

**К вопросу об особенностях роста меланомы B16 у мышей C57Bl/6 при использовании различных техник получения опухолевого материала и сайтов трансплантации сингенной опухоли**

Муразов Ярослав Геннадьевич, к.б.н.

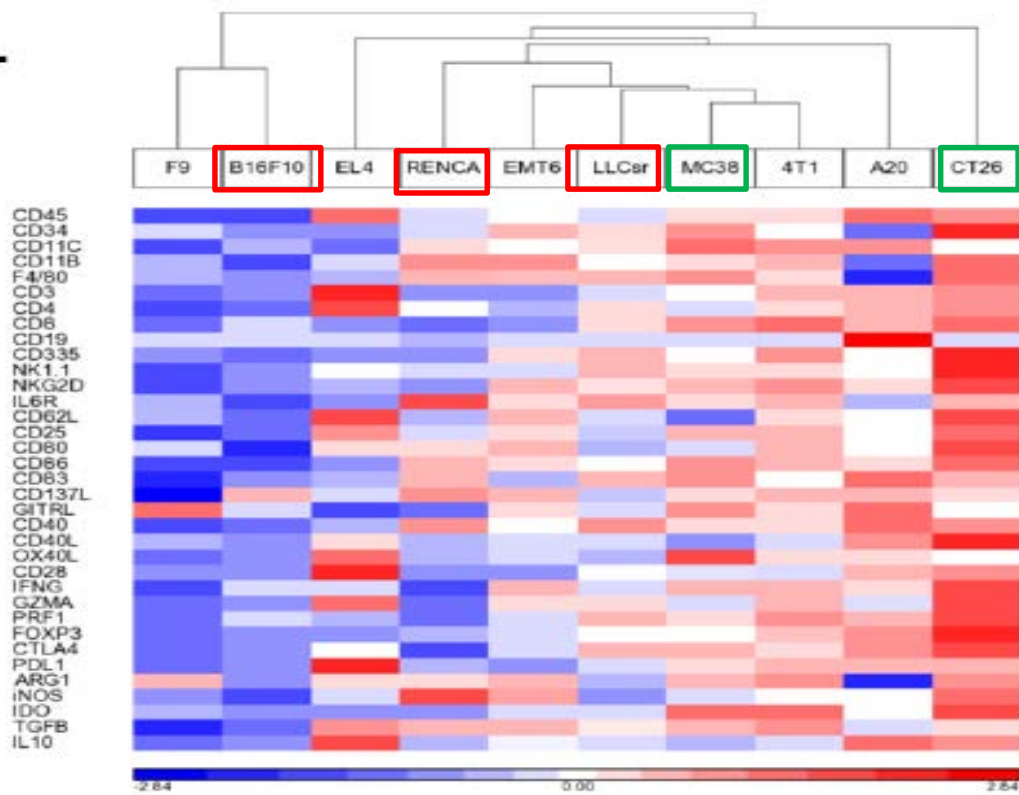
2023

# Сингенная линия меланомы B16

- Многие лаборатории имеют линию и сублинии B16. 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 CTLs.
- Известно более 150 клонов и субклонов меланомы B16. Они различаются по инвазивному и метастатическому потенциалу, скорости пролиферации
- ***Fidler (1973) впервые показал, что метастатический потенциал опухолевых клеток меланомы B16 может быть усилен путем селекции in vivo (серийные подкожные пассажи материала из mts в легкое) – получена сублиния B16F10.***
- Poste G. и соавт (1981): анализ метастатических свойств клонов, выделенных из клеточных линий мышинной меланомы B16 (B16-F1 и F10), демонстрирует значимую клеточную гетерогенность и наличие субпопуляций, обладающих сильно различающимися метастатическими свойствами. Эта картина метастатической гетерогенности сохраняется во время серийных пассажей in vitro и in vivo. **В поликлональных популяциях различные клональные субпопуляции каким-то образом взаимодействуют друг с другом, чтобы «стабилизировать» их относительные пропорции в популяции, пока не встретится следующее событие давления отбора.**
- Для получения метастатической модели обычно требуют резекция первичной опухоли (или резекции подушечки лапы с первичной опухолью) или внутрисосудистое введение линии - ***псевдометастатическая модель.***
- ***Трансплантация B16F10 может моделировать ситуацию у пациентов с меланомой, которые не отвечают на терапию ИИКТ, и может служить для оценки эффективности комбинаций с ИИКТ.***

# Иммуногенность сингенных опухолей мышей и опухолей человека

B.



Zhong et al. BMC Genomics (2020) 21:3  
https://doi.org/10.1186/s12864-019-6344-3

BMC Genomics

RESEARCH ARTICLE Open Access

Comparison of the molecular and cellular phenotypes of common mouse syngeneic models with human tumors

Wenyan Zhong<sup>1\*</sup>, Jeremy S. Myers<sup>1</sup>, Fang Wang<sup>1</sup>, Kai Wang<sup>2</sup>, Justin Lucas<sup>1</sup>, Edward Rooford<sup>1</sup>, Judy Lucas<sup>1</sup>, Andrea T. Hooper<sup>1</sup>, Sharon Yang<sup>1</sup>, Lu Anna Lemon<sup>1</sup>, Magali Guffroy<sup>2</sup>, Chad May<sup>1</sup>, Jadwiga R. Bienkowska<sup>2</sup> and Paul A. Rejto<sup>2\*</sup>

Трансляция результатов ДКИ от мыши к человеку может быть более «хитрой», чем просто выбор сингенного штамма на основании сходства гистогенеза с тканью (органом), из которых опухоль развивается у человека

*«Высокая иммуногенность линии CT26 и низкая иммуногенность линий B16F10 и RENCA в нашем исследовании отличается от того, что было продемонстрировано для опухолей человека сходного гистогенеза».*

*«There is another reason, why you should not use cell lines, you don't know the exact history and origin».*

Nelson-Rees, W.A., et al. (1981) Cross-contamination of cells in culture. Science 212, 446–452



# TECHNICAL DOCUMENTS

## PASSAGE NUMBER EFFECTS IN CELL LINES

The ability of continuous cell lines to exist almost indefinitely in vitro has opened the possibility of questionable subculturing practices and hence, questionable scientific data. The degree of subculturing a cell line has undergone is often expressed as “passage number,” which can generally be thought of as the number of times cells have been transferred from vessel-to-vessel. A growing body of literature demonstrates passage number affects a cell line’s characteristics over time.<sup>1-6</sup> Cell lines at high passage numbers experience alterations in morphology, response to stimuli, growth rates, protein expression and transfection efficiency, compared to lower passage cells.

