

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОДКОЖНОГО КСЕНОГРАФТА МЕЛАНОМЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА MEL RAC С МУТАЦИЕЙ NRAS НА ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ МЫШАХ ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ ТАРГЕТНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СРЕДСТВ

Н.В. Андропова, С.М. Ситдикова, Л.Ф. Морозова, А.А. Лушникова, Д.А. Понкратова,
И.Н. Михайлова, Н.Т. Райхлин, И.А. Букаева, Е.М. Трещалина

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Сурия Мансуровна Ситдикова suriyasitdikova@yandex.ru

Введение. Разработка новых моделей диссеминированной меланомы кожи человека с наличием молекулярно-генетической мишени для таргетной терапии повышает результативность доклинических исследований *in vitro* и *in vivo* новых антимеланомных средств и их комбинаций. Такая возможность реализована путем адаптации к росту *in vivo* оригинальной линии клеток беспигментной меланомы кожи человека *mel Rac* и получению подкожного (п/к) ксенографта под контролем трансплантационных, морфологических, молекулярно-генетических (мутация NRAS) и химиотерапевтических (чувствительность к траметинибу, ингибитору NRAS) характеристик.

Цель исследования — получение из линии клеток *mel Rac* п/к ксенографта беспигментной меланомы кожи человека с мутацией NRAS, чувствительной к специфической таргетной терапии.

Материалы и методы. Использована линия клеток пигментированной беспигментной меланомы кожи человека *mel Rac* из коллекции РОНЦ и иммунодефицитные мыши-самки Balb/c nude разведения РОНЦ. Искомые характеристики определены при многократном п/к трансплантации *in vivo* с помощью методов трансплантационной биологии, световой микроскопии, молекулярной генетики и экспериментальной химиотерапии. Чувствительность к ингибитору NRAS мутации оценена под контролем скорости роста опухоли (V_t/V_0) по адекватным для пациентов показателям: наличие полной ремиссии и возможность рецидива.

Результаты. При п/к трансплантации 10^7 клеток линии *mel Rac* получены цитологически идентичные перевиваемые п/к ксенографты с устойчивой кинетикой роста на 4–9-м пассажах (латентная фаза — 8 сут, экспоненциальная — до 14 сут, стационарная — до 24 сут) и наличием мутации NRAS. Траметиниб в разовой дозе 0,3 мг/кг вызвал полную ремиссию в течение 14 сут и в течение 7 сут после его отмены без рецидива.

Выводы. Полученный с линией клеток беспигментной меланомы кожи человека *mel Rac*, чувствительный к траметинибу п/к ксенографт с мутацией NRAS пригоден для доклинического изучения новых противомеланомных средств, направленных на эту мишень.

Ключевые слова: беспигментная меланома кожи человека, NRAS мутация, подкожный ксенографт, иммунодефицитные мыши

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-40-46

MODELING OF A SUBCUTANEOUS XENOGRATF OF HUMAN MELANOMA SKIN MEL RAC WITH NRAS MUTATION ON IMMUNODEFICIENT MICE FOR PRECLINICAL STUDYING THE TARGETING ANTICANCER DRUGS

N. V. Andronova, S. M. Sitdikova, L. F. Morozova, A. A. Lushnikova, D. A. Ponkratova,
I. N. Mikhailova, N. T. Raychlin, I. A. Bukaeva, H. M. Treshalina

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. Development of new models of a human disseminative melanoma of skin with existence of a molecular and genetic target for specific therapy increases productivity of the preclinical researches *in vitro* and *in vivo* new the anti-melanoma drugs or their combinations. Such opportunity is realized by adaptation to *in vivo* of the original human pigment-free skin melanoma cell line *mel Rac* and receiving s. c. xenograft under monitoring, transplant, morphological, molecular and genetic (NRAS mutation) and chemotherapeutic (sensitivity to an inhibitor of NRAS a trametinib) characteristics.

