

УДК: 616-006.487-08:[616-097.1:597.321

Д. В. ЛУЦКОВИЧ<sup>1</sup>, А.-М. В. ЕРОФЕЕВА<sup>2</sup>, М. А. КОРНЕЕВА<sup>2</sup>, А. В. КЛЫЧ<sup>1</sup>,  
С. В. МАНЬКОВСКАЯ<sup>2</sup>, А. Н. МЕЛЕШКО<sup>1</sup>

## СИНГЕННАЯ МОДЕЛЬ НЕЙРОБЛАСТОМЫ

<sup>1</sup> Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии, иммунологии и иммунологии», Боровляны, Республика Беларусь

<sup>2</sup> Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Целью исследования было создание сингенной модели нейробластомы (НБ) с возможностью таргетирования *GD2* и *V7H3*. В экспериментах мышам линии A/J (12 самцов и 12 самок) проводили подкожное введение трансгенных вариантов *GD2+* клеточной линии мышинной нейробластомы *NXS2* в количестве 1,5 и 2 млн. клеток, а также 1,5 млн. клеток *NXS2*, трансдуцированных геном человеческого белка *hV7H3*. Для оценки динамики роста раз в 5 дней измеряли объем опухоли с помощью цифрового калипера, производили прижизненную съемку на визуализаторе люминисценции *IVIS*, проведена гистологическая оценка первичного очага опухоли. Полученная модель мышинной нейробластомы пригодна для экспериментального лечения, подразумевающего таргетирование мишеней *GD2* и *V7H3*.

*Ключевые слова:* нейробластома, сингенная модель, лентивирусная трансдукция.

**Введение.** Оценка эффективности и безопасности фармакологических средств, а также новых методов лечения невозможна без воспроизводимых экспериментальных моделей *in vivo*, обеспечивающих приемлемую предсказуемость результатов доклинических испытаний для дальнейших клинических исследований. На сегодняшний день в экспериментальной онкологии преимущественно используют мышинные модели, которые представлены следующими вариантами: по локализации – подкожные, внутрибрюшинные, ортотопические (в месте первоначального развития); по источнику опухоли – спонтанные, сингенные (с использованием мышинной клеточной линии), ксенографтные (имплантация культуры опухолевых клеток человека иммунодефицитным мышам) [1]. Сингенные модели наиболее доступные и удобные для экспериментальных работ. Они позволяют не только провести первичную оценку эффективности фармакологических свойств исследуемых агентов, но и тестировать новые подходы к локальному лечению онкозаболевания, изучать взаимодействие опухоли с микроокружением, её биологию роста.

Нейробластома (НБ) – самая распространенная экстракраниальная солидная опухоль у детей. На долю нейробластомы приходится 8–10 % всех педиатрических онкологических заболеваний. Частота встречаемости составляет 0,9–1,1 случая на 100 000 детей в возрасте 0–14 лет [2, 3]. Лечение пациентов с нейробластомой высокой группы риска продолжает оставаться серьезной проблемой; в этой группе 5-летняя выживаемость составляет около 38–45 % [4]. Характерными поверхностными маркерами нейробластомы являются дисиагоганглиозид *GD2* и белок *V7H3* [5, 6].

Целью данной работы явилось создание сингенной модели нейробластомы с возможностью таргетирования *GD2* и *V7H3*.

**Материалы и методы исследования.** Экспериментальные исследования выполнены на самках (n=15) и самцах (n=15) мышей линии A/J в возрасте 6–8 недель, содержащихся в условиях конвенционального вивария Института физиологии НАН Беларуси. Все мыши (n=30) содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище и циклом день/ночь 12/12 ч. Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике при Институте физиологии НАН Беларуси (протокол №1 от 02 февраля 2022 г.).

Ген фермента биолюминесценции люцефифразы светлячка (*Luc*) был клонирован из плазмиды *pT7luc* (получена из коллекция Института микробиологии НАН Беларуси) в лентивирусный вектор *pUltra* во втором положении после зеленого флуоресцентного белка (от англ. Green Fluorescent Protein; *GFP*) через 2-А пептид по сайтам рестрикции *BamHI:Sall*.