## Изографты - это пересадка ткани реципиенту от генетически идентичного близнеца-донора

- Подход с трансплантацией сингенного опухолевого материала «от мыши к мыши» без культивирования *in vitro* – хорошо забытое старое... Сегодня приобретает все больший интерес в связи с развитием иммунотерапии ЗНО. **Измельченная опухоль с естественным «матригелем» и ростовыми факторами!**
- Мышиный вариант PDX-моделей. Сочетает в себе положительные аспекты существующих моделей: функциональную иммунную систему сингенных мышей и консервативные характеристики опухоли.
- **Обеспечивает сохранение характеристик опухоли и внутриопухолевых популяций иммунных клеток.** Изографты подходят для изучения взаимодействия между стромой, иммунными клетками и микроокружением при прогрессировании, метастазировании и терапии опухолей в полностью естественных условиях (хозяина).
- Используют фрагменты мышинных аутохтонных опухолей - получены путем инициации опухолей в нормальных клетках *de novo* у интактного организма:
  - в результате спонтанного или химически (физически)-индуцированного канцерогенеза
  - от GEMMs



NIH Public Access

Author Manuscript

*Methods Mol Biol.* Author manuscript; available in PMC 2014 May 30.

Published in final edited form as:

*Methods Mol Biol.* 2013 ; 1035: 231–245. doi:10.1007/978-1-62703-508-8\_20.

**Serial orthotopic transplantation of epithelial tumors in single-cell suspension**

Heather A. McCauley and Géraldine Guasch

Division of Developmental Biology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center

- This protocol begins with a tumor cell line of interest.
- The first step involves transplanting these cells into the microenvironment of origin in recipient mice, either immunocompromised or of a syngeneic background.
- Depending on the aggressiveness of the tumor cells, as well as the number of cells transplanted, tumors will begin to grow in the recipient mice within one to six weeks.
- These tumors grafted from the cell line can then be dissociated into a single cell suspension and re-transplanted into the orthotopic microenvironment of a new recipient mouse to test self-renewal properties of tumor cells.
- This protocol ensures that an experimental tumorigenesis assay more closely mimics the progression of a spontaneously arising tumor by keeping the microenvironment consistent.

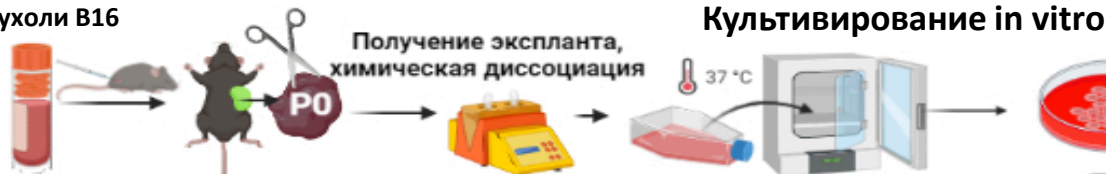
# Дизайн исследования

## Первичная опухоль без культивирования in vitro



Ортопическим сайтом для меланомы является зона дермоэпидермального соединения – внутрикожное, а не подкожное введение!

Суспензия из фрагмента опухоли B16



Необходимо минимальное количество пассажей in vitro материала, который претерпел селекцию in vivo. Возможна потеря части фенотипа!

# Получение первичной культуры опухолевых клеток с последующим созданием клеточной линии





# Дизайн исследования

Группа, №	N	Источник опухолевого материала	Место трансплантации	Количество материала на мышь
1	8♀	in vivo <sup>1</sup> (внутрикожная опухоль)	в/к	50% суспензия, 100 мкл
2	8♀	in vivo <sup>1</sup> (внутрикожная опухоль)	и/м	50% суспензия, 100 мкл
3	8♀	опухолевые клетки из первичной культуры, культивированные in vitro <sup>2</sup> – <b>P6</b>	в/к	2×10 <sup>6</sup> в 100 мкл
4	8♀	опухолевые клетки из первичной культуры, культивированные in vitro <sup>2</sup> – <b>P14</b>	в/к	2×10 <sup>6</sup> в 100 мкл
5	8♀	опухолевые клетки из первичной культуры, культивированные in vitro <sup>2</sup> – <b>P14</b>	и/м	2×10 <sup>6</sup> в 100 мкл

<sup>1</sup> – Для формирования опухолевых изографтов двум мышам внутрикожно перевито по 2×10<sup>6</sup> клеток меланомы B16, полученных после P2 in vitro первичной культуры опухолевых клеток из внутрикожной опухоли, в 100 мкл среды DMEM на мышь. Через 10-14 дней мыши подвергнуты эвтаназии, а из выросших опухолей приготовлена суспензия клеток для последующей трансплантации мышам групп 1, 2

<sup>2</sup> – Мышам групп 3, 4 и 5 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.

и/м – интрамаммарно; в/к – внутрикожно

# Внутрикожная (!) трансплантация



Journal for  
Immunotherapy of Cancer

## Depth of tumor implantation affects response to in situ vaccination in a syngeneic murine melanoma model

Peter M Carlson <sup>1</sup>, Manasi Mohan,<sup>1</sup> Matthew Rodriguez,<sup>1</sup> Vladimir Subbotin,<sup>1</sup> Claire X Sun,<sup>1</sup> Ravi B Patel <sup>2</sup>, Jen Birstler,<sup>3</sup> Jacquelyn A Hank,<sup>1</sup> Alexander L Rakhmievich,<sup>1</sup> Zachary S Morris,<sup>1</sup> Amy K Erbe,<sup>1</sup> Paul M Sondel <sup>1,4</sup>

*slight differences in depth of tumor implantation (~300  $\mu$ m) can create substantial differences in response to immunotherapy*



NIH Public Access

Author Manuscript

*Curr Protoc Immunol*. Author manuscript; available in PMC 2009 October 19.

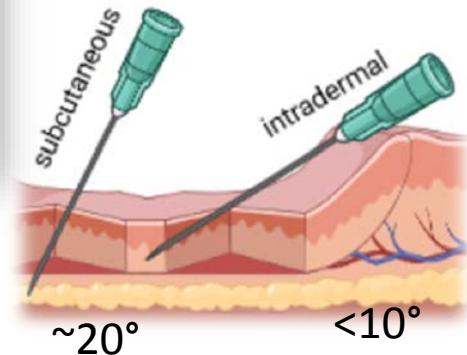
Published in final edited form as:

*Curr Protoc Immunol*. 2001 May ; CHAPTER: Unit-20.1. doi:10.1002/0471142735.im2001s39.

### B16 as a Mouse Model for Human Melanoma

Willem W. Overwijk and Nicholas P. Restifo  
National Cancer Institute, NIH Bethesda, Maryland

*It is important to note that, for subcutaneous tumor growth experiments, a consistent injection technique is extremely important. Each mouse should show a clearly visible, defined "bleb" upon injection; if not, a new mouse should be used. Mice without a clear "bleb" will show delayed tumor growth or no growth at all.*



# SubQperior

the next generation of tumor models

A superior implantation method for cell-line derived tumor models

- Homogeneous tumor growth
- Reproducible study outcome
- Outstanding statistical value

Standard implantation via subcutaneous injection causes frequent ulceration resulting in early abrogation of studies, leaving researchers with too short treatment windows and high heterogeneity with poor statistical value of study results.

