

КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА И ИХ КСЕНОГРАФТЫ С МУТАЦИЯМИ BRAF ИЛИ NRAS В КАЧЕСТВЕ МИШЕНЕЙ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ. ОБЗОР

И.Н. Михайлова, Е.М. Трещалина, Л.Ф. Морозова, Н.В. Андропова, И.Ж. Шубина, А.А. Лушникова
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Ирина Николаевна Михайлова irmikhaylova@gmail.com

В обзоре представлен свод статей и патентов, описывающих новые модели пигментированной или амеланотической меланомы кожи человека *in vitro* и *in vivo*, полученные в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России из метастазов пациентов. Помимо фактического материала, в обзоре обсуждаются молекулярно-генетические особенности новых моделей меланомы кожи, охарактеризованных как тест-системы для предклинических исследований. Объекты, описанные в публикации – 3 поликлональные клеточные линии, 2 субклона и 4 подкожных ксенографта у иммунодефицитных мышей *Balb/c nude*. Все модели хранятся в криобанке НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, а клеточные линии также в Российской коллекции культур клеток позвоночных (Санкт-Петербург). Эта мини-коллекция предназначена для фундаментальных исследований меланомы кожи и доклинических испытаний антимеланомных средств. Основанием для этого служат адекватные цитологические, иммунологические, трансплантационные и молекулярно-генетические характеристики моделей, а также их лекарственная чувствительность *in vivo* к соответствующей таргетной терапии.

Ключевые слова: мини-коллекция, меланома человека, культура клеток, ксенографты, мутации

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-27-35

CELL LINES OF HUMAN MELANOMA AND THEIR XENOGRAFT WITH BRAF OR NRAS MUTATIONS A TARGETS FOR TARGETED THERAPY. REVIEWS

I.N. Mikhaylova, E.M. Treshalina, L.F. Morozova, N.V. Andronova, I.Zh. Shubina, A.A. Lushnikova

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

The review presents a discussion on articles and patents, describing new *in vitro* and *in vivo* models of pigmented or non-pigmented human cutaneous melanoma, received in NMRCO from the patients» metastases. Molecular genetic characteristics of the new models is supported by the arguments in addition to the given data and visual materials. The subjects of the discussed publications are 3 polyclonal cell lines, 2 subclones and 4 subcutaneous (s/c) xenografts in immunodeficient mice *Balb/c nude*. All the models are stored in Cryo Collection with xenografts at N.N. Blokhin NMRCO as well as in the Russian Collection of Cell Cultures of Vertebræ (RCCCV, St. Petersburg). This mini-collection is recommended for use in basic research of cutaneous melanoma and pre-clinical studies of anti-melanoma agents. The basis for these studies are the appropriate characteristics of the models, including cytological, immunologic, transplantation and molecular-genetic ones, as well as *in vivo* drug sensitivity to the corresponding target therapy.

Key words: mini-collection, human melanoma, mutation, cell culture, xenograft

Введение

Меланома кожи (МК) человека – гетерогенное по фенотипу и молекулярно-генетическим характеристикам заболевание, диссеминированная форма которого отличается чрезвычайно низкой чувствительностью к различным видам терапии [1, 2]. Приоритетом при создании моделей МК *in vitro/in vivo* остается прогрессия опухоли, развивающаяся при наличии генных мутаций, дефектные продукты которых нарушают клеточную пролиферацию, диф-

ференцировку и ингибируют апоптоз. Клинически значимые мутации – V600E/K в экзоне 15 гена *BRAF*, приводящая к гиперактивации серинтреониновой *BRAF*-киназы, и Q61R/K/H в экзоне 3 гена *NRAS*, кодирующего малую ГТФазу. Мутации *NRAS* нередко выявляются в метастазах меланомы после терапии *BRAF*-ингибиторами [2–5]. Для избирательного блокирования терапевтически значимых мутаций создан ряд таргетных препаратов. Одними из наиболее эффективных являются направленный на V600E *BRAF*

Вемурафениб (Зелбораф) и применяемый для терапии распространенной МК селективный ингибитор киназ MEK1 и MEK2 Траметиниб (Мекинист), а направленные на мутантный Q61R NRAS Пимазертиб и Биниметиниб проходят клинические испытания [6–11]. В качестве модели для изучения антимеланомных таргетных препаратов представлены клеточные линии (КЛ) или субклоны КЛ и полученные из них подкожные (п/к) ксенографты [12–22]. Создание *in vitro/in vivo* доклинической тест-системы на основе культуры клеток и ксенографтов меланомы с терапевтически значимыми мутациями способствует исследованиям механизмов развития заболевания и доклиническому изучению новых антимеланомных лекарственных средств.

В обзоре описаны стабильные КЛ пигментной и малопигментной МК, полученные из хирургически удаленных метастазов. Один из клонов полностью охарактеризован по биологическим признакам в соответствии с целью исследования. Ксенографты получали путем адаптации к росту под кожей иммунодефицитных мышей-самок Balb/c nude – клеточных линий меланомы и субклонов одной из линий, как описано ранее [23]. В качестве контроля за адаптацией использовали следующие критерии: 100 % прививочную дозу клеток на «нулевом» пассаже *in vivo*, устойчивую трансплантацию взвесью опухолевой ткани со 100 % прививаемостью при многократном пассировании *in vivo*, стабильную кинетику роста на поздних (4–9-й) пассажах *in vivo*, идентичность клеточного состава ксенографта и КЛ, верификацию мутации в опухолевой ДНК и чувствительность опухоли к таргетной терапии Вемурафенибом и другими ингибиторами сигнального пути RAS/RAF/MEK/ERK.

Клеточная линия меланомы кожи mel Cher с высоким содержанием меланина

Клеточная линия mel Cher имеет высокий митотический потенциал, стабильные цитоморфологические и культуральные характеристики, индивидуальные фенотипические особенности и мутацию V600E в экзоне 15 гена *BRAF* [24]. КЛ mel Cher депонирована в Коллекции клеточных культур института цитологии РАН РККК (П) 704Д и хранится в криобанке НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Цитоморфологически КЛ mel Cher представлена низкодифференцированными, резко полиморфными клетками с множеством гигантских уродливых форм. На цитогамме выявляется большое количество округлых, овальных, удлинённых клеток, с неправильной формой ядер. Хроматин грубоглыбчатый, ядерная оболочка утолщена и неровная, ядрышки в количестве от 1 до 6 в ядре, выраженная гиперхромия, отмечены многочисленные атипичные митозы (рис. 1).