Полноразмерная кДНК длинной изоформы *4Ig* гена *B7-H3* (*CD276*) была амплифицирована из общей кДНК образца нейробластомы и клонирована в вектор *pWPXL* по сайтам *BamHI:EcoRI* (рис. 1).

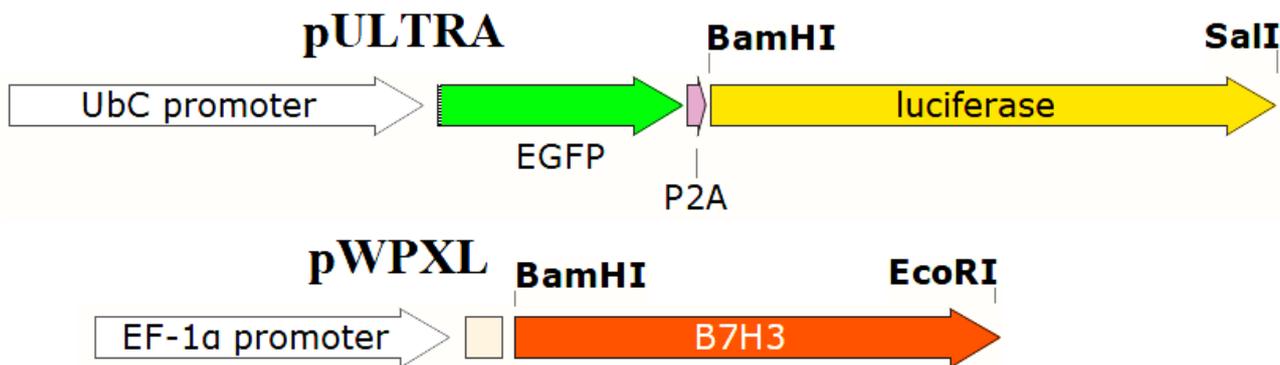


Рис. 1. Lentiviralные вектора pUltra с экспрессионной касетой GFP - Luc и pWPXL с B7-H3

GD2+клеточная линия мышиной нейробластомы NXS2 предоставлена проф. Лоде (Грейфсвальд, Германия) [7]. Клетки NXS2 культивировали в питательной среде DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 1 % антибиотика/антимикотика. Опухолевые клетки NXS2 были трансдуцированы концентрированными лентивирусными частицами, содержащими высокий титр VSVG-псевдотипированных pUltra\_GFP-Luc и pUltra\_B7H3 с добавлением 6 мкг/мл полибрена. Псевдотипированные лентивирусные частицы были получены путем котрансфекции клеток HEK293T. Экспрессия GFP и B7H3 была подтверждена проточной цитометрией (рис. 2). Окраска белка B7H3 выполнена антителом CD276 (BD, США).