To overcome these challenges, we have developed a superior implantation method for standard cell-line derived tumor models.

subQperior: tumor cell implantation into the mammary fat pad

ANIMAL MODELS | DECEMBER 01 2019

## Abstract A012: Mammary fat pad injections: An alternative implantation method for syngeneic tumor models **FREE**

Cynthia Obodozie; Susanne Ruf; Gojko Bijelic; Sandra Moor; Bianca Giesen; Ulrike Leisegang; Sebastian Dempe; Holger Weber

 Check for updates

[+ Author & Article Information](#)

*Mol Cancer Ther* (2019) 18 (12\_Supplement): A012.

<https://doi.org/10.1158/1535-7163.TARG-19-A012>

1 SubQperior implantation results in larger tumors.

2 Homogenous and reliable growth yields study outcomes with outstanding statistical value.

3 Tumors are measured via caliper making the handling as easy and inexpensive as for subcutaneous models.

4 Homogeneous tumor growth of subQperior models allows to reduce the number of mice per arm.

# The subQperior advantage



NIH Public Access

Author Manuscript

*Curr Protoc Immunol*. Author manuscript; available in PMC 2009 October 19.

Published in final edited form as:

*Curr Protoc Immunol*. 2001 May ; CHAPTER: Unit -20.1. doi:10.1002/0471142735.im2001s39.

### B16 as a Mouse Model for Human Melanoma

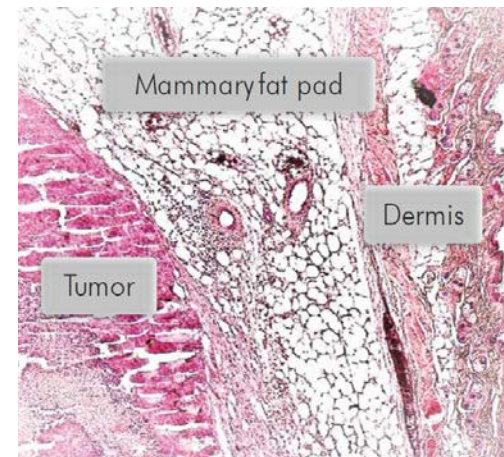
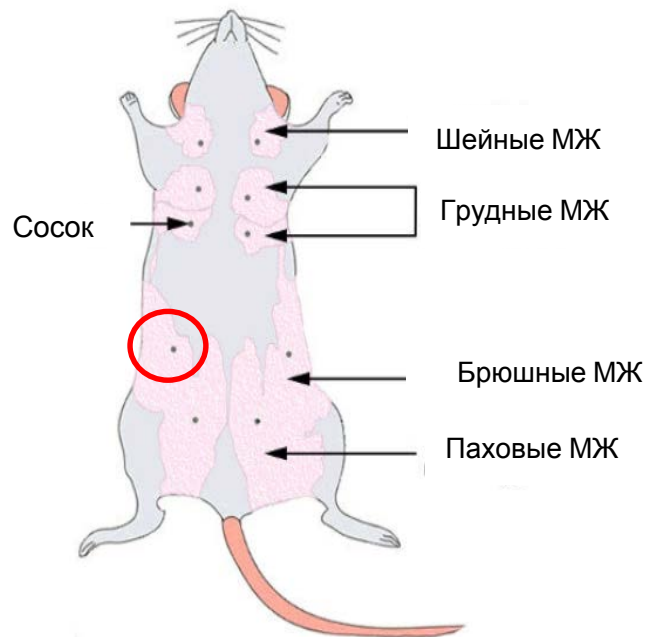
Willem W. Overwijk and Nicholas P. Restifo  
National Cancer Institute, NIH Bethesda, Maryland

### MOUSE MODEL OF SUBCUTANEOUS MELANOMA

The subcutaneous model is widely used for the evaluation of therapy in many tumor models, including B16 melanoma. Upon subcutaneous injection, B16 will form a palpable tumor in 5 to 10 days and grow to a  $1 \times 1 \times 1$ -cm tumor in 14 to 21 days. When allowed to grow larger, the tumors often become necrotic in the center and begin to ulcerate or bleed; it is advisable to sacrifice the mice before this point. The typical dose used is  $1 \times 10^5$  cells/mouse, which is 1.5 to 2 times the minimal tumorigenic dose in normal C57BL/6 mice. It is important to note that, for subcutaneous tumor growth experiments, a consistent injection technique is extremely important. Each mouse should show a clearly visible, defined "bleb" upon injection; if not, a new mouse should be used. Mice without a clear "bleb" will show delayed tumor growth or no growth at all.

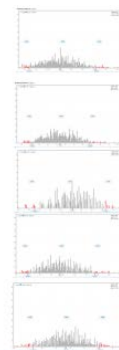
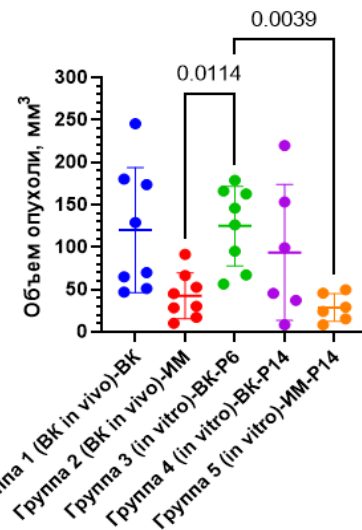
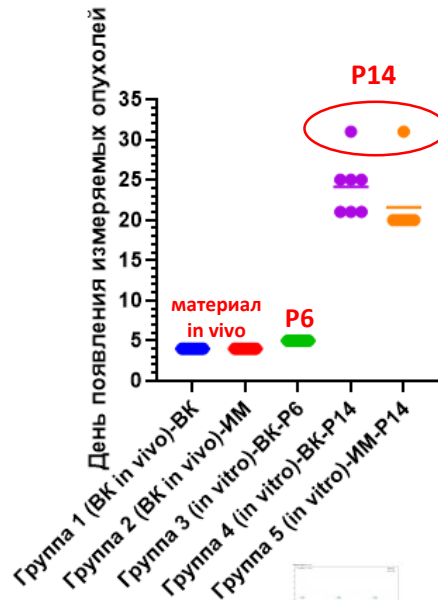
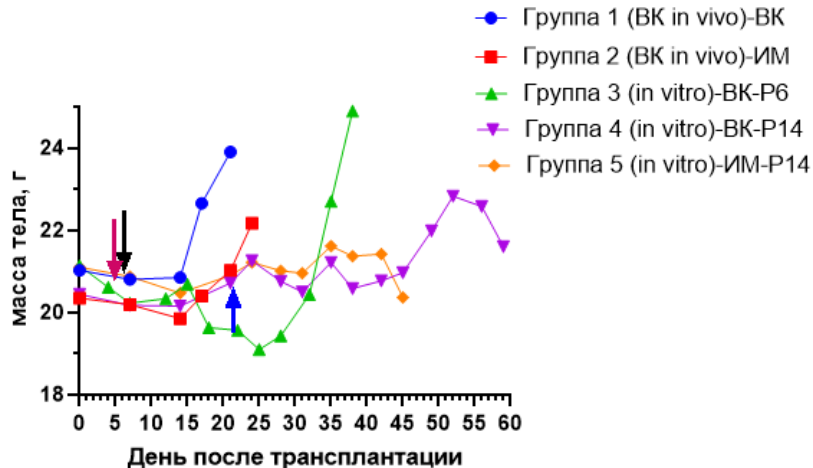
# Интрамаммарная трансплантация