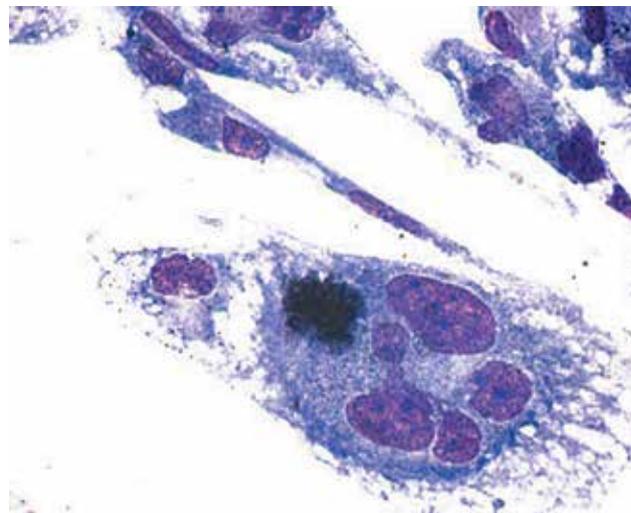


Рис. 1. Цитоморфологическая картина культуры клеток Cher/BRAF⁺ с выраженным пигментом. Окраска гематоксилином и эозином ×400

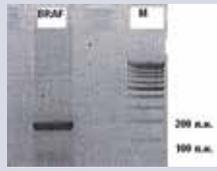
Для клеток линии mel Cher характерны различия по диаметру ядра при одинаковой плотности их окрашивания и при сходной структуре интерфазного хроматина. Цитогенетический анализ 25 метафаз показал, что число хромосом колеблется от 85 до 92, модальное число соответствует тетраплоидному набору (4n). В кариотипе обнаружена делеция короткого плеча хромосомы 4 (p12-pter), транслокация длинных плеч хромосомы 7 с образованием изохромосомы, дополнительный хромосомный материал неизвестного происхождения на коротком плече хромосомы 9 в районе 9p21. Суммарный кариотип КЛ mel Cher: 85~92<4n>, XXYY, del (4) (p12), i (7) (q10), add (9) (p21) x2, inc 143.

В клетках линии mel Cher выявлена экспрессия следующих антигенов: дифференцировочных маркеров CD63, HMB45, тирозиназы (Tyrosinase) и мРНК генов, кодирующих раково-тестикулярные антигены класса MAGE [25–27]. Особенностью данной линии является экспрессия антигенов гистосовместимости I и II классов. Выявлена терапевтически значимая мутация V600E BRAF, активирующая RAF/MEK/ERK-сигнальный путь (табл. 1).

Подкожный ксенографт mel Cher

Ксенографт получен в результате имплантации $1,0 \times 10^7$ клеток п/к ксенографта «нулевого» пассажа *in vivo* пигментированной mel Cher с мутацией BRAF V600E. При последующей трансплантации по 50 мг клеточной взвеси мышам-самкам Balb/c nude вплоть до 9-го пассажа *in vivo* наблюдали стабильную кинетику роста с латентной фазой 8 дней, экспоненциальной – до 14 дней, стационарной – до 24 дней [15]. Кинетика роста п/к ксенографта mel Cher у мышей-самок Balb/c nude на 4–9-м поздних пассажах *in vivo* показана на рис. 2.

Таблица 1. Антигенный и мутационный профиль КЛ *mel Cher*

Антигены				Мутация/экзон			
дифференцировочные	раково-тестикулярные	гистосовместимости		<i>NRAS</i> /3-й	<i>BRAF</i> /15-й	Анализ ПЦР-продукта, М	
CD63	+	MAGE-3	+	Wt	V600E		
HMB45							HLA (I класс)
Tyrosinase +							HLA-DR (II класс)

Примечание. ПЦР – полимеразная цепная реакция. М – молекулярная масса.

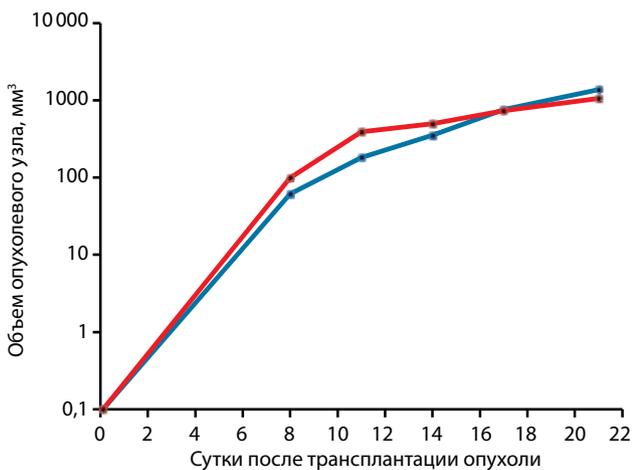


Рис. 2. Устойчивая кинетика роста п/к узлов 4-й и 9-й генерации у мышей *Valb/c nude* после имплантации $1,0 \times 10^7$ клеток («нулевой» пассажа *in vivo*) пигментированной МК человека *mel Cher*

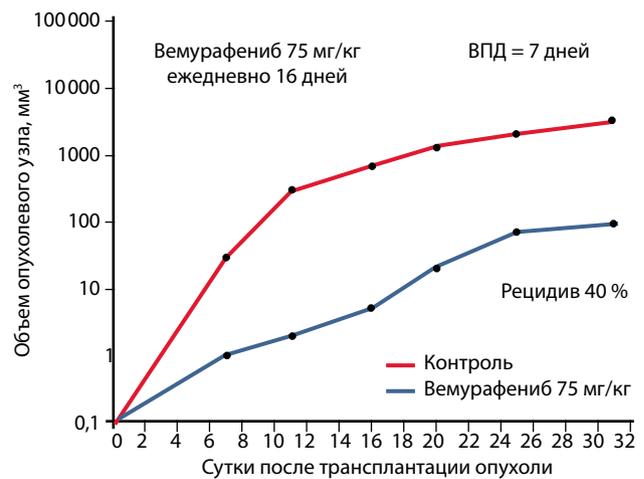


Рис. 3. Чувствительность п/к ксенографта *mel Cher/BRAF⁺* к вемурафенибу

Чувствительность п/к ксенографта *mel Cher/BRAF⁺* к Вемурафенибу, примененному в разовой дозе 75 мг/кг ежедневно 16-кратно, спустя 4–19 с после трансплантации, проявилась в достижении 7-дневной полной ремиссии с последующим рецидивом (рис. 3), [15, 18].

