

Особенности роста меланомы B16 у мышей C57BL/6 при использовании различных методов получения опухолевого материала и мест трансплантации сингенной опухоли

Я.Г. Муразов, Я.В. Агацарская, К.Л. Крышень

АО «Научно-производственное объединение «Дом фармации»; Россия, 188663 Ленинградская обл., Всеволожский район, г. п. Кузьмоловский, ул. Заводская, 3

Контакты: Ярослав Геннадьевич Муразов yaroslav84@yandex.ru

Введение. В неклинических исследованиях противоопухолевых средств использование различных источников получения опухолевого материала и мест трансплантации существенно влияет на параметры роста сингенных опухолей, на их инвазивный потенциал и профиль метастазирования.

Цель исследования – оценить кинетику роста сингенной меланомы B16 у мышей C57BL/6 при ортотопической (внутрикожной) и интрамаммарной (в жировую клетчатку молочной железы) трансплантации опухолевого материала, полученного разными методами.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на половозрелых мышах-самках линии C57BL/6. Сформировано 6 групп по 8 животных в каждой. Группам 1–3 трансплантировали опухолевый материал меланомы B16 в виде изографтов (50 % суспензия клеток из фрагмента опухоли), группам 4–6 – опухолевые клетки из первичной культуры, культивированные *in vitro* до раннего (P6) и позднего (P14) пассажей. Перевивку осуществляли внутрикожно или интрамаммарно.

Результаты. Установлено, что метод получения опухолевого материала (изографт или клеточная линия), число пассажей *in vitro* и сайт трансплантации (внутрикожно или интрамаммарно) значимо влияют на фенотипические особенности меланомы B16 после перевивки животным. В результате клональной селекции *in vitro* и *in vivo* наблюдали существенные различия во времени появления измеряемых опухолей, кинетике роста и профиле метастазирования. Интрамаммарная трансплантация опухолей обеспечивала снижение частоты возникновения язв (некрозов опухоли) по сравнению с внутрикожной перевивкой вне зависимости от источника опухолевого материала. В то же время развитие изъязвления опухолей значимо не влияло на продолжительность жизни животных.

Заключение. Результаты проведенного исследования дополняют имеющиеся сведения о том, что клетки сингенной меланомы B16 обладают как наследственными, так и селекционными фенотипическими признаками, которые влияют на их способность к метастазированию. Полученные данные могут быть использованы в рутинной работе центров доклинических исследований при планировании и проведении экспериментальных работ с использованием сингенных моделей опухолей.

Ключевые слова: сингенная опухоль, меланома B16, кинетика роста, метастазирование

Для цитирования: Муразов Я.Г., Агацарская Я.В., Крышень К.Л. Особенности роста меланомы B16 у мышей C57BL/6 при использовании различных методов получения опухолевого материала и мест трансплантации сингенной опухоли. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(1):28–36. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-28-36>

B16 melanoma growth characteristic in C57BL/6 mice with various methods of obtaining tumor material and syngeneic tumor transplantation sites

Iaroslav G. Murazov, Iana V. Agatsarskaya, Kirill L. Kryshen

RMC “Home of Pharmacy”, 3 Zavodskaya st., Kuzmolovsky settl., Vsevolozhsk district, Leningrad region, 188663, Russia

Contacts: Iaroslav Gennadievich Murazov murazov.yg@doclinika.ru

Background. In non-clinical studies of antitumor agents, the use of various sources of tumor material and transplant sites significantly affects the growth parameters of syngeneic tumors, their invasive potential, and the profile of metastasis.

Aim. To evaluate the growth kinetics of syngeneic melanoma B16 in C57BL/6 mice after orthotopic (intradermally) and intramammary (into the mammary fat pad) transplantation of tumor material obtained by different methods.

Materials and methods. The experiment was carried out on mature C57BL/6 female mice. There were six groups with eight animals each. Groups 1–3 were transplanted with isografts of melanoma B16 (50 % cell suspension from tumor fragments), groups 4–6 were inoculated with cancer cells from primary culture, cultured *in vitro* to the early (P6) and late (P14) passages. Inoculation was performed intradermally or into the mammary fat pad.

Results. It was found that the method of obtaining tumor material (isograft or cell line), the number of *in vitro* passages and the site of transplantation (intradermally or intramammary) significantly affects the phenotypic features of melanoma B16 after inoculation with animals. As a result of clonal selection *in vitro* and *in vivo*, significant differences were observed in the time of appearance of the measured tumors, growth kinetics and metastasis profile. Intramammary tumor transplantation provided a reduction in the incidence of ulcers (tumor necrosis) compared with intradermal transplantation, regardless of the source of tumor material. At the same time, the development of tumor ulceration did not significantly affect the life span of animals.

Conclusion. The results of the study complement the existing data that B16 syngeneic melanoma cells have both hereditary and selective phenotypic characteristics that affect their ability to metastasize. Our data can be used in the routine work of preclinical centers for the purpose of planning and conducting studies using syngeneic tumor models.