- Жировая клетчатка молочной железы служит буферной зоной между опухолью и дермой, ограничивая изъязвление опухоли
- Было показано, что по сравнению с подкожной перевивкой количество изолированных опухолевых клеток на грамм опухолевой массы увеличивается более чем в два раза при трансплантации в жировую ткань МЖ (Obodozie C. и соавт, 2019)
- Высокая инфильтрация опухоли иммунокомпетентными клетками
- Интрамаммарная перевивка обеспечивает надежное соблюдение принципов 3Rs за счет значимого снижения случаев изъязвления опухоли (refinement) и уменьшения количества экспериментальных единиц (животных) для надежной статистической оценки результатов из-за более гомогенного роста опухолей (reduction).

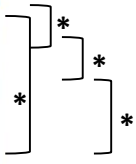


# Степень энграфтмента, день появления, динамика МТ, объем опухоли на момент начала измерений

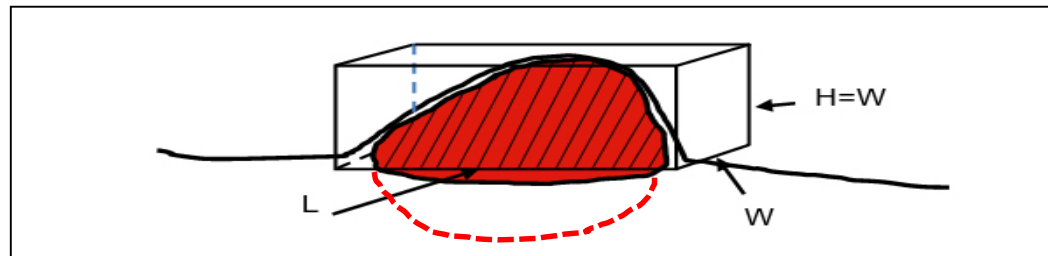
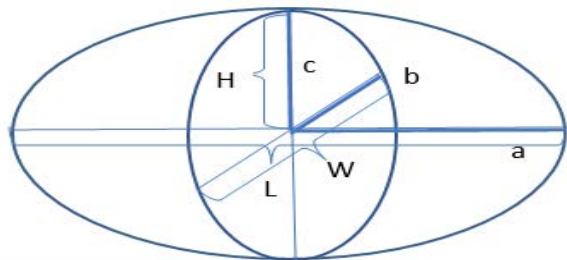
Группа	Источник опухолевого материала	Сайт трансплантации	Энграфтмент	Число эффективных животных
1	in vivo (внутрикожная опухоль)	в/к	8/8	8
2	in vivo (внутрикожная опухоль)	и/м	8/8	8
3	опухолевые клетки из экспланта, культивированные in vitro – P6	в/к	8/8	8
4	опухолевые клетки из экспланта, культивированные in vitro – P14	в/к	7/8	6
5	опухолевые клетки из экспланта, культивированные in vitro – P14	и/м	7/8	6



Группа	95% ДИ (bootstrap, N=1000)
Группа 1 (BK in vivo)-BK	67,3-182,9
Группа 2 (BK in vivo)-ИМ	31,0-63,9
Группа 3 (in vitro)-BK-P6	137,6-171,4
Группа 4 (in vitro)-BK-P14	39,7-154,2
Группа 5 (in vitro)-ИМ-P14	16,7-40,3



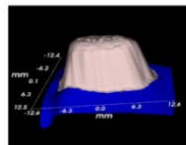
# Точность измерений калипером (штангенциркулем) – под ?



**Измеряем параллелепипед!**

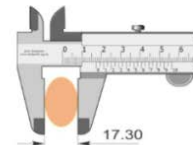


Direct 3D Capture



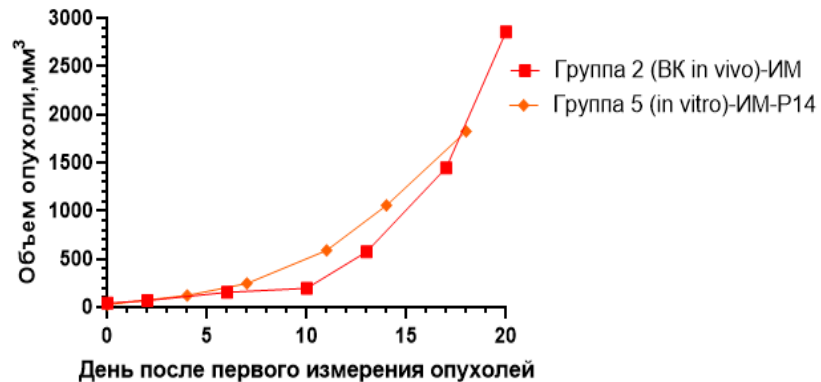
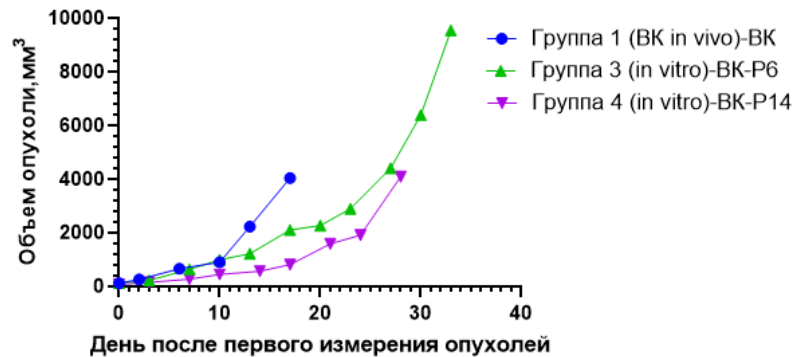
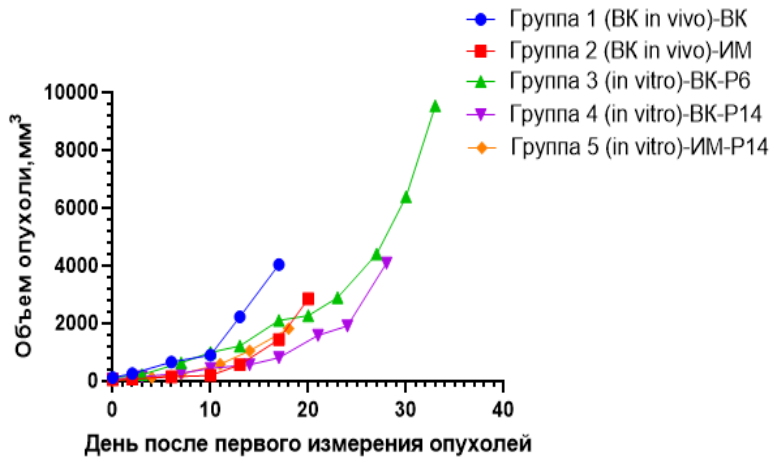
A direct 3D volume capture instrument, such as the TM900, will make a stereographic image of the tumor and reconstruct the tumor topography and shape. A direct and real 3D volume of the xenograft will then be calculated.