Objective. Receiving from the cell line *mel Rac* s. c. xenograft of a human pigmented melanoma of skin with a mutation of NRAS and sensitive to specific target therapy.

Materials and methods. Human pigment-free skin melanoma cell line mel Rac from the Collection of Russian Cancer Research Center and immunodeficient female of Balb/c nude mice cultivation of Russian Cancer Research Center was used. Required characteristics are defined at a multiple s. c. transplanting in vivo by methods of transplant biology, a light microscopy, molecular genetics and the experimental chemotherapy. Sensitivity to a NRAS inhibitor to a trametinib was estimated under monitoring of rate of the tumor growth (V_t/V_0) on indexes, adequate for patients: existence of the complete remission and possibility of recurrence.

Results. At s. c. transplantation of 10^7 cell of mel Rac line are received cytological identical intertwined s. c. xenografts with a stable kinetics of growth on 4–9 passages (a latent phase 8 days, exponential – to 14 days, stationary – to 24 days) and existence of a mutation of NRAS. Trametinib in a single dose of 0,3 mg/kg caused the complete remission during a 14-day course and within 7 days after its cancellation without recurrence.

Conclusion. Receiving with cell line mel Rac s. c. xenograft of a human pigment-free melanoma of skin with a mutation of NRAS and sensitive to specific target therapy is suitable for preclinical studying of the specific for this target new anti-melanoma drugs.

Key words: human pigment-free melanoma skin, NRAS mutation, subcutaneous xenograft, immunodeficient mice

Введение

Диссеминированная меланома кожи человека, особенно беспигментная, отличается чрезвычайно низкой чувствительностью к различным видам терапии [1]. Важным фактором в исследованиях по созданию таргетных антимеланомных препаратов является повышенная активность митогенактивируемых протеинкиназ (МАРК) сигнального пути RAS/RAF/MEK/ERK, сопряженная с наличием мутаций. Среди последних в 15–20 % первичных и метастатических меланом обнаружена мутация NRAS, следствие замены в кодоне 61 экзона 3 Q61R гена NRAS, кодирующего малую ГТФазу [2–4]. Большинство мутаций NRAS (80 %) реализуются в результате замены в кодоне 61 экзона 3 (Q61K и Q61R) и приводят к образованию aberrантной формы белка, который не может гидролизовать RAS-ГТФ и остается гиперактивным. Эти мутации ассоциированы с онкогенезом на ранних стадиях развития меланомы, в частности, их несут около 80 % врожденных невусов, в доброкачественных опухолях они встречаются редко [5]. Мутации в экзоне 3 NRAS обнаруживаются на более поздних этапах развития болезни и, как предполагают, участвуют в метастазировании меланомы. Мутации NRAS нередко выявляются, в том числе в метастазах меланомы, после терапии BRAF-ингибиторами [6].

Антимеланомные ингибиторы мутации NRAS пока находятся в стадии доклинической или клинической разработки [5, 7, 8]. При таргетной терапии больных метастатической меланомой с мутацией гена NRAS селективными ингибиторами киназ MEK1 и MEK2, препаратами MEK 162 и траметинибом (мекинист) получены обнадеживающие результаты [9]. Интенсивное развитие проблемы определяет актуальность создания адекватных моделей *in vivo* для доклинической оценки эффективности новых NRAS-направленных антимеланомных агентов.