Таким образом, КЛ и п/к ксенографт пигментированной МК *mel Cher/BRAF⁺* с чувствительностью к ингибитору *BRAF*-киназы представляют собой адекватную тест-систему для поиска лечебных агентов пролонгированного действия, направленных на мутантную *BRAF*-киназу *in vivo*.

Клеточные линии меланомы кожи *mel Ras* с низким содержанием меланина

Клеточная линия *mel Ras* МК человека получена по описанному выше алгоритму из фрагмента мета-статического узла в мягких тканях правого бедра пациента с диссеминированной МК. Стабильно растущая КЛ хранится в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур под номером РККК (П) 710Д [17].

Цитограмма КЛ *mel Ras* представлена полиморфной популяцией клеток округлой, веретенообразной, вытянутой удлиненной, неправильной формы. Ядра клеток резко гиперхромные с зернистой структурой хроматина в виде крупных глыбок и зачастую содержат гипертрофированные ядрышки. В клетках наблюдается фрагментация и почкование ядер. Цитоплазма клеток негомогенная, интенсивно базофильная (рис. 4).

Кариологический анализ выявил 2 клон клеток с различными хромосомными нарушениями. Из 33 проанализированных метафаз 22 представляли 1 клон и 11 – другой. В клетках этих клонов обнаружено от 70 до 84 хромосом, модальное число соответствует гипертриплоидному набору ($3n+$). Обнаружено также 12 клеток с гексаплоидным ($6n$) набором (≈ 150 хромосом), что говорит о повышенном уровне полиплоидизации. В клетках первого клона выявлена нуллисомия по Y-хромосоме. В каждой из метафазных пластинок этого клона обнаружены две нормальные хромосомы 1, две хромосомы 1 с дополнительными фрагментами неизвестного происхождения на

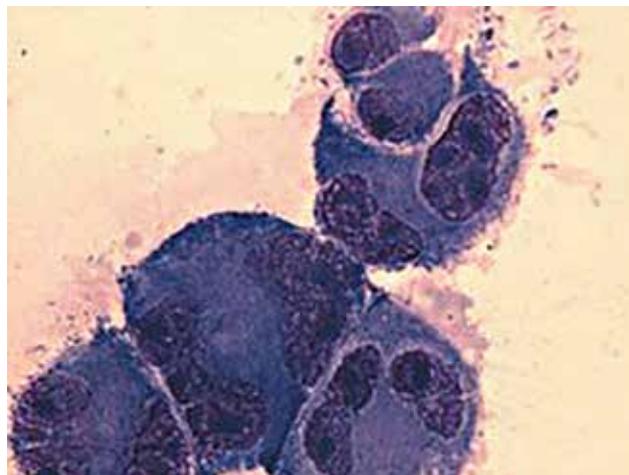
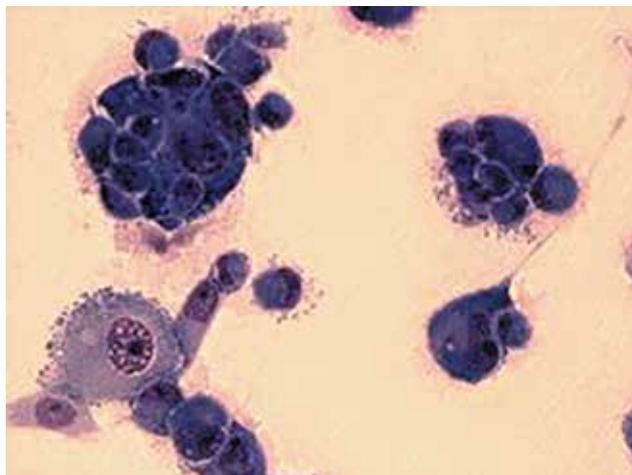


Рис 4. Морфология клеток из КЛ *mel Ras*. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$, $\times 400$

коротких плечах. Кроме того, выявлены транслокации фрагмента длинных плеч двух хромосом 1 (1q12 qter) с неидентифицированной хромосомой. Обнаружена делеция двух фрагментов длинных плеч хромосом 6 в районе 6q21, транслокация двух длинных плеч хромосомы 7 с образованием пары изохромосом и транслокация длинных плеч хромосом 9 и 14. В клетках первого клона линии *mel Ras* выявлено также по 2–3 маленьких маркерных хромосом и по 4 морфологически нормальных хромосомы 3. В 159 клетках 2-го клона выявлена дисомия по Y-хромосоме и нуллисомия по X-хромосоме. На длинном плече хромосомы 5 и на коротком плече хромосомы 9 обнаружен дополнительный хромосомный фрагмент неизвестного происхождения. В этих клетках выявлено по 4 морфологически нормальных хромосомы 3.

Суммарный кариотип КЛ *mel Ras*:

70~84<3n>XX,-Y,add(1)(p36),+add(1)(p36),del(6)(q21) $\times 2$,
i(7)(q10) $\times 2$,der(9;14)(q10;q10),+der(?)t(?;1)(?;q12) $\times 2$,+2~3mar, inc

70~84<3n>,YY,X,+3,add(5)(q35),add(9)(p21),inc.

Иммунофенотип КЛ включает экспрессию дифференцировочных антигенов CD63, HMW, экспрессии MelanA, HMB45, Tyrosinase не выявлено. Наблюдалась экспрессия мРНК генов, кодирующих раково-тестикулярные маркеры класса MAGE [25]. Особенностью данной линии является экспрессия антигенов гистосовместимости I и II класса [26, 27].