Caliper Measurement

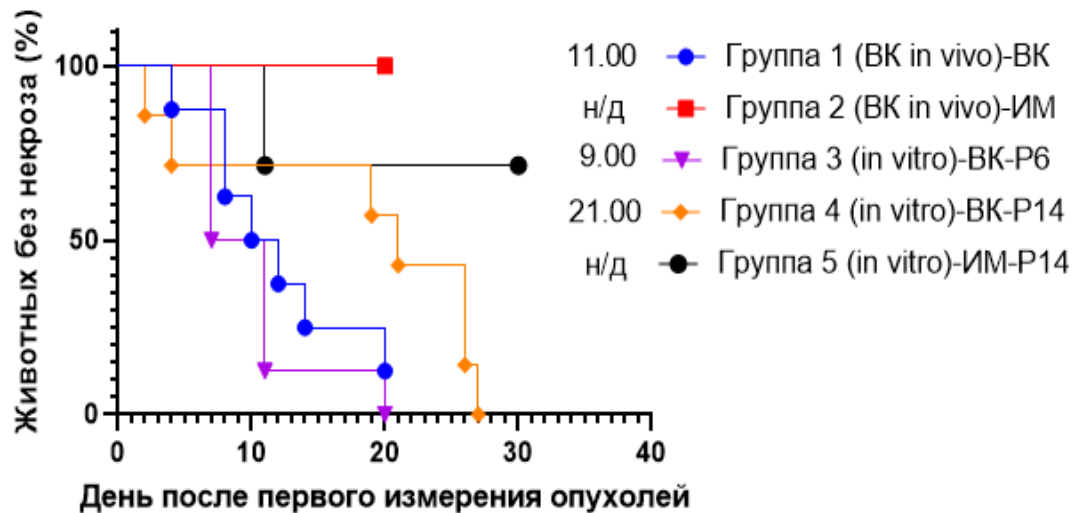
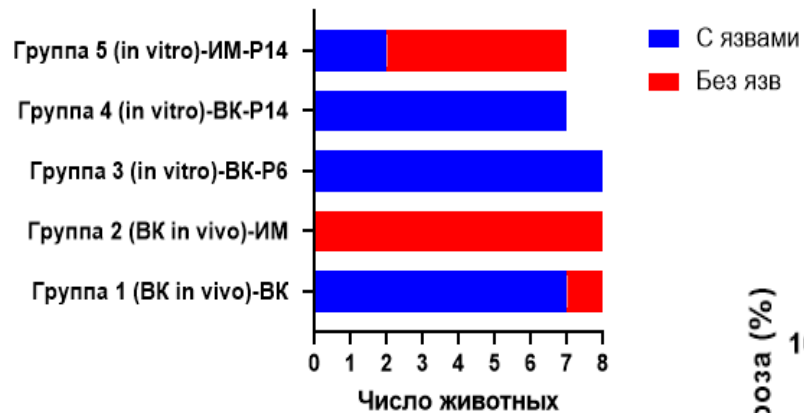


By using a caliper, one will measure width and length of the tumor and then calculate the volume using a standard formula, such as  $\pi/6 \times W \times W \times L$  or  $1/2 \times W \times W \times L$  thus assuming a standard and constant shape of the tumor.

# Кинетика роста



# Частота изъязвлений (некрозов)





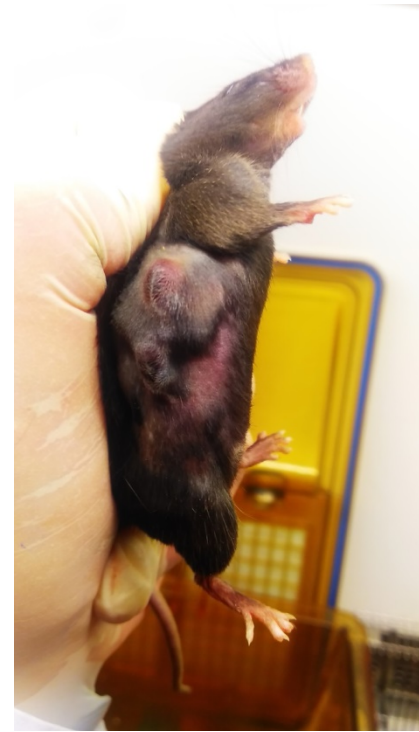
# Макроскопический вид опухоли: внутрикожная трансплантация