Keywords: syngeneic tumor, B16 melanoma, growth kinetics, metastasis

For citation: Murazov Ia.G., Agatsarskaya Ia.V., Kryshen K.L. B16 melanoma growth characteristic in C57BL/6 mice with various methods of obtaining tumor material and syngeneic tumor transplantation sites. Rossiyskiy biotерапевтический журнал = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(1):28–36 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-28-36>

Введение

Внедрение в клиническую практику ингибиторов контрольных точек иммунитета (иИКТ: анти-PD-1/PD-L1, анти-CTLA-4) для лечения меланомы обеспечило значительное увеличение показателей ответа опухоли и выживаемости пациентов, в том числе с метастатической формой заболевания [1]. В то время как использование ксенотрансплантатов у иммунодефицитных животных является основным подходом в неклинических исследованиях противоопухолевых агентов, развитие иммунотерапии рака вернуло в центр внимания сингенные модели опухолей у иммунокомпетентных животных с интактной иммунной системой [2].

Цель исследования — оценить кинетику роста сингенной меланомы B16 у мышей C57BL/6 при ортотопической (внутрикожной) и интрамаммарной (в жировую клетчатку молочной железы — МЖ) трансплантации опухолевого материала, полученного разными методами.

Материалы и методы

Исследование проведено на половозрелых мышках линии C57BL/6 SPF-категории. Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях [3]. В качестве источника

опухолевого материала использовали замороженную в жидком азоте суспензию клеток из фрагмента опухоли меланомы B16 в 0,9 % растворе натрия хлорида с добавлением 10 % диметилсульфоксида. Характеристика исследуемых групп представлена в табл. 1. Трансплантацию опухолевого материала выполняли ортотопически (внутрикожно) [4] и интрамаммарно (в жировую клетчатку 4-й правой брюшной МЖ) [5].

У животных оценивали следующие показатели: динамику массы тела, степень энgraфтмента (приживления) и сроки появления измеряемых опухолей. Измерение линейных размеров опухоли проводили с помощью цифрового штангенциркуля. Объем опухоли в каждой временной точке определяли по формуле

$$V = (A \times B^2)/2,$$

где V — объем опухоли, мм³; A — наибольший диаметр опухоли, мм; B — перпендикулярный ему диаметр, мм.

Измерение объема опухоли продолжали до тех пор, пока в группе оставалось не менее 3 животных. Оценивали кинетику роста трансплантированных опухолей, частоту изъязвления опухолей, общую выживаемость (ОВ), массовый коэффициент опухоли (МКО) и профиль метастазирования по данным некропсии. Период наблюдения составил 68 дней.

Статистический анализ выполняли с помощью лицензированного программного обеспечения GraphPad Prism версии 9.1.1. При множественных

Таблица 1. Характеристика экспериментальных групп

Table 1. Characteristics of experimental groups

Группа Group	N	Источник опухолевого материала Source of tumor material	Сайт трансплантации Site of transplantation	Количество материала на мышь Quantity of material per mouse
1	8♀	<i>In vivo</i> ¹ (внутрикожная опухоль) <i>In vivo</i> ¹ (intra dermal tumor)	Внутрикожно Intradermally	50 % суспензия в 100 мкл среды DMEM 50 % suspension in 100 μl DMEM medium
2	8♀	<i>In vivo</i> ¹ (внутрикожная опухоль) <i>In vivo</i> ¹ (intra dermal tumor)	Интрамаммарно Intramammary	
3	8♀	<i>In vivo</i> ¹ (интрамаммарная опухоль) <i>In vivo</i> ¹ (intramammary tumor)	Внутрикожно Intradermally	
4	8♀	Опухолевые клетки из первичной культуры, культивированные <i>in vitro</i> ² , — P6 Tumor cells from primary culture cultured <i>in vitro</i> ² — P6		
5	8♀	Опухолевые клетки из первичной культуры, культивированные <i>in vitro</i> ² , — P14 Tumor cells from primary culture cultured <i>in vitro</i> ² — P14		
6	8♀	Опухолевые клетки из первичной культуры, культивированные <i>in vitro</i> ² , — P14 Tumor cells from primary culture cultured <i>in vitro</i> ² — P14	Интрамаммарно Intramammary	2 × 10 ⁶ клеток в 100 мкл среды DMEM 2 × 10 ⁶ cells in 100 μl DMEM medium

¹Для формирования опухолевых изографтов 2 мышам внутрикожно и 1 мышью интрамаммарно перевивали по 2 × 10⁶ клеток в 100 мкл среды DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, ООО «БиолоТ», Россия) на мышь, полученных из первичной культуры опухолевых клеток внутрикожной опухоли и культивированных *in vitro* до 2-го пассажа (P2). Через 21 день мышей подвергали этаназии, а из выросших опухолей приготовили суспензии клеток для последующей трансплантации мышам групп 1–3.

²Мышам групп 4–6 трансплантировали клетки линии меланомы B16, полученные из первичной культуры опухолевых клеток, выделенной из внутрикожного изографта, и культивированные *in vitro* по стандартной методике до 6-го (P6, ранний) и 14-го (P14, поздний) пассажей.