В результате полимеразной цепной реакции (ПЦР) на матрице геномной ДНК получен ампликон длиной 143 п. н., соответствующий экзону 3 гена *NRAS*. При секвенировании ПЦР-продукта обнаружена мутация *NRAS* p. Q61R (с. 182A>G). Эта мутация верифицирована затем в п/к ксенографтах 9-го пассажа со стабильной кинетикой роста на пике экспоненциальной фазы.

Подкожный ксенографт *mel Ras*

Оценка прививаемости КЛ *mel Ras* после п/к имплантации показала, что оптимальной является прививочная доза $1,0 \times 10^7$ клеток на мышь, приводящая к 100 % выходу пальпируемых опухолевых узлов «нулевого» пассажа *in vivo* через 11 дней латентной фазы после имплантации. Стабильный рост получен после 4-го пассажа *in vivo*, при этом латентная фаза сократилась до 7 дней с достижением $V_{cp} = 40,0 \pm 19,0$ мм³, что почти в 3 раза больше объема опухоли «нулевого» пассажа *in vivo*. Вплоть до 9-го пассажа сохранялась устойчивая динамика роста опухоли с близкими временными характеристиками и к 19-му дню объем опухолевого узла составил: $V_{cp} = 1353,7 \pm 543,0$ мм³.

Гистологическая картина п/к ксенографта *mel Ras* на этот срок была идентичной КЛ. Как видно на рис. 5, п/к ксенографт состоит из полиморфных клеток округлой, овальной, веретенообразной формы с крупными ядрами, содержащими ядрышки. Цитоплазма опухолевых клеток обычно темноокрашенная, но в отдельных местах – светлая. Пигмент в опухолевых клетках не обнаружен. В опухолевом узле клетки образуют солидные поля и местами формируют тяжи различного размера, ячейки, альвеолярно-подобные структуры, разделенные тонкими соединительно-тканными прослойками на отдельные дольки. В так называемых горячих точках встречается до 7 митозов в поле зрения, участки некрозов в опухоли единичные и мелкие. По периферии опухолевого узла располагаются жировая и мышечная ткань, в которую он прорастает.

При гистологической верификации крупного опухолевого узла диаметром 0,8–1,0 см выявлено преимущественно альвеолярно-дольчатое строение узла с участками солидного типа. Оценка чувствительности п/к ксенографтов *mel Ras/NRAS⁺* к таргетному препарату Траметинибу показала полную ремиссию

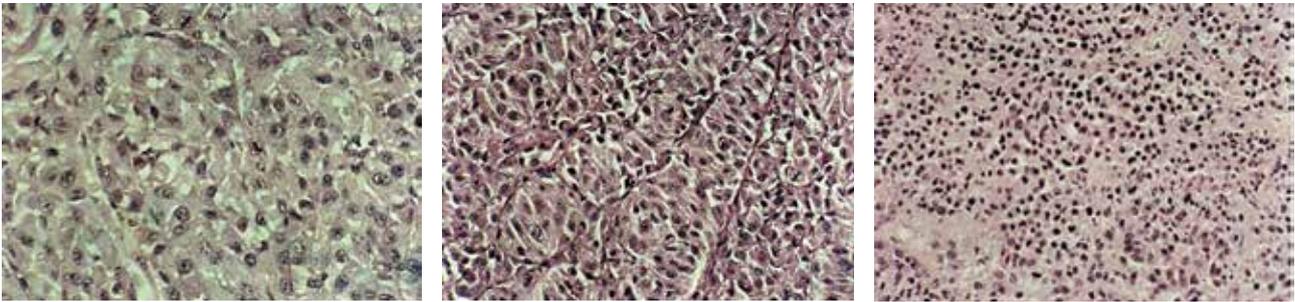


Рис. 5. Гистологические срезы п/к ксенографта МК человека *mel Rac* 9-го пассажа *in vivo* на 19-е сутки роста. Окраска гематоксилином, $\times 100$

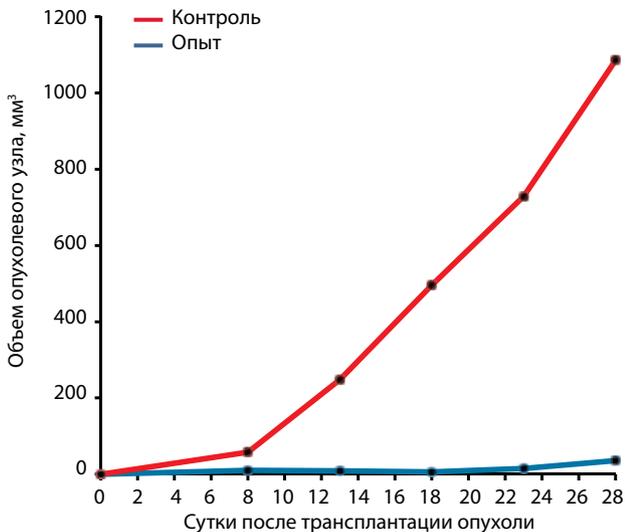


Рис. 6. Полная ремиссия п/к ксенографтов МК человека *mel Rac* 9-го пассажа с мутацией *NRAS* после 14-дневного воздействия Траметинибом в разовой дозе 0,3 мг/кг

роста опухоли у всех мышей в течение 28 дней после лечения, вплоть до гибели контрольной группы без лечения (рис. 6) [19].

Таким образом, *in vivo* показана высокая эффективность Траметиниба. Чувствительность КЛ как модели *in vitro* с определением величины IC_{50} не оценивали. Однако для клеток с аналогичными мишенями она составляет 0,92 нМ/1,8 нМ [22, 23].

Экспериментальные данные позволяют рассматривать комбинацию КЛ и п/к ксенографта *mel Rac/NRAS⁺* в качестве тест-системы для оценки чувствительности *in vitro/in vivo* к Траметинибу и для поиска новых эффективных агентов, направленных на Q61R *NRAS*.

Клеточные линии меланомы кожи *mel Ibr* как источник субклонов

Стабильно перевиваемая КЛ человека *mel Ibr* получена из фрагмента метастатического узла пациентки с диссеминированной МК [16].

Клетки *mel Ibr*, культивируемые с добавлением в среду 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, формировали адгезионный монослой. Они имели

преимущественно округлую эпителиоидную форму с признаками низкой дифференцировки, полиморфные ядра и цитоплазму, содержащую множество мелких светло окрашенных вакуолей (рис. 7). Около 1 % клеток в монослое имели веретеновидную форму. При культивировании в в чашках $D = 60$ мм и в среде с 5 % сывороткой при редком посеве клеток (около 200 клеток на чашку), выросшие колонии включали 3 морфологических типа клеток: эпителиоподобные, веретеновидные и смешанного типа [28].