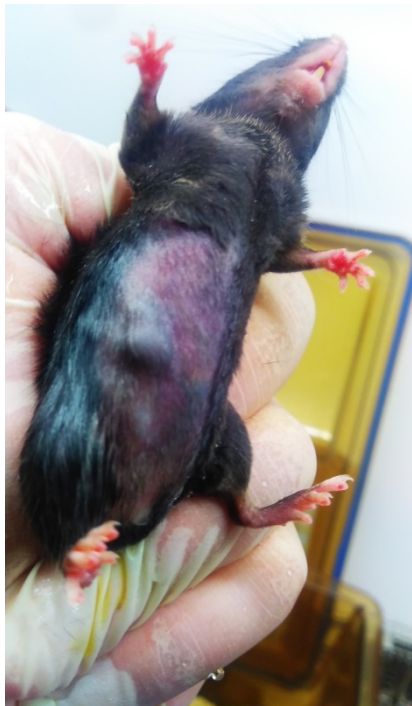
6 день



14 день



# Макроскопический вид опухоли: интрамаммарная трансплантация

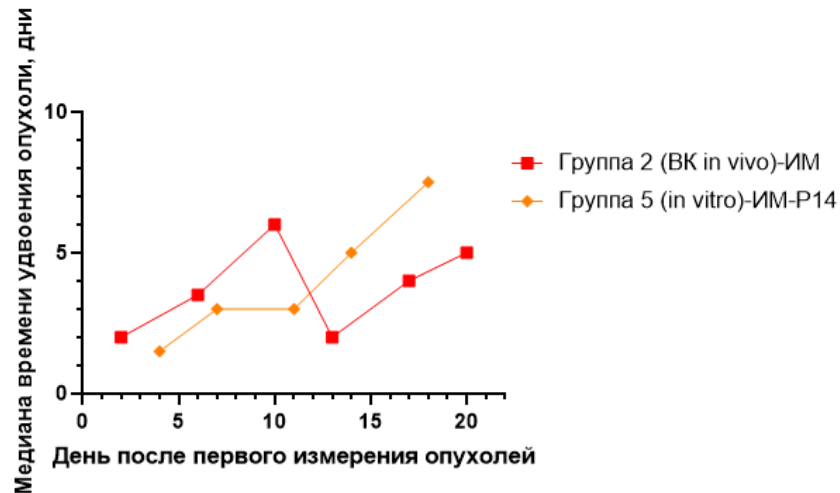
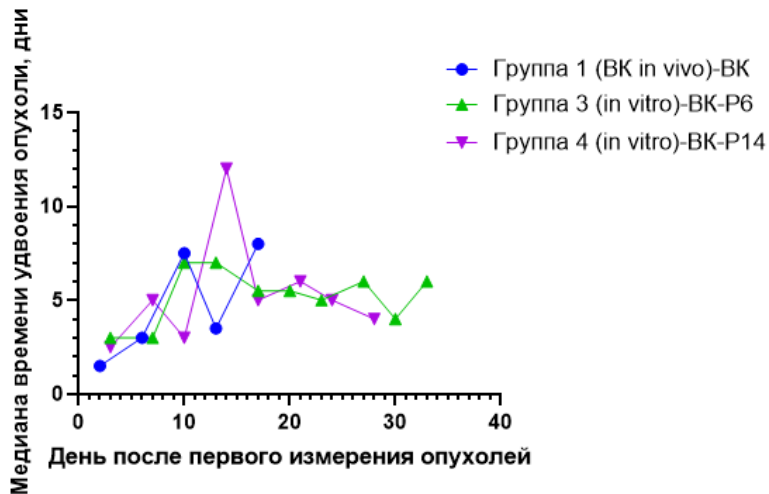


**14 день**



**21 день**

# Время удвоения объема опухолей (динамика)



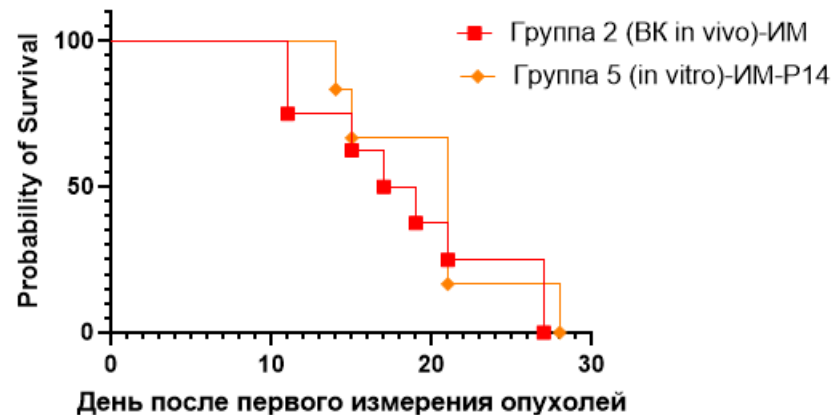
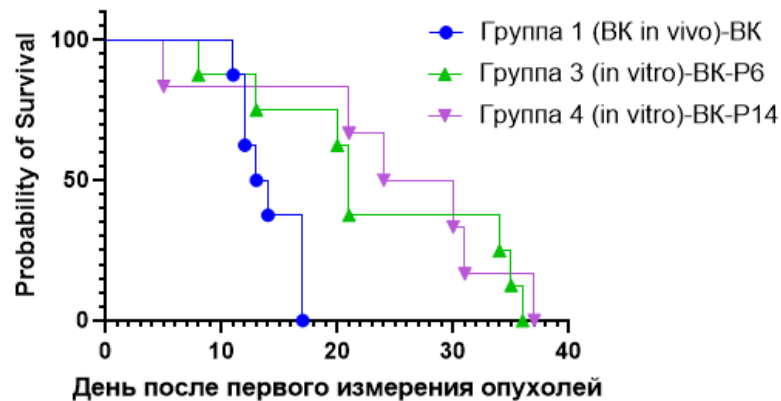
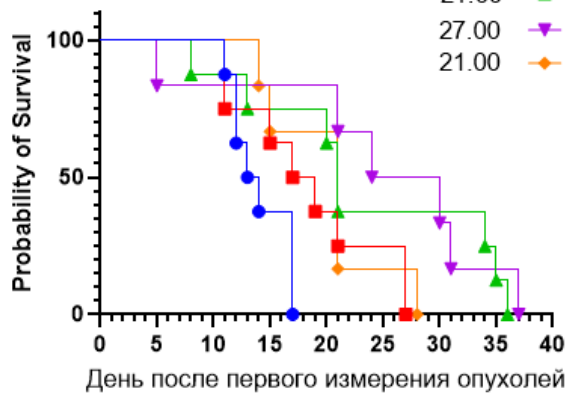
←  
волны некроза и ангиогенеза  
→

***Внутрикожная опухоль растет как между двумя пластинами органического стекла.  
Пространство для быстро растущей опухоли очень ограничено!***

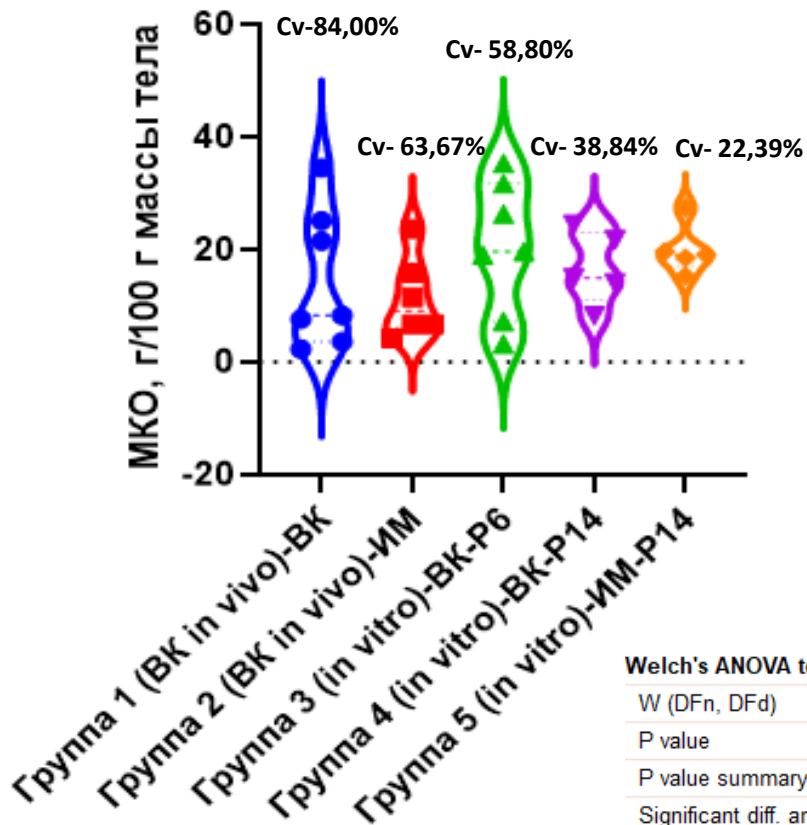
# Общая выживаемость

Медиана ОВ, дни

- 13.50 ● Группа 1 (BK in vivo)-BK
- 18.00 ■ Группа 2 (BK in vivo)-ИМ
- 21.00 ▲ Группа 3 (in vitro)-BK-P6
- 27.00 ▼ Группа 4 (in vitro)-BK-P14
- 21.00 ◆ Группа 5 (in vitro)-ИМ-P14