¹To form the tumor isografts, two mice were intradermally and one mouse was intramammary transplanted with 2 × 10⁶ cells in 100 µl of DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, "BioloT", LLC, Russia) per mouse, obtained from the primary culture of tumor cells of the intra dermal tumor and cultured *in vitro* up to the 2nd passage (P2). After 21 days, the mice were euthanized, and a cell suspension was prepared from the grown tumors for subsequent transplantation into mice of groups 1–3.

²Mice of groups 4–6 were transplanted with B16 melanoma cell line obtained from the primary tumor cell culture isolated from the intra dermal isograft and cultured *in vitro* according to the standard technique up to the 6th (P6, early) and 14th (P14, late) passages.

попарных сравнениях приведено значение скорректированного на множественность сравнения *p*-значения (*p*_{adj}). Различия считали статистически значимыми при значениях достигнутого уровня значимости *p* < 0,05.

Результаты

Динамика массы тела животных групп 1–6 представлена на рис. 1. Увеличение массы тела животных групп 1–5 со временем было обусловлено ростом трансплантированных опухолей и формированием опухолей большого объема. В группе 6 изменение массы тела в течение эксперимента было менее выражено по сравнению с другими группами. В группе 4 с трансплантированной клеточной линией меланомы B16 из P6 в начальный период наблюдали снижение массы тела, что, по-видимому, является результатом

ухудшения качества жизни мышей из-за раннего изъязвления опухолей, их некрозов и кровоточивости.

В табл. 2 приведены сведения о степени энграфт-мента, сроках появления измеряемых опухолей и длительности измерения линейных размеров опухоли в эксперименте.

На момент начала измерений имелись статистически значимые различия в объеме опухолей (Welch's ANOVA test, *p* = 0,0003). Post-hoc тест Геймса–Хьюэлл выявил статистически значимые различия между группами 2 и 4 (*p*_{adj} = 0,0119), группами 3 и 6 (*p*_{adj} = 0,0080) и группами 4 и 6 (*p*_{adj} = 0,0040) (рис. 2).

Кинетические кривые роста меланомы B16 приведены на рис. 3. В группах 1 и 3 наблюдали быстрый рост внутрикожных опухолей, полученных после трансплантации суспензии клеток из внутрикожного (группа 1) и интрамаммарного (группа 3) изографтов.

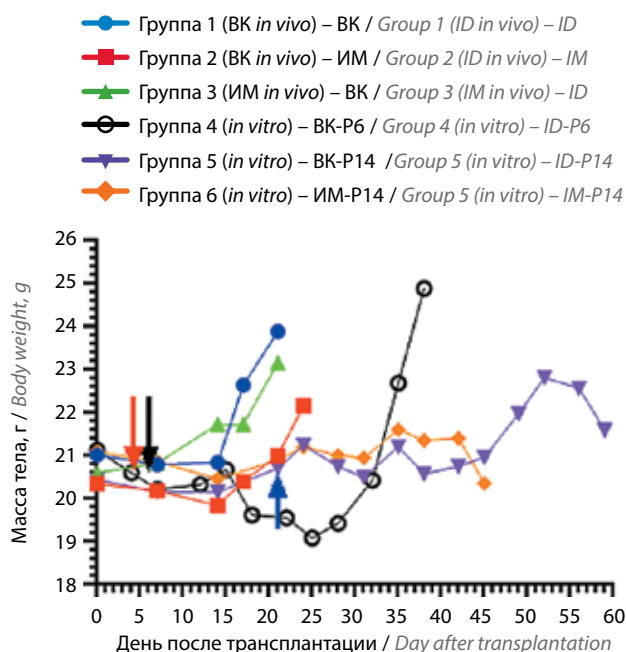


Рис. 1. Динамика массы тела животных экспериментальных групп. Красной стрелкой указан день появления измеряемых опухолей в группах 1–3, черной – в группе 4, синей – в группах 5 и 6. Данные представлены в виде среднего значения (mean). Здесь и на рис. 2–6: BK – внутрикожный, IM – интрамаммарный

Fig. 1. The course of body weight of animals in experimental groups. The red arrow indicates the day of appearance of the measured tumors in groups 1–3, the black arrow is in group 4, and the blue arrow is in groups 5 and 6. Data are presented as a mean value. Here and on fig. 2–6: ID – intradermally, IM – intramammary

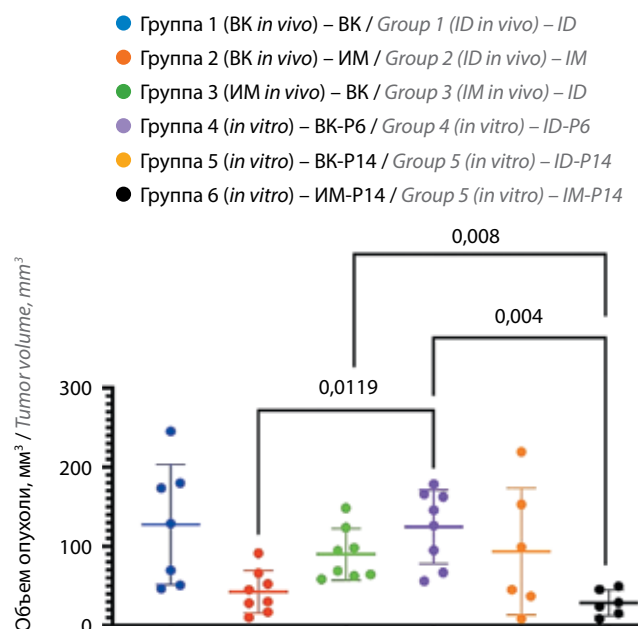


Рис. 2. Объем опухоли на момент начала измерений. Данные представлены в виде среднего (mean) и стандартного отклонений (SD). Указаны все индивидуальные значения