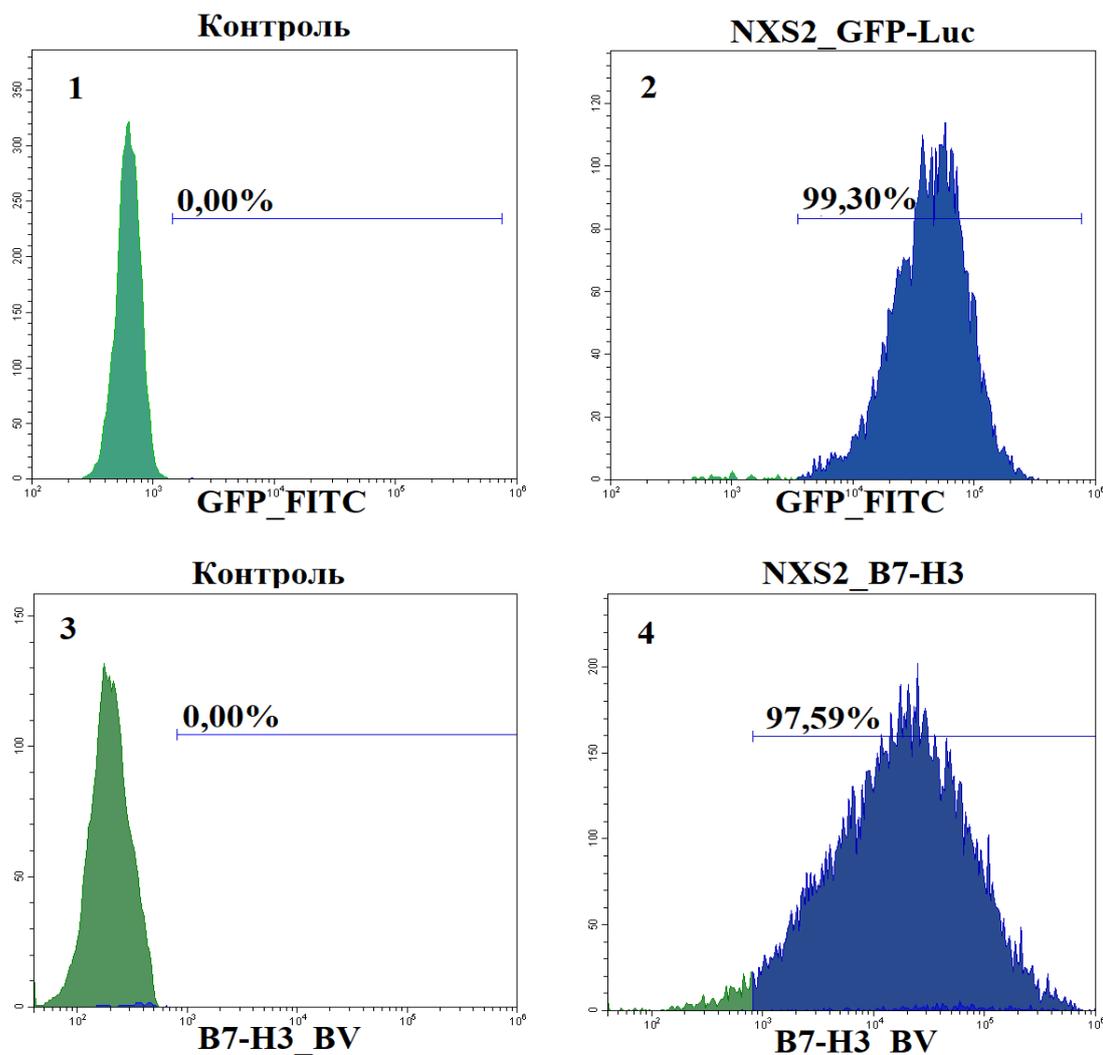


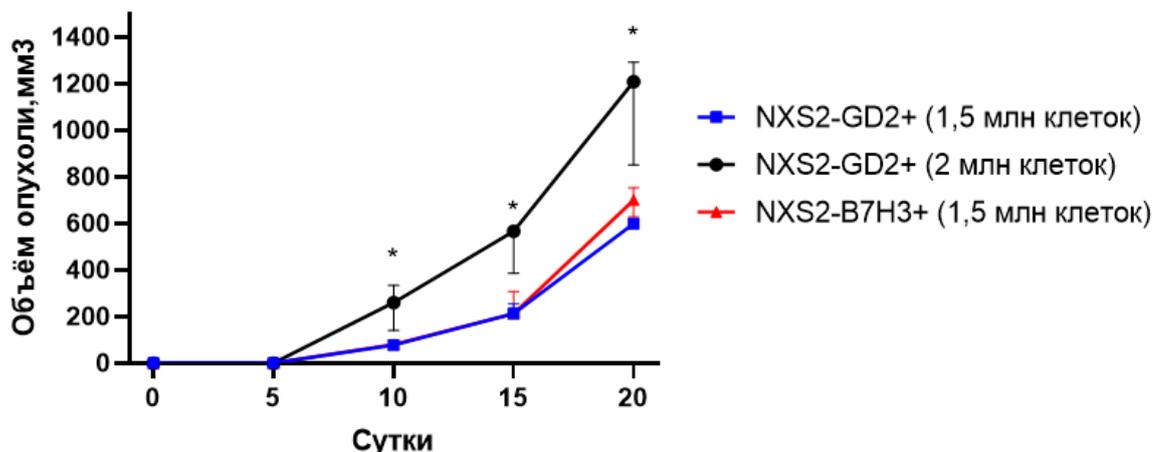
Рис. 2. Оценка уровня трансдукции клеточной линии NXS2. 1 и 3 – контроль (клетки NXS2 без трансдукции). 2 и 4 - трансдуцированные клетки