# Массовый коэффициент опухолей на аутопсии



Группа	95% ДИ (bootstrap, N=1000)
Группа 1 (BK <u>in vivo</u> )-BK	6,4-22,6
Группа 2 (BK <u>in vivo</u> )-ИМ	6,1-16,5
Группа 3 (in vitro)-BK-P6	11,0-29,7
Группа 4 (in vitro)-BK-P14	11,0-22,5
Группа 5 (in vitro)-ИМ-P14	16,7-23,6

\*

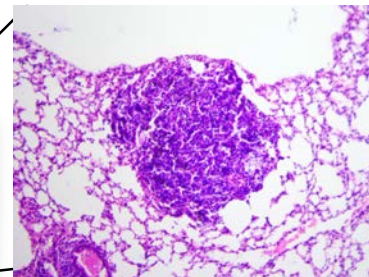
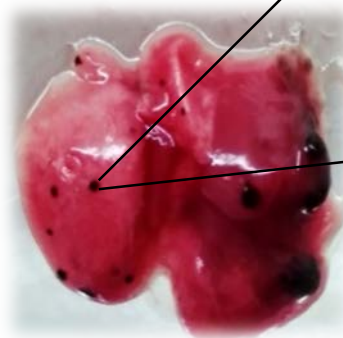
## Welch's ANOVA test

W (DFn, DFd)	1.405 (4.000, 12.35)
P value	0.2891
P value summary	ns
Significant diff. among means (P < 0.05)	No

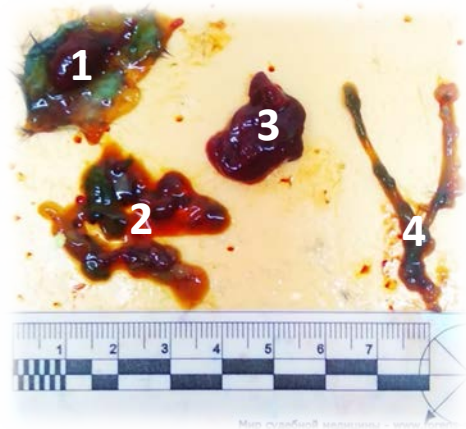
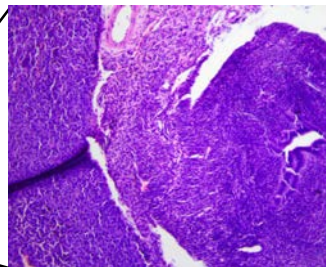
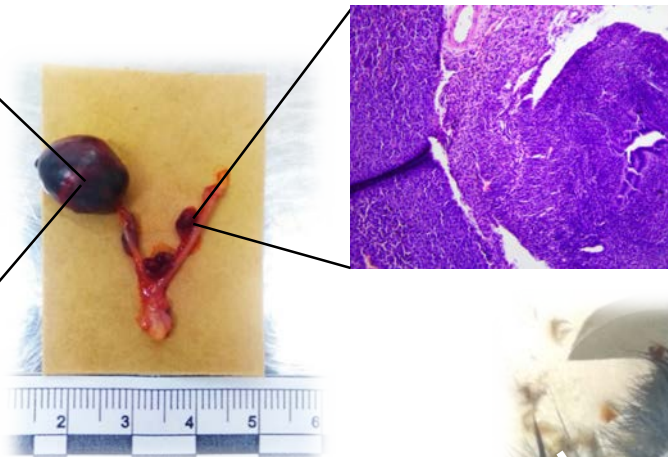
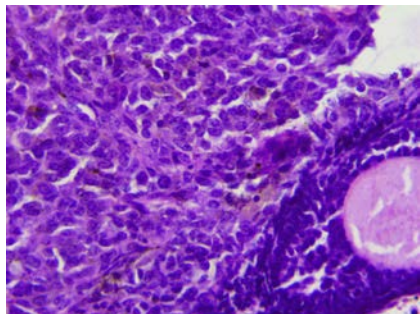
## Характер метастатического поражения

Группа	Локализация мтс	Частота
in vivo (внутрикожная опухоль) – <b>в/к</b>	Макроскопически мтс не выявлены ни у одного животного!	
in vivo (внутрикожная опухоль) – <b>и/м</b>	мтс в легкое (макроскопические)	3/8 (первый случай - <b>21 день после первого измерения</b> )
	Брыжейка кишечника, ворота печени, парагонадная клетчатка	5/8
	Яичник	1/8
опухолевые клетки из первичной культуры, культивированные in vitro – <b>P6 – в/к</b>	мтс в легкое (макроскопические)	4/8 ( <b>21 день после первого измерения</b> )
	Поражение двух аксиллярных лимфоузлов со стороны растущей внутрикожной опухоли	1/8
опухолевые клетки из первичной культуры, культивированные in vitro – <b>P14 – в/к</b>	мтс в легкое (макроскопические)	3/6 (первый случай - <b>21 день после первого измерения</b> )
опухолевые клетки из первичной культуры, культивированные in vitro – <b>P14 – и/м</b>	Брыжейка кишечника, ворота печени, парагонадная клетчатка	1/6
	мтс в легкое (макроскопические) – <b>нет</b> , но у 3 из 6 – злокачественный плевральный выпот	
	мтс в паратрахеальные л/у	2/6

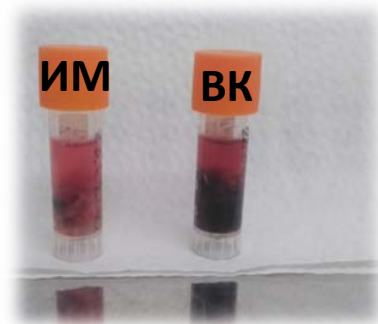
# Находки на аутопсии



# Находки на аутопсии



- 1- первичный опухолевый узел
- 2 – узлы в брыжейке
- 3 - конгломерат в воротах печени
- 4 – мтс в парагонадной клетчатке





