В. Пинюгина: предоставление материалов исследования, редактирование текста рукописи;

Е.Н. Кособокова: разработка концепции и дизайна исследования, написание и редактирование текста рукописи;

В.С. Косоруков: разработка концепции и дизайна исследования, редактирование текста рукописи.

#### Authors contributions

K.M. Konoplina: study design development, acquisition, processing, analysis and interpretation of data, original draft preparation and editing;

A.A. Malchenkova: research materials provision, acquisition, processing, analysis and interpretation of data, original draft preparation;

N.A. Kalinina, M.V. Pinyugina: research materials provision, editing of manuscript;

E.N. Kosobokova: study concept and design development, review and editing;

V.S. Kosorukov: study concept and design development, editing of manuscript.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

К.М. Коноплина / K.M. Konoplina: <https://orcid.org/0000-0003-0130-2628>

А.А. Мальченкова / A.A. Malchenkova: <https://orcid.org/0000-0003-2201-0472>

Н.А. Калинина / N.A. Kalinina: <https://orcid.org/0000-0002-3024-8918>

М.В. Пинюгина / M.V. Pinyugina: <https://orcid.org/0000-0003-0318-3896>

Е.Н. Кособокова / E.N. Kosobokova: <https://orcid.org/0000-0002-4660-8519>

В.С. Косоруков / V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflicts of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках научно-исследовательской работы № 075-15-2021-1060 «Создание и развитие биоресурсной коллекции генетически и фенотипически охарактеризованных клеточных линий и первичных опухолей человека», а также при поддержке НИР № 1022040600453-9-3.2.21;3.4.2.

**Funding.** The work was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of research work No 075-15-2021-1060 “Creation and development of a bioresource collection of genetically and phenotypically characterized human cell lines and primary tumors” and also this research was funded by the grant No 1022040600453-9-3.2.21;3.4.2.

**Соблюдение правил биоэтики.** Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Протоколы опытов были утверждены на заседании локального этического комитета НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

**Statement of the welfare of animals.** The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Research and Other Scientific Purposes. The protocols of the experiments were approved at a meeting of the local ethical committee of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology.

Статья поступила: 25.10.2023. Принята в печать: 28.01.2024.

Article received: 25.10.2023. Accepted for publication: 28.01.2024.