Fig. 2. Tumor volume at the start of measurements. Data are presented as mean deviation and standard deviation (SD). All individual values are indicated

Для опухолей, полученных после трансплантации клеток из P6 и P14 и перевитых внутрикожно, наблюдали сходный профиль кинетических кривых.

Таблица 2. Параметры оценки формирования опухолей меланомы B16 в зависимости от источника опухолевого материала и сайта трансплантации

Table 2. Parameters for assessing the formation of B16 melanoma tumors depending on the source of tumor material and the site of transplantation

Группа Group	Число животных (число эффективных животных) Number of animals (number of effective animals)	Энграфтмент, абс. (%) Engraftment, abs. (%)	День появления измеряемых опухолей* Day of onset of measurable tumors*	День окончания измерений размеров опухоли Last day of tumor measurements*
1	8 (8)	8/8 (100)	4	21
2				24
3				21
4			5	38
5	8 (6)	7/8 (87,5)	24-й – 3♀, 28-й – 3♀, отсроченное появление опухоли на 35-й – 1♀ 24 th – 3♀, 28 th – 3♀, delayed appearance of the tumor on the D35 – 1♀	56
6	8 (6)	7/8 (87,5)	24-й – 6♀, отсроченное появление опухоли на 35-й – 1♀ 24 th – 6♀, delayed appearance of the tumor on the D35 – 1♀	42

*Со дня после трансплантации.

*From the day after transplantation.

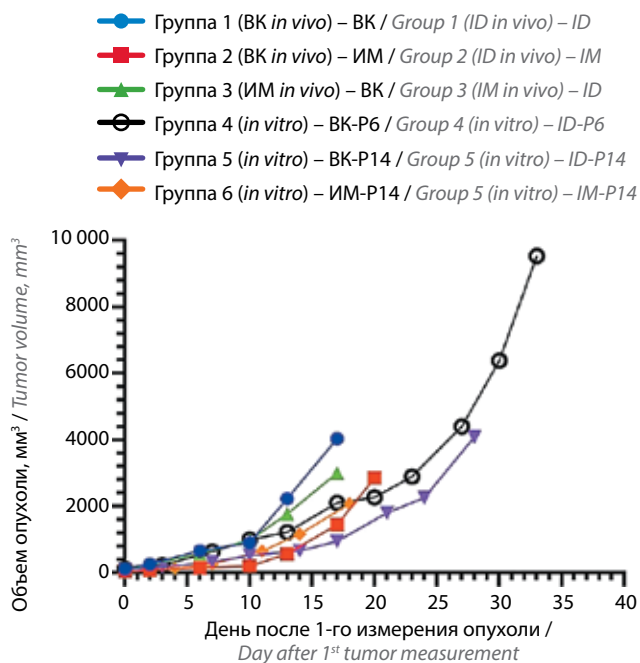


Рис. 3. Кинетика роста опухолей. Данные представлены в виде среднего значения (mean)

Fig. 3. Tumor growth kinetics, all groups. Data are presented as mean

При интрамаммарной трансплантации различного материала кинетические кривые были практически идентичны с той лишь разницей, что средний конечный объем опухоли в группе 2 был больше. Это обусловлено большей продолжительностью жизни мышей в этой группе.

На рис. 4 представлены сведения о частоте изъязвления опухолей у животных групп 1–6. Как видно из рис. 4, в группах с внутрикожной трансплантацией опухоли практически у всех мышей наблюдали изъязвление опухолей, что согласуется с данными литературы [5]. Напротив, в группах с интрамаммарной трансплантацией только у 2 животных группы 6 обнаружили язвы.

На рис. 5 представлены кривые Каплана–Мейера ОВ животных в экспериментальных группах. При попарном сравнении кривых ОВ логранк-тестом статистически значимых различий в ОВ не установлено (при использовании скорректированного с помощью поправки Бонферрони значения $\alpha = 0,0033$). Вероятно, для того чтобы получить статистически значимые различия, необходимо увеличить размер выборки животных в экспериментальных группах.