# Геморрагический плевральный выпот

Группа 2 (BK in vivo)-ИМ

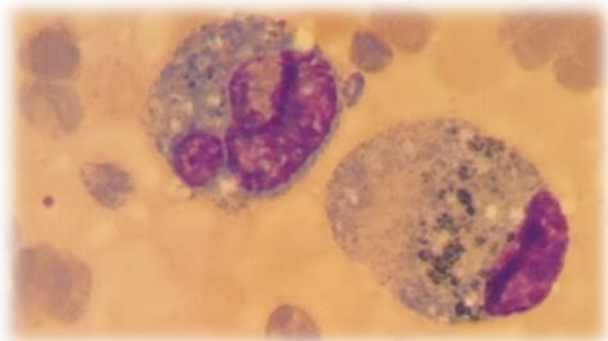
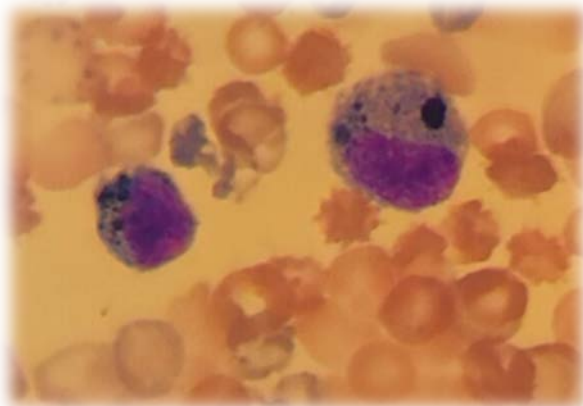
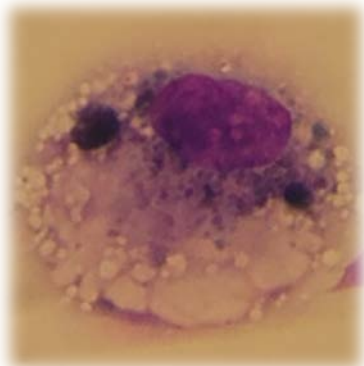
4/8 (50%)

Группа 4 (in vitro)-BK-P14

1/6 (17%)

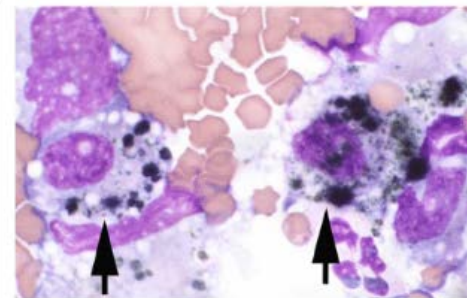
Группа 5 (in vitro)-ИМ-P14

3/6 (50%)

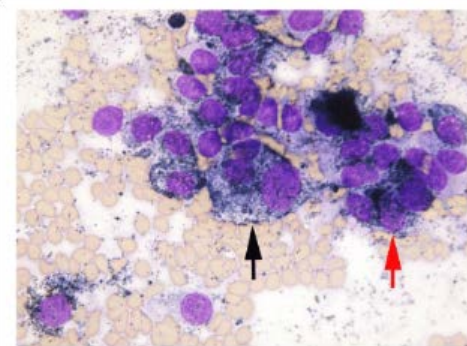


## Malignant melanoma in a grey horse: case presentation and review of equine melanoma treatment options

Lucy VA Metcalfe<sup>1\*</sup>, Peter J O'Brien<sup>2</sup>, Stratos Papakonstantinou<sup>3</sup>, Stephen D Cahalan<sup>4</sup>, Hester McAllister<sup>1</sup> and Vivienne E Duggan<sup>1</sup>



**Figure 2** Cytospin preparation of pleural fluid showing pigmented vacuolated cells, likely melanophages (arrows).



**Figure 3** Fine needle aspirate smear. There are multiple cytological criteria of malignancy: anisokaryosis (black arrow), nuclear moulding (red arrow).

# Иммунофенотипирование опухолей меланомы В16

- Проведена попытка оценки иммунного инфильтрата В16 после пробоподготовки двумя методами: 1. с обработкой аккутазой и получением суспензии на клеточных ситах (100 мкм); 2. без обработки аккутазой.
- При корректном гейтировании удаётся выделить из клеточной популяции следующие клетки и использовать для оценки присутствия соответствующих популяций лимфоцитов в опухолевой ткани:
  - Т-лимфоциты (общая популяция) - CD45+CD3+
  - Т – клетки памяти (CD45+CD3+CD8-CD4-) CD44+ CD62L-
  - Цитотоксические Т-лимфоциты - (CD45+CD3+)CD8+CD4- субпопуляции:
  - CD8+ эффекторные Т-лимфоциты (CD45+ CD3+ CD8+CD4-) CD44- CD62L-
  - CD8+ (Цитотоксические) Т–клетки памяти (CD45+ CD3+ CD8+) CD44+ CD62L-
  - Т – хелперы (CD45+CD3+CD8-)CD4+ субпопуляции
  - CD4+ эффекторные Т-хелперы - (CD45+ CD3+ CD4+) CD44- CD62L-
  - CD4+ Т–клетки памяти (CD45+ CD3+CD4+) CD44+ CD62L-
  - *В исследованном материале не удалось выявить CD62L+ и CD19+ клеток:*
    - В–лимфоциты - CD45+ CD19+
    - CD8+ Наивные Т – лимфоциты (CD45+CD3+CD8+CD4-) CD44-CD62L+
    - CD4+ Наивные Т – лимфоциты (CD45+CD3+CD8-CD4+) CD44-CD62L+ - отсутствуют
    - Т-регуляторные клетки - (CD45+ CD3+ CD8- CD4+) CD62L+ CD25++
  - ***Количество живых клеток в полученном материале после дезагрегации и промывки не превышало в образцах 6-8% от общего количества клеток.***
- При необходимости замораживания опухолевой материал для исследования должен быть переведён в форму клеточной суспензии (а не целых фрагментов!) до обработки ДМСО.



## Резюме...

- Клональная архитектура исходной клеточной суспензии меланомы B16 включала субклон B16F10, который в исходном фрагменте не являлся доминантным
- *На конкретном примере продемонстрирована теория клональной эволюции опухоли в результате селекции субпопуляций клеток in vivo и in vitro, обладающих разным фенотипом.*
- **Трансплантация суспензии (фрагментов) первичной опухоли от мыши-донора мыши-реципиенту** – промежуточный шаг между сингенными и PDX моделями. *Данный протокол обеспечивает канцерогенез, который напоминает прогрессирование **аутохтонных** опухолей, благодаря сохранению микроокружения (включая иммунные клетки).*
- Техника изографтов может быть использована для отбора и генерационной амплификации агрессивных клонов (метастазирование) или получения резистентных к определенной терапии опухолей.
- ИФТ опухолей должно выполняться для опухолей без некроза и у животных, находящихся не в терминальном состоянии. Следует увеличить количество животных в группах, если предполагается ИФТ опухолей. «Окно» для проведения ИФТ опухолей определяется эмпирически. *Для ИФТ предпочтительнее использовать свежий опухолевый материал!*
- Для трансплантации сингенных штаммов рекомендуется использовать клетки с низким числом пассажей. Однако не понятно, что подразумевается под низким числом: не более **10–20** [The European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), в то время как в медицинских и фармацевтических учреждениях существуют общие рекомендации или число пассажей ограничено **максимум пятью** [USP 36-NF 31 <51>] – *подход как в микробиологии!*
- Доклиническая оценка in vivo эффективности противоопухолевых агентов не должна ограничиваться только трансплантацией иммортализованных коммерческих клеточных линий, выросших «на пластике». Необходима комплексная и целостная доклиническая платформа: **гистокультуральный анализ чувствительности к лечению ex vivo (HDSA) – аутохтонные модели - изографт - PDX.**



**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!**