Приживление опухоли проводили однократно в область бедра путем подкожной инъекции клеточной суспензии в 100 мкл фосфатно-солевого буфера: группа 1 – NXS2\_GFP-Luc в дозе  $1,5 \times 10^6$  клеток ( $n=8$ ), группа 2 – NXS2\_GFP-Luc в дозе  $2,0 \times 10^6$  клеток ( $n=8$ ) и группа 3 – NXS2\_B7H3 в количестве  $1,5 \times 10^6$  клеток ( $n=8$ ). Контрольная группа без приживления опухоли составила 6 (3 самца и 3 самки) животных. Для оценки динамики роста раз в 5 дней измеряли объем опухоли (ширина  $\times$  длина  $\times$  ширина  $\times$   $\pi/6$ ) с помощью цифрового калипера, а также производили прижизненную съемку животных на визуализаторе IVIS (PerkinElmer, США) под ингаляционным наркозом (смесь изофлуран-кислород) через 15 мин после внутривентриального введения люциферина.

На 10-е и 20-е сутки после введения клеточных суспензий для изучения морфологической характеристики привитой опухоли выполнен забор мягких тканей области инокуляции опухолевых клеток. На вскрытии проводили макроскопическую оценку опухоли (измерение диаметра первичного опухолевого узла и визуальный осмотр органов на наличие выраженных метастазов). Иссеченные опухолевые узлы и внутренние органы (печень, легкие) фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов. Далее фрагменты опухоли и органов подвергались гистологической проводке в вакуумном аппарате (Keede, Китай), а затем заливались в парафин. С парафиновых блоков с помощью ротационного микротома CUT5062 (Slee Medical, Германия) готовили срезы толщиной 3 мкм и наносили их на предметные стекла с силанизированным адгезивным покрытием. После депарафинирования микропрепараты окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином для получения обзорной окраски. Полученные окрашенные препараты исследовали с помощью микроскопа Ortec ВК 5000 с фотокамерой и программным обеспечением. Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism для Windows (GraphPad Software, La Jolla, США). Данные сравнивали критерием Манна-Уитни. Статистически значимыми различия принимали при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Общее состояние и поведение животных на ранних сроках после имплантации суспензии клеточной линии мышинной нейробластомы NXS2 носили нормальный характер. Все животные были активны, подвижны, реагировали на раздражители, охотно поедали корм и потребляли воду. Статистически значимых различий по массе тела, потреблению пищи и воды не зафиксировано.

При введении  $1,5 \times 10^6$  клеток на 9–10 сутки появились первые признаки развития опухолевого процесса с доступным для измерения первичным очагом, который изначально не пальпировался. При введении  $2,0 \times 10^6$  клеток формирование опухоли начиналось на 1–3 дня раньше, т.е. на 7–9-е сутки. В данной группе отмечали наиболее выраженный рост первичного очага опухоли относительно других групп исследования (рис. 4).