На рис. 6 приведены данные о МКО у животных групп 1–6. Следует отметить, что измерить массу опухоли в ходе некропсии удалось не у всех животных, т. к. среди мышей наблюдали каннибализм с поеданием опухоли у павших животных внутри одной клетки. Из-за значительной вариабельности МКО внутри групп, а также малого количества животных, у кото-

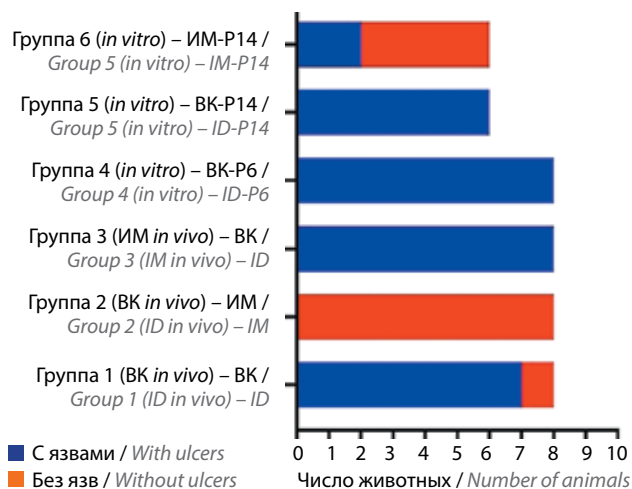


Рис. 4. Частота изъязвления (некроза) экспериментальных опухолей

Fig. 4. Incidence of ulceration (necrosis) of experimental tumors

Медиана общей выживаемости, дни / Median overall survival, days

- 13,5 ● Группа 1 (BK in vivo) – BK / Group 1 (ID in vivo) – ID
- 18,0 ■ Группа 2 (BK in vivo) – ИМ / Group 2 (ID in vivo) – ИМ
- 15,5 ▲ Группа 3 (ИМ in vivo) – BK / Group 3 (ИМ in vivo) – ID
- 21,0 ○ Группа 4 (in vitro) – BK-P6 / Group 4 (in vitro) – ID-P6
- 27,0 ▼ Группа 5 (in vitro) – BK-P14 / Group 5 (in vitro) – ID-P14
- 21,0 ◆ Группа 6 (in vitro) – ИМ-P14 / Group 5 (in vitro) – ИМ-P14

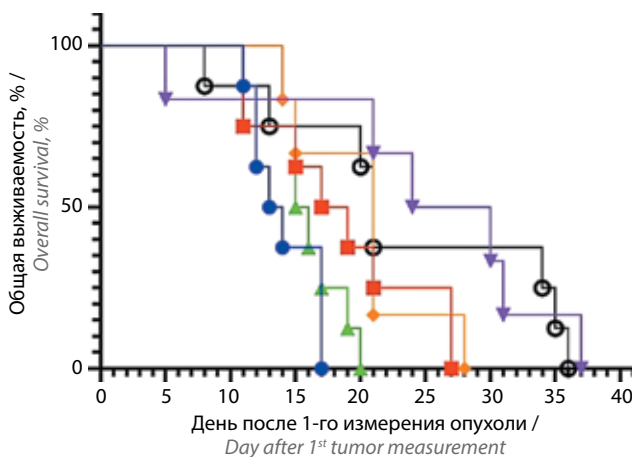


Рис. 5. Кривые Каплана–Мейера общей выживаемости животных в экспериментальных группах

Fig. 5. Kaplan–Meier curves of overall survival of animals in experimental groups

рых удалось оценить МКО, статистически значимые различия для этого показателя не были получены.

В табл. 3 представлены сведения о характере метастатического поражения внутренних органов и тканей животных. В группах 1 и 3 рост опухоли был ограничен только местом инокуляции исходного опухолевого материала, полученного из внутрикожного и интрамаммарного изографтов. В то же время внутрикожный изографт, перевитый интрамаммарно

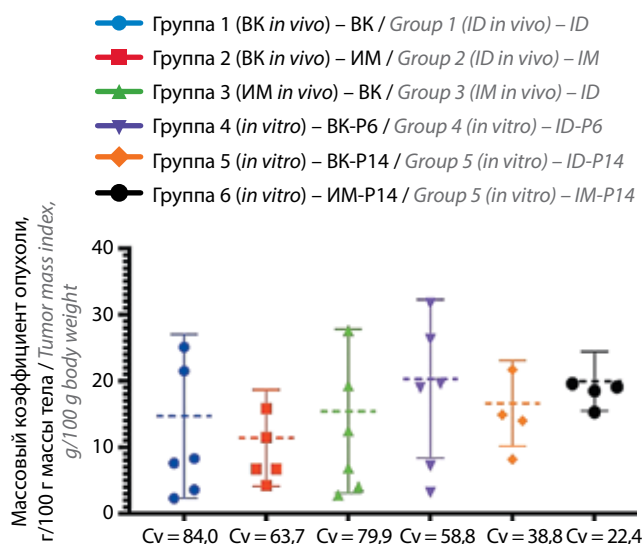


Рис. 6. Массовый коэффициент опухоли. Данные представлены в виде среднего (mean) и стандартного отклонения (SD). Указаны все индивидуальные значения. Cv – коэффициент вариации, %

Fig. 6. Tumor mass index. Data are presented as mean and standard deviation (SD). All individual values are indicated. Cv – coefficient of variation, %

(группа 2), обеспечил формирование широкого спектра метастатического поражения органов грудной и брюшной полостей. Интересно, что в результате клональной селекции отдельных субпопуляций клеток меланомы B16, культивированных *in vitro* до 6-го и 14-го пассажей и впоследствии трансплантированных внутривенно (группы 4 и 5), частота возникновения макроскопических метастазов в легкое достигла 50 %. При этом 1-й случай возникновения метастазов в легкое был зарегистрирован на 21-й день после 1-го измерения опухолей вне зависимости от источника получения опухолевого материала и сайта трансплантации. Во всех случаях наличие метастазов меланомы B16 было подтверждено гистологически. В целом профиль метастазирования

меланомы B16 в исследовании соответствовал такому, характерному для меланомы человека [6].