В клетках *mel Ibr* и производных субклонах выявлена мутация V600E *BRAF*. Имплантационные характеристики КЛ *mel Ibr/BRAF⁺* были недостаточными из-за неполной прививаемости $1,0 \times 10^7$ клеток («нулевой» пассаж *in vivo*) с длительным развитием относительно небольшого п/к узла: латентная фаза составила 12 дней, на 20-е сутки роста $V_{cp} = 120$ мм³. Благодаря полиморфизму клеток в КЛ *mel Ibr/BRAF⁺* удалось получить 2 разных субклона, способных к адаптации *in vivo*.

Субклон *mel Ibr EE*

Субклон МК *mel Ibr EE* получен из стабильно перевиваемой родительской КЛ *mel Ibr* [16]. Клетки родоначальной линии культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 5–10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин и гентамицин при 37 °С в атмосфере 5 % CO_2 . Клетки 23 раза пересеивали в ростовой среде с 5 % сывороткой и 13-кратно — в среде с 10 % сывороткой [16]. В отличие от округлых эпителиоидных клеток родительской линии, клетки субклона *mel Ibr EE* имеют признаки эпителиально-мезенхимального перехода, что требует дальнейшего изучения. Такие клетки имеют веретеновидную форму с резким изменением уровней экспрессии E-кадгерина и виментина в зависимости от обогащения питательной среды. В частности, при культивировании клеток в среде с добавлением 5 % сыворотки базальный уровень экспрессии E-кадгерина составил 0,56 оптических единиц (о. е.) против 2,02 о. е., а уровень виментина — 1,77 о. е. против 1,61 о. е. В среде с 10 % сывороткой уровни экспрессии указанных маркеров в клетках этого субклона были существенно выше,

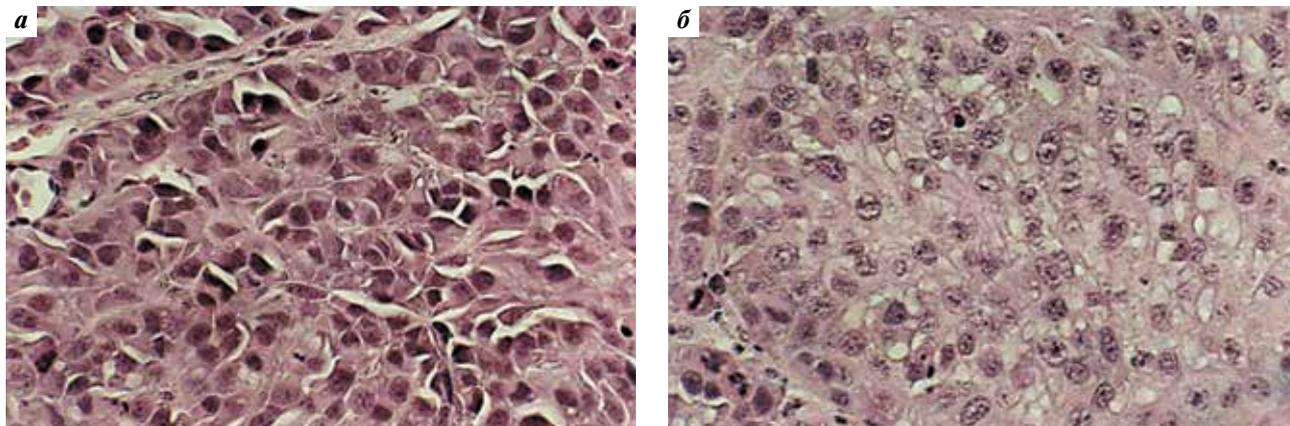


Рис. 7. Морфология клеток *mel Ibr*: а – крупные полиморфные опухолевые клетки с темной цитоплазмой и гиперхромными ядрами, видны единичные митозы; б – часть опухолевых клеток со светлой цитоплазмой и крупными ядрами округло-овальной формы, содержащими глыбки хроматина. Окраска гематоксилином, $\times 200$

а уровень виментина превышал уровень Е-кадгерина: 9,52 о. е. против 3,84 о. е. для Е-кадгерина [28].

Иммунологический фенотип клеток субклона *mel Ibr EE* оказался беднее, чем в исходной линии. В субклоне не выявлено заметной экспрессии CD90 – маркера ранних гемопоэтических клеток-предшественников, не связанного с опухолевой прогрессией, а также CD95 – активатора CD95/Fas-сигнального пути апоптоза и CD271. Отсутствие двух первых маркеров указывает на возможное приобретение клетками субклона свойств стволовых клеток. Низкий уровень CD271 в исходной линии не обнаруживался в субклоне. Роль антигена CD271 в прогрессии меланомы CD271 остается спорной [29].

Подкожная имплантация субклона *mel Ibr EE*

В отличие от исходной линии, при имплантации $3,0 \times 10^6$ клеток/мышь субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺* прививка состоялась у всех 3 реципиентов (100 % прививочная доза клеток). Измеряемые п/к опухолевые узлы субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺* «нулевого» пассажа *in vivo* при коротком латентном периоде – 5 дней – с устойчивым экспоненциальным ростом увеличились более чем в 20 раз. За 72 ч в п/к опухолевом узле субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺* число клеточных делений по сравнению с исходной линией *mel Ibr* составило 3 против 6. Это свидетельствует о пригодности субклона для получения солидной опухоли у мышей *Valb/c nude* из культуры клеток уже на «нулевом» пассаже *in vivo*. Полученная модель КЛ *mel Ibr EE/BRAF⁺* адекватна *in vitro* для оценки антипролиферативной активности и эффективности многократной таргетной или цитостатической терапии *in vivo*, направленной на клетки с мутацией *BRAF V600E* [29].