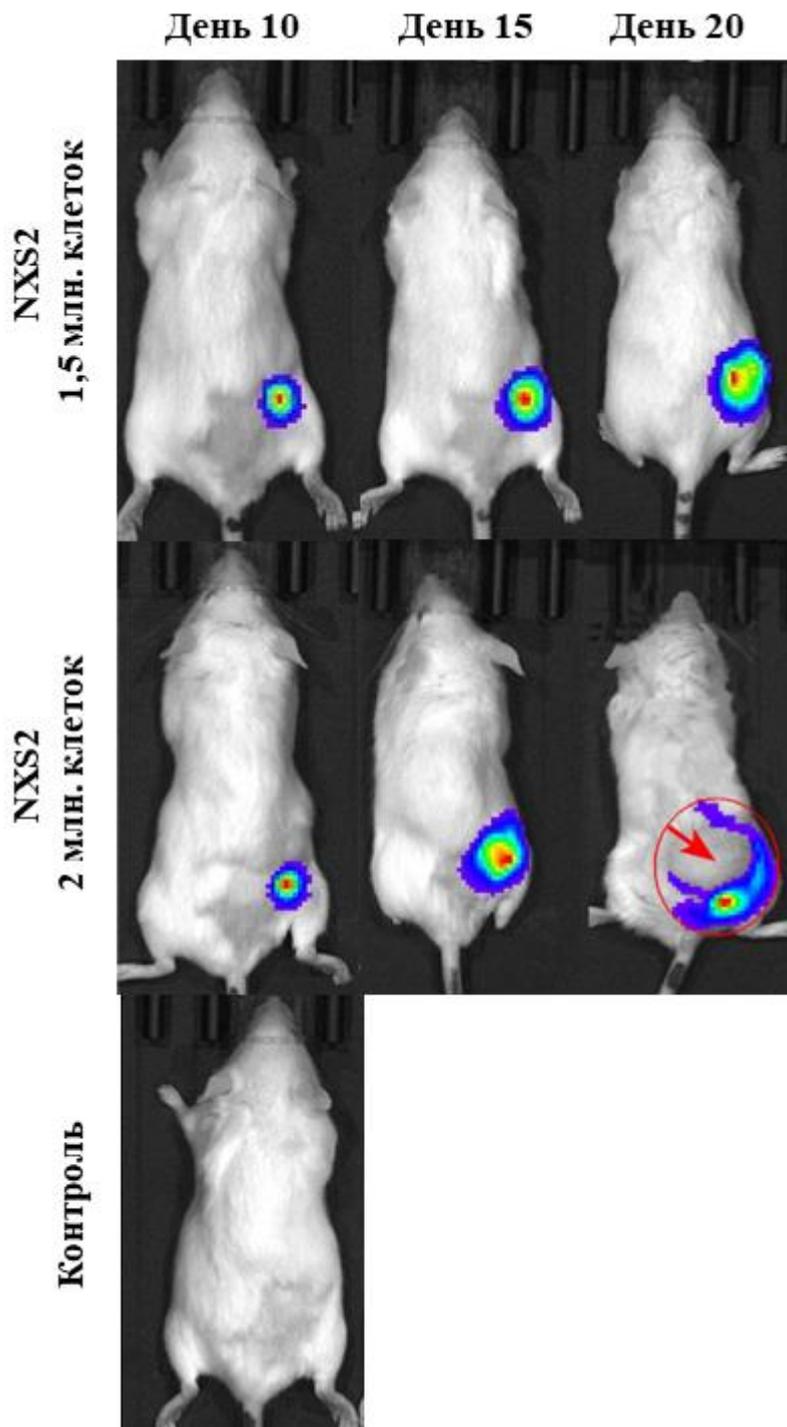


**Рис. 4.** Динамика роста опухоли у мышей A/J после имплантации опухолевых клеток NXS2, экспрессирующих GD2 и B7H3. Данные представлены в виде медианы, 25-го и 75-го процентилей; \* –  $p < 0,05$  по сравнению с введением  $1,5 \times 10^6$  клеток (критерий Манна-Уитни)

На 20-е сутки после инъекции суспензии клеточной линии мышинной нейробластомы NXS2 в

группе 1 опухоль не прижилась у 1 (12,5 %) мыши; в группе 2 – у 2 (25,0 %); в группе 3 – у 1 (12,5 %). После имплантации  $1,5 \times 10^6$  клеток NX2, экспрессирующих как GD2, так и B7H3, динамика изменения объемов первичного очага опухоли была одинаковой, достоверных различий между данными группами не обнаружено.

Визуализация люминисценции первичного очага опухоли после имплантации опухолевых клеток NX2, экспрессирующих GD2, продемонстрирована на рис. 5.