Важным наблюдением в проведенном исследовании было появление злокачественного геморрагического плеврального выпота. Причем не всегда наличие плеврального выпота сопровождалось макроскопическим выявлением метастазов в легкое. В группах с интрамаммарной трансплантацией частота плеврального выпота достигала 50 % (табл. 4). Следует отметить, что у человека частота злокачественного плеврального выпота при меланоме не превышает 2 % [7].

При цитологическом анализе мазков плеврального выпота, окрашенных по Романовскому, выявлены меланоциты со множественными цитологическими критериями злокачественности, включая варибельную пигментацию, многоядерность, анизоцитоз от умеренного до выраженного и анизокариоз, варибельное ядерно-цитоплазматическое соотношение и формирование ядра. В мазках также определяли большие клетки с обильной пенистой цитоплазмой, содержащей материал, соответствующий пигменту (вероятно, меланофаги) (рис. 7).

Обсуждение

В неклинических исследованиях перспективных противоопухолевых агентов использование различных источников получения опухолевого материала и сайтов трансплантации существенно влияет на параметры роста сингенных опухолей, на их инвазивный потенциал и профиль метастазирования. В настоящее время ведутся широкие дебаты по поводу достоверности результатов, полученных на immortalized коммерческих клеточных линиях опухолей человека и животных, из-за возможности клональной селекции и артефактов, связанных с культивированием *in vitro*. Клеточные линии адаптируются к искусственной среде без стромальных, сосудистых и воспалительных клеток. В последнее

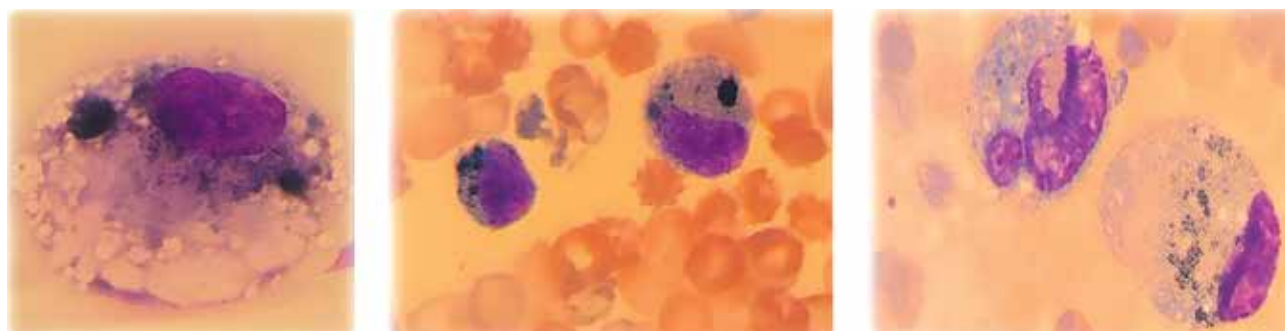


Рис. 7. Цитологическая картина мазков геморрагического плеврального выпота. Цитологическая дифференцировка обнаруженных в мазках клеток затруднена, поскольку пигментированные макрофаги, поглотившие клетки меланомы (меланофаги), имитируют клетки меланомы

Fig. 7. Cytological view of smears of hemorrhagic pleural effusion. There are difficulties with cytological differentiation of cells found in smears as pigmented macrophages that have ingested melanoma cells (melanophages) mimic melanoma cells

Таблица 3. Сведения о частоте и очагах метастазирования экспериментальных опухолей меланомы B16, полученных в эксперименте
Table 3. Details about the incidence and foci of metastasis of experimental B16 melanoma tumors obtained in the experiment