Пригодной для получения подкожных (п/к) ксенографтов для доклинического изучения противоопухолевых средств является клеточная линия беспигментной меланомы кожи человека mel Rac, депонированная

в специализированной коллекции клеточных культур РККК (П) 704Д Института цитологии РАН [2]. Эта линия имеет соответствующие онкологическому профилю стабильные культуральные, морфологические и индивидуальные фенотипические характеристики, представленные дифференцировочными антигенами CD63, HMW, отрицательными MelanA, HMB45 и Tyrosinase, положительными маркерами на уровне МРНК раково-тестикулярного семейства MAGE, а также антигенами гистосовместимости I и II классов. Линия mel Rac имеет достаточно высокий митотический потенциал, позволяющий получить солидный рост *in vivo* при результирующей трансплантационной адаптации [10]. В коллекции штаммов опухолей человека формируется панель штаммов меланомы с различными мутациями, определяющими современную таргетную терапию диссеминированной меланомы кожи человека [11]. Нами получены линия клеток и п/к ксенографты пигментированной меланомы mel Cher с мутацией BRAF V600E, высокочувствительные к вемурафенибу [12]. В качестве 2-й модели для доклинического изучения таргетных антимеланомных препаратов при наличии мутации NRAS рассматривается п/к ксенографт беспигментной меланомы кожи человека mel Rac, полученный из адекватной по биологическим характеристикам линии клеток.

Цель исследования – получение из линии клеток mel Rac п/к ксенографта беспигментной меланомы кожи человека с мутацией NRAS, чувствительной к специфической таргетной терапии.

Задачи исследования:

- Определение мутации NRAS в клеточной линии mel Rac.
- Адаптация клеточной линии mel Rac к росту *in vivo* под контролем прививаемости и стабильной кинетики.
- Верификации гистологической идентичности и наличия мутации NRAS в срезах п/к ксенографтов и в клетках линии mel Rac.
- Оценка лекарственной чувствительности к траметинибу п/к ксенографтов mel Rac.

Материалы и методы

Определение мутации *NRAS* в клетках и срезах п/к ксенографтов *mel Rac*

Выделение ДНК

Монослой клеток, растущих в стандартных культуральных флаконах, покрывали слоем Версена («ПанЭко», Москва) в концентрации 3 мл на 25 см² поверхности клеток и инкубировали 5 мин при 37 °С. После отделения клеток от подложки их собирали в центрифужные пробирки с 1–2 мл среды, диспергировали и осаждали центрифугированием при 200 g 5 мин. Осадок клеток объемом около 100–200 мкл переносили в микропробирку объемом 1,5 мл, гомогенизировали в лизирующем буфере из набора «Амплипрайм ДНК-сорб-В» («НекстБио», Москва), инкубировали в термостате при 65 °С в течение 15 мин, затем в микропробирку с гомогенатом вносили 25 мкл предварительно гомогенизированного сорбента из указанного набора и инкубировали 10 мин при комнатной температуре, осаждали центрифугированием при 13000 g 15 с и тщательно промывали осадок буфером № 1 (300 мкл), затем осаждали аналогичным образом и 3 раза повторяли процедуру отмывки буфером № 2 (по 500 мкл) с осаждением. Осадок высушивали при 65 °С в течение 7–10 мин и диспергировали в 50 мкл буфера для разведения, инкубировали при 65 °С 10 мин, осаждали при 13 000 g 1 мин. Хранили раствор ДНК при –20 °С.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Для поиска соматических мутаций в экзонах 2 и 3 гена *NRAS* использовали ПЦР со специфичными праймерами. Праймеры к экзону 2, в котором была обнаружена мутация *NRAS* р. Q61R (с.182A>G), следующие:

Ex2NR_For 5' – AAT TGA ACT TCC CTC CCT CCC T-3',

Ex2NR_Rev 5' – TGT CCT CAT GTA TTG GTC TCT C-3',

shEx2NS_rev 5' – GTC TCT CAT GGC ACT GTA CTC T-3'.

ПЦР проводили в объеме 25 мкл реакционной смеси по следующей схеме: к 10 нг ДНК добавляли по 1 мМ олигонуклеотидных праймеров, по 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, 3 % формамида и 2,5 мкл 10-кратного буфера для ПЦР следующего состава: 500 мМ KCl, 100 мМ трис-HCl pH 8,4, 15 мМ MgCl₂, деионизированной воды до 25 мкл.