Субклон *mel Ibr 5C*

Субклон клеток меланомы *mel Ibr 5C* получен в результате культивирования КЛ *mel Ibr* в ростовой

среде со сниженным до 5 % содержанием эмбриональной телячьей сыворотки по описанному выше протоколу. Для получения субклона под микроскопом были отобраны колонии, состоящие только из клеток веретеновидной формы. После 30-го и более пассажей клетки оставались мономорфными и сохраняли свой иммунологический фенотип.

По морфологическим характеристикам клетки субклона *mel Ibr 5C* близки к субклону *mel Ibr EE* и отличаются от родительских клеток значительно меньшим размером, крупными ядрами, занимающими практически весь объем цитоплазмы, длинными вытянутыми отростками и интенсивной пролиферацией [29, 30]. Эти клетки растут в виде плотного монослоя и формируют на его поверхности выпуклые образования в виде сфероидов. Клетки субклона *mel Ibr 5C* отличаются веретеновидной формой, в процессе роста образуют колонии сфероидного типа с резким уменьшением уровней экспрессии *HLA-DR⁺*, *CD54⁺* и значительным повышением уровня *CD63⁺*, а также экспрессией в некоторых клетках маркера *CD133⁺*, характерного для стволовых клеток. Иммунологический фенотип и маркеры стволовых опухолевых клеток субклона и родоначальной КЛ различаются в отношении уровней экспрессии антигенных маркеров аналогично субклону *mel Ibr EE*. В клетках субклона уменьшились уровни *HLA-DR⁺*, *CD95⁺* и *CD54⁺*. Вместе с тем, на фоне отрицательного *Oct-4A* выявлено 24,9 % клеток, экспрессирующих *CD133⁺*. Экспрессия антигена *CD63* в клетках субклона повысилась, а экспрессия антигенов гистосовместимости I класса: *HLA-ABC*, *CD24*, *CD34*, *CD44*, *CD117* и *CD105* не изменилась (табл. 2) [29, 30].

Цитогенетический анализ показал, что кариотип клеток субклона *mel Ibr 5K* и родоначальной КЛ различен [24, 29, 30].

Суммарный кариотип клеток субклона *mel Ibr 5K* и исходной КЛ *mel Ibr*:

Таблица 2. Различия иммунологических фенотипов КЛ *mel Ibr* и субклона *mel Ibr 5C*

Антиген*	Клеточная линия (48-й пассаж)	Субклон (30-й пассаж)
HLA-DR	87,9	18,6
CD133	1,6	24,9
CD63	0,9	92,4
CD54	93,1	24,9
CD 95	21,5	2,8

*Нет отличий в маркерах HLA-A, B, C; CD24; CD34; CD44; CD117; CD105 и Oct-4A.

- субклон *mel Ibr 5K-92-100<4n+>,XXX,-X,del(6)(p21),?der(6)del(6)(12)dup(6)(q?q?),der(9)t(1;9)(q12;p21),inc;*
- КЛ *mel Ibr-71-87<4n->,XX,add(X)(q28),del(1)(q12),+7,+7,+7,i(21)(q10),inc.*

При анализе 25 метафаз установлено, что число хромосом в клетках колеблется от 92 до 100, модальное число соответствует гипертетраплоидному набору (4n+). Обнаружены следующие структурные перестройки: дериватная хромосома 9, образованная в результате транслокации хромосом 1 и 9; делеция короткого плеча хромосомы 6 (p21-pter), как следствие возможной терминальной делеции короткого плеча (p12-pter) – дериватная хромосома 6 с дубликацией фрагмента ее длинного плеча. Перестройка, затрагивающая локус p21 хромосомы 9, в котором расположен ген-супрессор опухоли CDKN2A (p16), кодирующий белок-регулятор клеточного цикла и старения клеток, характерна для многих злокачественных новообразований.

В клетках исходной КЛ (анализ 15 метафаз) число хромосом колеблется от 71 до 87, модальное число соответствует гипертетраплоидному набору (4n). В популяции клеток повышена копияность хромосомы 7. Кариотип не соответствует стандартному набору также и по их структуре. Во всех клетках выявлены дополнительные хромосомные фрагменты неизвестного происхождения, транслоцированные на длинное плечо X-хромосомы. Обнаружены 2 различные по морфологии хромосомы 1: с делецией практически всего короткого плеча (p21-pter) и с делецией – (q12-qter). Также выявлена изохромосома, образованная при слиянии длинных плеч хромосомы 21. Копийность хромосомы 7 увеличена, что характерно для клеток меланомы. На коротком плече хромосомы 7 в районе 7p12.3-p12.1 локализован ген рецептора эпидермального фактора роста, гиперэкспрессия которого индуцирует и усиливает клеточную пролиферацию и прогрессию опухоли.

Полученные данные указывают на ряд особенностей субклонов *mel Ibr*, возникших при селекции клеток, в частности веретенновидную морфологию, утрату антигенов гистосовместимости II класса, появление антигена стволовых клеток CD133 без экспрессии Oct-4A. Такие клетки с высокой пролиферативной активностью имеют преимущество по сравнению с клетками исходной родительской линии и при наличии локомоторных свойств могут формировать метастазы *in vivo*.

Подкожный ксенографт субклона *mel Ibr 5C*

Субклон МК человека *mel Ibr 5C* получен из соответствующей КЛ по описанной выше схеме. Показано, что оптимальная прививочная доза клеток, обеспечивающая 100 % прививаемость «нулевого» пассажа *in vivo* составляет $6,0 \times 10^6$ клеток, через 10 сут латентного периода выявляются пальпируемые опухоли. Стабильная кинетика роста опухолей достигнута к 4-му пассажу *in vivo*. Латентная фаза сократилась до 7 дней, а объем опухолевого узла составил $V_{cp} = 64,0 \pm 15,0$ мм³, т. е. почти в 1,6 раза превысил размеры узла при первом пассаже *in vivo*. На 14-е сутки $V_{cp} = 380,0 \pm 132,0$ мм³, $V_t/V_{t-1} = 5,9$. На 14, 17, 21-е сутки кинетика роста опухоли соответствовала стационарной фазе с колебаниями $V_t/V_{t-1} = 1,9-2,1-1,8$. На 21-е сутки $V_{cp} = 956,0 \pm 237,0$ мм³, что в 10 раз превысило размеры опухолевого узла при первом пассаже. Устойчивая кинетика роста опухоли сохранялась до 9-го пассажа с одинаковыми временными характеристиками: латентной фазой до 8 дней ($V_{cp} = 17,0 \pm 44,0$ мм³), экспоненциальной фазой роста до 14 дней ($V_{cp} = 517,0 \pm 184,0$ мм³) и стационарной фазой роста до 19-го дня после трансплантации ($V_{cp} = 1254,0 \pm 415,0$ мм³). Отсутствие значимых различий кривых роста опухоли двух пассажей в полулогарифмической системе координат подтверждает устойчивость кинетических характеристик роста п/к ксенографтов МК человека *mel Ibr 5C* у мышей Balb/c nude.