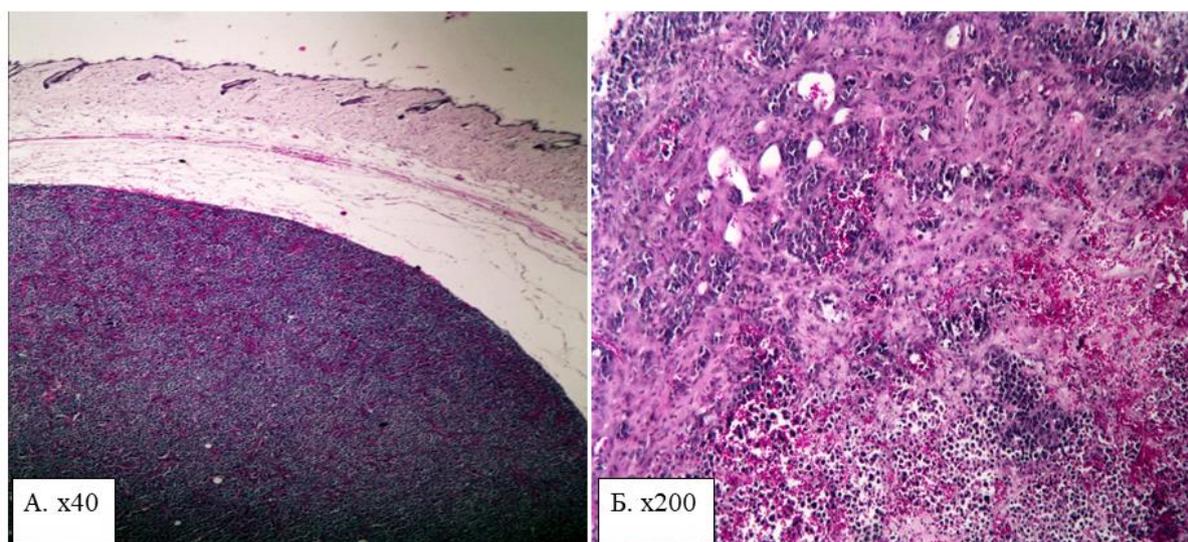


**Рис. 5.** Прижизненная детекция опухолевого очага по уровню интенсивности свечения люциферазы. Стрелкой указан очаг формирования некроза

Статистически достоверной разницы в размерах новообразования в зависимости от пола животного не установлено. После введения  $2,0 \times 10^6$  клеток NXS2 наблюдали наиболее интенсивную люминисценцию опухолевого очага, однако к 20 суткам эксперимента очаг опухоли частично утратил люминисценцию за счет формирования некроза. Таким образом, доза  $2,0 \times 10^6$  клеток при

длительности эксперимента более 20 дней является избыточной, и целесообразно использовать дозу  $1,5 \times 10^6$  клеток.