ПЦР проводили в следующем режиме: начальная денатурация – при 94 °С, в течение 5 мин, затем в смесь добавляли HotStart ДНК-полимеразу (1 Ед активности) и выполняли 40 циклов ПЦР: денатурация при 94 °С – 25 с, отжиг при 64 °С – 30 с, элонгация при 72 °С – 30 с, и далее при 72 °С в течение 10 мин, хранение при 4 °С.

Второй раунд ПЦР проводили с использованием праймера shEx2NS_rev в режиме: 94 °С – 1 мин; затем 15 циклов: 94 °С – 30 с, 64 °С – 30 с, 72 °С – 30 с, затем терминация при 72 °С – 10 мин.

Электрофорез ПЦР-продуктов в агарозном геле

ПЦР-продукты выявляли в 2 % агарозном геле при U = 120 В. Полосу, соответствующую последовательности экзона 2 гена *NRAS* длиной 143 п. н., вырезали из геля и выделяли ДНК с помощью набора Wizard®PCR Preps DNA Purification System (Promega, США).

Секвенирование ПЦР-продукта

Аmplицированную ДНК секвенировали на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США) по протоколам фирмы-производителя в режиме фрагментного анализа. Для анализа результатов ПЦР-анализа использовали компьютерную программу Chromas или GeneMapper.

Адаптация клеточной линии *mel Rac*

к росту *in vivo*

Инокулятом для имплантации служила культивированная в CO₂ клеточная линия описанной выше беспигментной меланомы кожи человека *mel Rac*. Инокулят для имплантации мышам готовили из клеток, отмывтых физиологическим раствором от культуральной среды и помещенных в питательную среду 199.

Для получения п/к ксенографтов использованы 120 половозрелых 6–8 нед иммунодефицитных мышей обоих полов Balb/c nude конвенционального содержания [13], которым вводили инокулят п/к в правый бок по 0,1 × 10⁷, 0,5 × 10⁷ или 1,0 × 10⁷ клеток на мышь (нулевой пассаж, n = 3, 3 и 6 соответственно) в 0,2 мл питательной среды 199.

Прививаемость клеток контролировали по наличию пальпируемых опухолей у мышей с регистрацией длительности латентного периода до 20 сут и измерением опухолей с помощью электронного штангенциркуля. По окончании исследования определяли оптимальную прививочную дозу, обеспечивающую 100 % прививаемость и наиболее короткий латентный период.

Повторную трансплантацию (пассажи 1–9) выполняли взвесью опухолевой ткани предшествующих пассажей, которую инокулировали мышам (n = 6) по 50 мг в разведении 1:20 питательной средой 199. О кинетике роста п/к ксенографтов судили по результатам измерения в течение 2–4 нед каждые 3–4 сут с помощью электронного штангенциркуля. Период 2-кратного и более увеличения среднего объема опухоли (V_{ср} = a × b × c) определял длительность экспоненциальной фазы роста, а стабилизация роста опухоли на уровне менее 2-кратного увеличения – длитель-

ность стационарной фазы роста. Кратность прироста опухоли рассчитывали по соотношению последующего среднего объема к предыдущему (V_t/V_{t-1}). Отсутствие значимых различий кривых роста опухоли 2 смежных пассажей в полупологарифмической системе координат подтверждало устойчивость кинетических характеристик п/к ксенографтов меланомы кожи человека mel Ras у мышей Balb/c nude.

Для подтверждения идентичности клеточного состава п/к ксенографтов и клеточной линии беспигментной меланомы кожи человека mel Ras опухолевые узлы 9-го пассажа с устойчивой кинетикой роста подвергали гистологическому исследованию методом световой микроскопии («Поливар», Австрия) после окрашивания их срезов гематоксилином и эозином.