При гистологическом исследовании срезов опухоли 9-го пассажа, окрашенных гематоксилином и эозином, она верифицирована как беспигментная МК, цитологически идентичная субклону КЛ *mel Ibr 5C*. Патоморфологические признаки п/к опухоли идентичны таковым в исходной культуре клеток (рис. 7).

Данные экспериментальных исследований позволяют считать комбинацию субклонов *mel Ibr EE/BRAF⁺* и *mel Ibr 5C/BRAF⁺* адекватной тест-системой *in vitro/in vivo* для поиска новых таргетных средств и терапии амеланотической МК человека.

Заключение

Аналитический обзор статей и патентов за 2000–2017 гг., посвященных полученным в НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина КЛ, их субклонам и п/к

ксенографтам МК человека, позволяет считать эти модели, охарактеризованные по основным биологическим параметрам, адекватными тест-системами для решения фундаментальных и прикладных задач онкологии. Предложенная мини-коллекция

позволяет изучать механизмы прогрессии опухолей, выявить прогностические факторы и способствует разработке новых молекулярно-направленных препаратов и подходов к комбинированной терапии МК человека.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Демидов Л.В., Утяшев И.А., Харкевич Г.Ю. Подходы к диагностике и терапии меланомы кожи: эра персонализированной медицины. *Дерматология. Consilium medicum (приложение)* 2013;2–3:42–7. [Demidov L.V., Utyashev I.A., Kharkevich G.Y. Approaches to the diagnosis and therapy of melanoma: the era of personalized medicine. *Dermatology. Consilium medicum (Annex)* 2013;2–3:42–7. (In Russ.)].
2. Inman S. GSK drug combination approved for advanced melanoma. *Am J Manag Care* 2014;20(2 Spec No.): E10. PMID: 25764581.
3. Jaiswal B.S., Janakiraman V., Kljavin N.M. et al. Combined targeting of BRAF and CRAF or BRAF and PI3K effector pathways is required for efficacy in NRAS mutant tumors. *PLoS One* 2009;4(5):e5717. PMID: 19492075. DOI: 10.1371/journal.pone.0005717.
4. Colombino M., Capone M., Lissia A. et al. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol* 2012;30(20):2522–9. PMID: 22614978. DOI: 10.1371/journal.pone.0005717.
5. Ascierto P.A., Schadendorf D., Berking C. et al. MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. *Lancet Oncol* 2013;14(3):249–56. PMID 23414587. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70024-X.
6. Davies H., Bignell G.R., Cox C. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949–54. PMID 12068308. DOI: 10.1038/nature00766. PMID: 12068308.
7. Tsai J., Lee J.T., Wang W. et al. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:3041–46. PMID 18287029. DOI: 10.1073/pnas.0711741105.
8. Bollag G., Hirth P., TSA J. et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 2010;467:596–9. PMID 20823850. DOI: 10.1038/nature09454.
9. Flaherty K.T., Puzanov I., Kim K.B. et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:809–19. PMID 20818844. DOI: 10.1056/NEJMoa1002011.
10. Joseph E.W., Pratilas C.A., Poulikakos P.I. et al. The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:14903–8. PMID: 20668238. DOI: 10.1073/pnas.1008990107.
11. Ribas A., Kim K.B., Schuchter L.M. et al. BRIM-2: an open-label, multicenter phase II study of vemurafenib in previously treated patients with BRAFV600E mutation-positive melanoma. *J Clin Oncol* 2011;29(15): 8509. DOI: 10.1200/jco.2011.29.15_suppl.8509.
12. Graeme J., Walker G.J., Soyer H.P. et al. Modelling melanoma in mice. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011;24:1158–76. DOI: 10.1111/j.1755-148X.2011.00923.x.
13. Михайлова И.М., Давыдов М.М. Клеточные линии меланомы человека. СПб.: Научное издание, 2017. 190 с. [Mikhailova I.M., Davydov M.M. Cell lines of human melanoma. SPb.: High technology, 2017. 190 p. (In Russ.)].
14. Трещалина Е.М. Коллекция опухолевых штаммов человека. М.: Практическая медицина, 2009. 299 с. [Treshalina E.M. Collection of tumor strains of human. M.: Practical medicine; 2009. 299 p. (In Russ.)].
15. Андропова Н.В., Трещалина Е.М., Черемущкин Е.А. и др. Патент РФ № 2572569, 2015. Способ получения подкожных ксенографтов клеточной линии меланомы кожи человека mel Cher с мутацией V600E BRAF для доклинического изучения таргетных противоопухолевых средств. [Andronova N.V., Treshalina E.M., Cheremushkin E.A. et al. The patent of the Russian Federation № 2572569, 2015. A method of producing a subcutaneous xenograft cell line melanoma human skin mel Cher with a mutation of BRAF v600e was for preclinical studies of targeted anticancer agents. (In Russ.)].
16. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Морозова Л.Ф. и др. Патент РФ № 2287576, 2006. Клеточная линия меланомы человека mel Ibr, используемая для получения противоопухолевых вакцин. [Mikhailova I.N., Baryshnikov A.Yu., Morozova L.F. et al. The patent of the Russian Federation № 2287576, 2006. Cell line of human melanoma mel Ibr used for receiving antitumor vaccines. (In Russ.)].
17. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В. и др. Патент РФ № 2402602, 2009. Клеточная линия меланомы человека mel Rac, используемая для получения противоопухолевых вакцин. [Mikhailova I.N., Baryshnikov A.Yu., Demidov L.V. et al. The patent of the Russian Federation № 2402602, 2009. Cell line of human melanoma mel Rac, used for receiving antitumor vaccines. (In Russ.)].
18. Андропова Н.В., Морозова Л.Ф., Михайлова И.Н. и др. Моделирование подкожного ксенографта меланомы кожи человека mel Cher с мутацией V600E BRAF на иммунодефицитных мышках для доклинического изучения таргетных противоопухолевых средств. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(4):65–71. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-65-71. [Andronova N.V., Morozova L.F., Mikhaylova I.N. et al. Modeling of a subcutaneous xenograft of human skin melanoma mel Cher with V600E BRAF mutation in immunodeficient mice for preclinical study the targeting anticancer drugs. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal* 2016;15(4):65–71. (In Russ.)].
19. Андропова Н.В., Ситдикова С.М., Морозова Л.Ф. и др. Моделирование подкожного ксенографта меланомы кожи человека mel Rac с мутацией NRAS на иммунодефицитных мышках для доклинического изучения таргетных противоопухолевых средств. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(2):40–6.

- DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-40-46. [Andronova N.V., Sitdikova S.M., Morozova L.F. et al. Modeling of a subcutaneous xenograft of human melanoma skin mel Rac with NRAS mutation on immunodeficient mice for preclinical studying the targeting anticancer drugs. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian bioterapeutic journal* 2016;15(2):40–6. (In Russ.)].
20. Trametinib(GSK1120212), Catalog No. S2673, Synonyms: JTP-74057. <http://www.selleckchem.com/products/gsk1120212-jtp-74057.html>; <https://focusbio.com.au/products/trametinib/>
21. Yamaguchi T., Kakefuda R., Tajima N. et al. Antitumor activities of JTP-74057(GSK1120212), a novel MEK1/2 inhibitor, on colorectal cancer cell lines in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 2011;39(1):23–31. PMID: 2152331. DOI: 10.3892/ijo.2011.1015.
22. Андропова Н.В., Морозова Л.Ф., Сураева Н.М. и др. Способность клеток беспигментной меланомы кожи человека линии mel Ibr/BRAF+ и ее субклона к росту у иммунодефицитных мышей Balb/c nude при подкожной имплантации. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;18(2):60–5. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-60-65. [Andronova N.V., Morozova L.F., Suraeva N.M. et al. Ability to the growth into immunodeficient Balb/c nude mice after subcutaneous implantation of human amelanotic melanoma skin cell line mel Ibr/BRAF+ and its subclone. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian bioterapeutic journal* 2017;18(2):60–5. (In Russ.)].
23. Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши Balb/c nude и моделирование различных вариантов опухолевого роста для доклинических исследований. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(3):6–13. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-6-13. [Treshalina E.M. Immunodeficient mice Balb/c nude and modeling of various types of tumor growth for preclinical studies. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian bioterapeutic journal* 2017;16(3):6–13. (In Russ.)].
24. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В. и др. Патент РФ № 2364624, 2009. Клеточная линия меланомы человека mel Cher, используемая для получения противоопухолевых вакцин. [Mikhailova I.N., Baryshnikov A.Yu., Demidov L.V. et al. The patent of the Russian Federation № 2364624, 2009. Cell line human melanoma mel SEG used for receiving antitumor vaccines. (In Russ.)].
25. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бутова О.С. и др. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов в клетках меланомы человека. *Сибирский онкологический журнал. Лабораторные и экспериментальные исследования* 2010;37(1):29–39. [Mikhailova I.N., Kovalevsky D.A., Burova O.S. et al. Expression of Cancer Testis Antigens in Human Melanoma Cells. *Siberskii onkologicheskii jurnal. Laboratornie i experimentalnie isledovaniia = Siberian Journal of Oncology. Laboratory and experimental studies* 2010;37(1):29–39. (In Russ.)].
26. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин. *Вестник РАМН* 2005;7:37–40. [Mikhailova I.N., Lukashina M.I., Barishnikov A.Yu. et al. Melanoma cell lines as the basis for antitumor vaccine preparation. *Vestnik RAMN = Bulletin of RAMS* 2005;7:37–40 (In Russ.)].
27. Бутова О.А. Получение и характеристика клеточных линий меланомы человека для создания противоопухолевых вакцин. Дис. ... канд. мед. наук. М., 2010. [Burova O.A. Preparation and characteristics of human melanoma cell lines for the creation of anticancer vaccines. Dis. ... kand. med. sciences. Moscow, 2010. (In Russ.)].
28. Морозова Л.Ф., Сураева Н.М., Бутова О.С. и др. Изменение морфологических, иммунологических и цитогенетических характеристик клеток меланомной линии mel Ibr при культивировании в ростовой среде с низкой концентрацией эмбриональной телячьей сыворотки. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(2):19–21. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-90-94. [Morozova L.F., Suraeva N.M., Burova O.S. et al. Changes in the morphological and immunological, immunological and genetic characteristics of mel Ibr melanoma cells in response to low concentration of embryo calf serum. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian bioterapeutic journal* 2016;15(2):19–21. (In Russ.)].
29. Сураева Н.М., Морозова Л.Ф., Самоилов А.В. и др. Изменение морфологических и иммунологических характеристик клеток меланомной линии(mel Ibr) в результате воздействия куриного эмбрионального экстракта. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2015;159(4):521–24. DOI: 10.1007/s10517-017-3778-y. [Suraeva N.M., Morozova L.F., Burova O.S. et al. Changes in the Morphological and Immunological Characteristics of Mel Ibr Melanoma Cells in Response to Chicken Embryo Extract. *Byulleten' ehksperimental'noj biologii i mediciny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2015;159(4):521–24. (In Russ.)].
30. Сураева Н.М., Морозова Л.Ф., Рябая О.О. и др. Особенности характеристик клеток субклона меланомной линии(mel Ibr) после воздействия куриного эмбрионального экстракта. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2017;163(2):221–6. DOI: 10.1007/s10517-015-3007-05. [Suraeva N.M., Morozova L.F., Rabaia O.O. et al. Characteristics of melanoma line subclone cells(mel Ibr) after exposure to chicken embryonic extract. *Byulleten' ehksperimental'noj biologii i mediciny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2017;163(2):221–6. (In Russ.)].

ORCID авторов/ ORCID of authors

Е.М. Трещалина/E.M. Treshalina: <https://orcid.org/0000-0002-3878-3958>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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