Группа Group	Локализация метастазов Localization of metastases	Частота, абс. (%) Incidence, abs. (%)
1 – (BK <i>in vivo</i>) – BK 1 – (ID <i>in vivo</i>) – ID	Макроскопически метастазы не выявлены ни у одного животного Macroscopically, metastases were not detected in any animal	
2 – (BK <i>in vivo</i>) – ИМ 2 – (ID <i>in vivo</i>) – IM	Метастазы в легкое (макроскопические) Metastases in the lung (macroscopic)	3/8 (37,5)
	Брыжейка кишечника, ворота печени, парагонадная клетчатка Mesentery of the intestine, hilum of the liver, paragonadal fat pad	5/8 (62,5)
	Яичник Ovary	1/8 (12,5)
3 – (ИМ <i>in vivo</i>) – BK 3 – (IM <i>in vivo</i>) – ID	Макроскопически метастазы не выявлены ни у одного животного Macroscopically, metastases were not detected in any animal	
4 – (<i>in vitro</i>) – BK-P6 4 – (<i>in vitro</i>) – ID-P6	Метастазы в легкое (макроскопические) Metastases in the lung (macroscopic)	4/8 (50 %)
	Метастазы в двух аксиллярных лимфоузлах со стороны растущей внутрикожной опухоли Metastases in two ipsilateral axillary lymph nodes from a growing intradermal tumor	1/8 (12,5)
5 – (<i>in vitro</i>) – BK-P14 5 – (<i>in vitro</i>) – ID-P14	Метастазы в легкое (макроскопические) Metastases in the lung (macroscopic)	3/6 (50 %)
6 – (<i>in vitro</i>) – ИМ-P14 6 – (<i>in vitro</i>) – IM-P14	Брыжейка кишечника, ворота печени, парагонадная клетчатка Mesentery of the intestine, hilum of the liver, paragonadal fat pad	1/6 (16,7 %)
	Метастазы в легкое макроскопически не обнаружены, но у 3 из 6 мышей был злокачественный плевральный выпот Lung metastases are not found macroscopically, but 3 out of 6 mice have a malignant pleural effusion	
	Метастазы в паратрахеальные лимфоузлы Metastases in paratracheal lymph nodes	2/6 (33,3)

Примечание. Здесь и в табл. 4: BK – внутрикожный; ИМ – интрамаммарный.
Note. Here and in Table 4: ID – intradermal; IM – intramammary.

Таблица 4. Частота развития злокачественного плеврального выпота
Table 4. Incidence of malignant pleural effusion

Группа Group	Частота, абс. (%) Incidence, abs. (%)
2 – (BK <i>in vivo</i>) – ИМ 2 – (ID <i>in vivo</i>) – IM	4/8 (50)
5 – (<i>in vitro</i>) – BK-P14 5 – (<i>in vitro</i>) – ID-P14	1/6 (17)
6 – (<i>in vitro</i>) – ИМ-P14 6 – (<i>in vitro</i>) – IM-P14	3/6 (50)

время все больший интерес проявляется к технике изографтов, т. е. подход с трансплантацией опухолевого материала в виде фрагментов первичной опухоли или клеточной суспензии из нее от мыши-донора мыши-реципиенту без культивирования *in vitro*. Это

мышинный вариант PDX-моделей (patient-derived xenograft). Техника изографтов сочетает положительные аспекты существующих трансплантируемых моделей *in vivo* – функциональную иммунную систему сингенных моделей, а также консервативные характеристики опухоли и широкое разнообразие PDX-моделей [8]. Ортотопическая трансплантация (т. е. в физиологически релевантную нишу) такого опухолевого материала обеспечивает сходство трансплантируемых моделей с моделями спонтанного канцерогенеза [9]. Ортотопическим сайтом для меланомы является зона дермоэпидермального соединения, поэтому в исследовании была выполнена внутрикожная, а не подкожная трансплантация сингенной опухоли. Многие лаборатории имеют линию и сублинии сингенной меланомы B16. Однако даже в пределах одной лаборатории B16 может быстро меняться с течением времени. Наблюдаемые изменения включают резкие различия в степени пигментации, минимальной канцерогенной дозе, метастатическом потенциале,

экспрессии антигенов и распознавании цитотоксическими Т-лимфоцитами [4]. Известно более 150 клонов и субклонов меланомы B16, которые различаются по инвазивному и метастатическому потенциалам, скорости пролиферации [10]. В представленной работе на конкретном примере продемонстрирована теория клональной эволюции опухоли в результате селекции субпопуляций клеток *in vivo* и *in vitro*, обладающих разным фенотипом. Следует отметить, что в отличие от меланомы человека меланома B16 является иммунологически «холодной» опухолью и плохо поддается лечению ИИКТ [11]. Можно предположить, что клональная архитектура исходной клеточной суспензии меланомы B16, использованной в проведенном исследовании, включала субклон B16F10, который в исходном фрагменте не являлся доминантным. Трансплантация субклона B16F10 моделирует ситуацию у пациентов с меланомой, которые не отвечают на терапию ИИКТ, и может служить для оценки эффективности комбинаций с ИИКТ.

Известно, что по мере внутрикожного роста меланомы B16 наблюдается развитие центрального некроза, изъязвления и кровоточивости опухолевых узлов. Рекомендуется подвергать животных эвтаназии до развития этих явлений [4]. Это существенно сокращает «терапевтическое окно», т.е. максимальное время от начала экспериментальной терапии после рандомизации до окончания исследования. Альтернативным сайтом трансплантации может быть интрамаммарная трансплантация в жировую клетчатку МЖ мышей. С. Obodozie и соавт. в 2019 г. показали, что

в данном случае наблюдается более высокая гомогенность роста опухоли без ее изъязвления, а также высокая инфильтрация опухоли иммунокомпетентными клетками, что важно для выполнения иммуноонкологических экспериментов [5]. В проведенном исследовании отчасти подтвердилось предположение о том, что жировая клетчатка МЖ служит буферной зоной между опухолью и дермой, ограничивая изъязвление опухоли. Феномен высокой частоты метастазирования интрамаммарных опухолей меланомы B16 и развития злокачественного плеврального выпота, по-видимому, обусловлен особенностями кровотока и лимфотока МЖ животных.