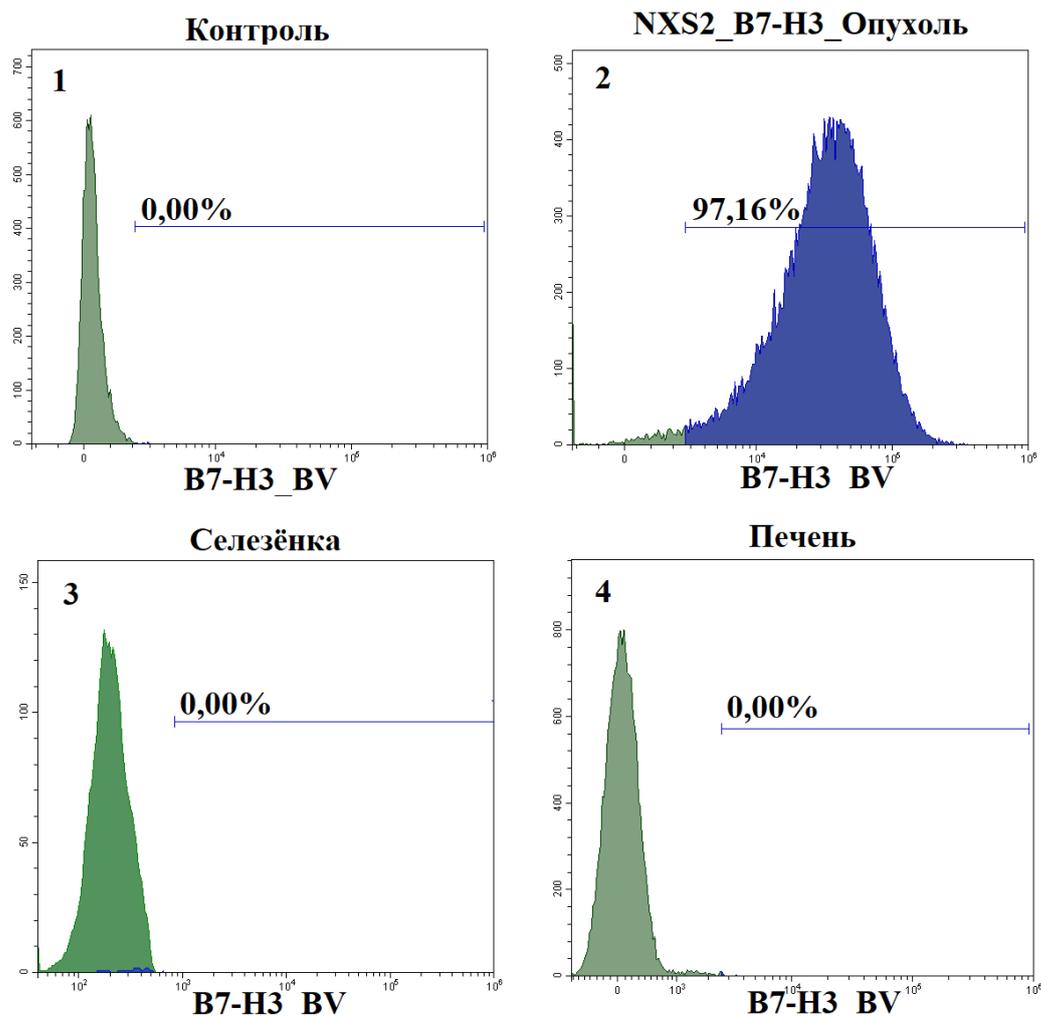
На 10-е и 20-е сутки после инъекции суспензии клеточной линии мышинной нейробластомы NXS2 в дозе  $1,5 \times 10^6$  клеток в большинстве случаев ( $n=6$ ; 75 %) при макроскопическом исследовании выявляли хорошо пальпируемое новообразование в зоне подкожной инъекции в правое бедро задней конечности. Опухолевый узел плотной консистенции, выраженной шарообразной формы, местами с темными участками некроза и/или кровоизлияния. Микроскопически солидный узел представлял собой бесструктурную ткань с плотной концентрацией клеток с признаками выраженной атипии и полиморфностью (рис. 6, А). Также наблюдали опухолевые клетки с фигурами митоза и клетки, в ядрах которых хроматин распределен диффузно в виде мелких зерен. Среди массы опухолевых клеток определялись тонкие фиброзные перегородки и многочисленные тонкостенные сосуды, площадь некроза незначительная – менее 5 % площади опухоли, воспалительная инфильтрация – скудная. Отмечался инвазивный рост опухолевых клеток в подлежащую мышечную ткань. После инъекции суспензии клеточной линии мышинной нейробластомы NXS2 в дозе  $2,0 \times 10^6$  клеток сформированный опухолевый узел характеризовался обширными участками некроза, на долю которых приходилось более 50 % ткани (рис.6, Б).



**Рис. 6.** Гистологическая картина сформированного опухолевого узла после подкожной имплантации клеток нейробластомы линии NXS2. Примечание: А –  $1,5 \times 10^6$  клеток; Б –  $2,0 \times 10^6$  клеток

Таким образом, характерными чертами нейробластомы NXS2 является узловый характер роста, опухоль сформирована гомогенной массой атипичных клеток с тонкими фиброзными волокнами и высокой степенью васкуляризации.

Экспрессия *V7H3* в опухоли, имплантированной мышам группы 3, проверена на 15-е сутки эксперимента методом проточной цитометрии (рис. 7).