Заключение

Результаты проведенного исследования дополняют сведения о том, что клетки сингенной меланомы B16 обладают как наследственными, так и селекционными фенотипическими признаками, которые влияют на их способность к метастазированию. На конкретном примере показано, насколько гетерогенным может быть поведение сингенных опухолей, полученных изначально только из одного фрагмента, в зависимости от вида опухолевого материала (изографт или клеточная линия), условий культивирования (количество пассажей) и сайта трансплантации (внутрикожно или интрамаммарно). Полученные данные могут быть использованы в рутинной работе центров доклинических исследований при планировании и проведении экспериментальных работ с использованием сингенных моделей опухолей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Switzer B., Puzanov I., Skitzki J.J. et al. Managing metastatic melanoma in 2022: A clinical review. *JCO Oncol Pract* 2022;18(5):335–51. DOI: 10.1200/OP.21.00686
- Taylor M.A., Hughes A.M., Walton J. et al. Longitudinal immune characterization of syngeneic tumor models to enable model selection for immune oncology drug discovery. *J Immunother Cancer* 2019;7(1):328. DOI: 10.1186/s40425-019-0794-7
- European Parliament and the Council of the European Union. 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union* 2010;53:33–79.
- Overwijk W.W., Restifo N.P. B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr Protoc Immunol* 2001;Chapter 20:Unit 20.1. DOI: 10.1002/0471142735.im2001s39
- Obodozie C., Ruf S., Bijelic G. et al. Abstract A012: Mammary fat pad injections: An alternative implantation method for syngeneic tumor models. *Mol Cancer Therap* 2019;18(12 Suppl.):A012. DOI: 10.1158/1535-7163.TARG-19-A012
- Belhocine T.Z., Scott A.M., Even-Sapir E. et al. Role of nuclear medicine in the management of cutaneous malignant melanoma. *J Nucl Med* 2006;47(6):957–67. PMID: 16741305
- Chen J.T., Dahmash N.S., Ravin C.E. et al. Metastatic melanoma in the thorax: Report of 130 patients. *AJR Am J Roentgenol* 1981;137(2):293–8. DOI: 10.2214/ajr.137.2.293
- Jantschkeff P., Beshay J., Lemarchand T. et al. Mouse-derived isograft (MDI) *in vivo* tumor models I. spontaneous sMDI models: Characterization and cancer therapeutic approaches. *Cancers (Basel)* 2019;11(2):244. DOI: 10.3390/cancers11020244
- McCauley H.A., Guasch G. Serial orthotopic transplantation of epithelial tumors in single-cell suspension. *Methods Mol Biol* 2013;1035:231–45. DOI: 10.1007/978-1-62703-508-8_20
- Poste G., Doll J., Fidler I.J. Interactions among clonal subpopulations affect stability of the metastatic phenotype in polyclonal populations of B16 melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78(10):6226–30. DOI: 10.1073/pnas.78.10.6226
- Kamensek U., Ursic K., Markelc B. et al. Mutational burden, MHC-I expression and immune infiltration as limiting factors for in situ vaccination by TNF α and IL-12 gene electrotransfer. *Bioelectrochemistry* 2021;140:107831. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2021.107831

Вклад авторов

Я.Г. Муразов: разработка дизайна исследования, проведение эксперимента *in vivo*, анализ результатов исследования, написание текста рукописи;

Я.В. Агацарская: культивирование опухолевых клеток, подготовка клеточного материала для трансплантации животным, анализ результатов исследования, редактирование текста рукописи.

К.Л. Крышень: критические замечания, редактирование текста статьи.

Author's contributions

Ia.G. Murazov: study design development, conducting an *in vivo* experiment, analyzing the results of the study, writing the text of the manuscript; Ia.V. Agatsarskaya: cancer cell culturing, preparation of cellular material for transplantation into animals, analyzing the results of the study, editing the text of the manuscript.

K.L. Kryshen: critical revision of the article, editing of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

Я.Г. Муразов / Ia.G. Murazov: <https://orcid.org/0000-0002-6573-3112>

Я.В. Агацарская / Ia.V. Agatsarskaya: <https://orcid.org/0000-0002-7772-7318>

К.Л. Крышень / K.L. Kryshen: <https://orcid.org/0000-0003-1451-7716>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

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. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике АО «НПО «Дом фармации», заключение БЭК № 2.5/23.

Compliance with principles of bioethics. 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 Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes. The study protocol was approved by the Bioethics Committee of RMC «Home of Pharmacy», ethical approval No 2.5/23.

Статья поступила: 06.09.2023. Принята в печать: 24.11.2023.

Article received: 06.09.2023. Accepted for publication: 24.11.2023.