**Рис. 7.** Проверка экспрессии *B7H3* в опухоли и органах мыши. 1 – отрицательный контроль; 2 – опухолевые клетки от мыши; 3 – печень мыши с привитой опухолью; 4 – селезенка мыши с привитой опухолью

**Заключение.** Была получена сингенная модель прививаемой опухоли нейробластомы NXS2. Трансгенные клеточные линии мышинной нейробластомы NXS2 с гетерологичной экспрессией *Luc* и *hB7H3* позволяют создать экспериментальную модель опухолевого процесса с оптимальной динамикой роста опухоли в течение более 20 дней после прививания опухоли. Полученная модель мышинной нейробластомы пригодна для экспериментального лечения, подразумевающего таргетирование мишеней GD2 и B7H3. По совокупности изученных морфологических параметров оптимальным периодом для проведения специального противоопухолевого лечения является 11–13 день с момента прививки злокачественных клеток.

#### Литература:

- [1] Bokova E.V., Tretyakova U.A., Shchegoleva M.S., Denisov A.A. In vivo model systems for research in oncology // *Advances in Molecular Oncology*. 2023. Vol. 10, № 2. P. 8–16.
- [2] Luksch R., Castellani M.R., Collini P. et al. Neuroblastoma (Peripheral neuroblastic tumours) // *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016. Vol. 107. P. 163–181.
- [3] van Heerden J., Abraham N., Schoeman J. et al. Reporting Incidences of Neuroblastoma in Various Resource Settings // *JCO Glob. Oncol*. 2021. №. 7. P. 947–964.
- [4] Shimada H. Tumors of the neuroblastoma group // *Pathology (Phila)*. 1993. Vol. 2. P. 43–59.
- [5] Anderson J., Majzner R. G., Sondel P.M. Immunotherapy of Neuroblastoma: Facts and Hopes // *Clin. Cancer Res*. 2022. Vol. 28. № 15. P. 3196–3206.
- [6] Kholodenko I.V., Kalinovskiy D.V., Doronin I.I. et al. Neuroblastoma Origin and Therapeutic Targets for Immunotherapy // *J Immunol Res*. 2018. Vol. 2018. P. 7394268.
- [7] Neal Z.C., Yang J.C., Rakhmilevich, A.L. et al. Enhanced activity of hu14.18-IL2 immunocytokine against murine NXS2 neuroblastoma when combined with interleukin 2 therapy // *Clin. Cancer Res*. 2004. Vol. 10. № 14, P. 4839–4847.

D. V. LUTSKOVICH<sup>1</sup>, A-M. V. EROFEEVA<sup>2</sup>, M. A. KORNEEVA<sup>2</sup>, H. V. KLYCH<sup>1</sup>, S. V. MANKOVSKAYA<sup>2</sup>,  
A. N. MELESHKO<sup>1</sup>

### SYNGENIC MODEL OF NEUROBLASTOMA

<sup>1</sup> State Institution "Republican Scientific and Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology,  
Immunology and Immunology", Borovlyany, Republic of Belarus

<sup>2</sup> State Scientific Institution "Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus", Minsk,  
Republic of Belarus

#### Summary

The aim of the study was to establish a syngeneic model of neuroblastoma (NB) with the ability to target *GD2* and *B7H3*. Syngeneic mice of the A/J line (12 males and 12 females) were subcutaneously engrafted with transgenic *GD2*+ variants of the murine neuroblastoma cell line *NXS2* at a dose of 1.5 and 2 million cells, and 1.5 million *NXS2* cells transduced with human *hB7H3* protein gene. To evaluate the growth dynamics, tumor volume was measured every 5 days using a digital caliper, and vestibular imaging was performed on an IVIS imager, as well as histology of was assessed. To study the morphological characteristic of the grafted tumor, the animals were autopsied on the 10th and 20th days. The obtained murine neuroblastoma model is suitable for experimental treatment implying targeting of *GD2* and *B7H3* targets.

*Key words:* neuroblastoma, syngeneic model, lentiviral transduction.