Статистический анализ параметров роста пассажа выполняли с помощью стандартного метода Фишера. Отсутствие значимых различий кривых роста опухоли 2 пассажей в полупологарифмической системе координат подтверждало устойчивость кинетических характеристик роста п/к ксенографтов беспигментной меланомы кожи человека mel Ras у мышей Balb/c nude.

Чувствительность п/к ксенографтов меланомы кожи человека mel Ras к траметинибу

Траметиниб вводили в желудок мышам ($n = 10$) по известной схеме: ежедневно с 4-х по 17-е сутки после трансплантации опухоли в разовой дозе 0,3 мг/кг [7]. Контроль роста опухоли в динамике осуществляли в этой группе и в равночисленной группе без специфического лечения до начала (нулевые сутки) и 3-кратно после окончания курса вплоть до 28-х сут роста опухоли. Динамику роста опухоли в обеих группах оценивали на 8, 13, 18, 23 и 28-е сут на фоне и после введения траметиниба. Статистический анализ выполняли с помощью стандартного метода Фишера.

Результаты исследования

Мутацию *NRAS* p. Q61R (с. 182A>G) определяли предварительно в клеточной линии беспигментной меланомы кожи человека mel Ras и затем в полученных нами п/к ксенографтах меланомы кожи человека mel Ras 9-го пассажа со стабильной кинетикой роста на пике экспоненциальной фазы.

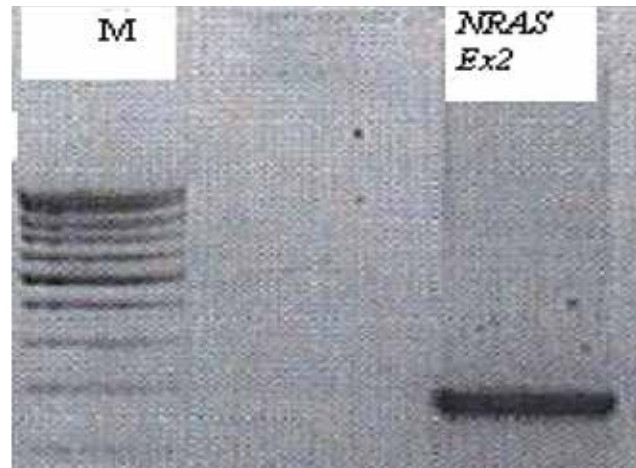


Рис. 1. Результат анализа ампликона (ПЦР-продукта) длиной 143 п. н., соответствующего экзону 2 гена *NRAS* в агарозном геле

По результатам ПЦР геномной ДНК получен ампликон длиной 143 п. н., соответствующий экзону 2 гена *NRAS* (рис. 1). При секвенировании ПЦР-продукта обнаружена мутация *NRAS* p. Q61R (с. 182A>G) (рис. 2).

Оценка прививаемости mel Ras после п/к имплантации разного числа клеток показала, что оптимальной является прививочная доза $1,0 \times 10^7$ клеток на мыш, приводящая к 100 % выходу пальпируемых опухолевых узлов (нулевой пассаж) через 11 сут после имплантации (латентный период) (табл. 1). Повторное пассирование показало, что на ранних пассажах (1–3) рост п/к опухолевых узлов остается относительно медленным: на 12-е сутки $V_{cp} = 14,2 \pm 6,0 \text{ мм}^3$, на 15-е сутки $110,7 \pm 47,0 \text{ мм}^3$. К 20-м сут объем опухоли достиг $675,3 \pm 433,0 \text{ мм}^3$. Соответственно,

Таблица 1. Выбор оптимальной прививочной дозы клеток беспигментной меланомы кожи человека mel Ras для получения подкожных ксенографтов у мышей-самок Balb/c nude на нулевом пассаже

Количество клеток на мыш	Отношение количества мышей с опухолью к общему количеству мышей	Латентный период, сут
$0,1 \times 10^7$	2/3	17
$0,5 \times 10^7$	3/3	12
$1,0 \times 10^7$	6/6	11

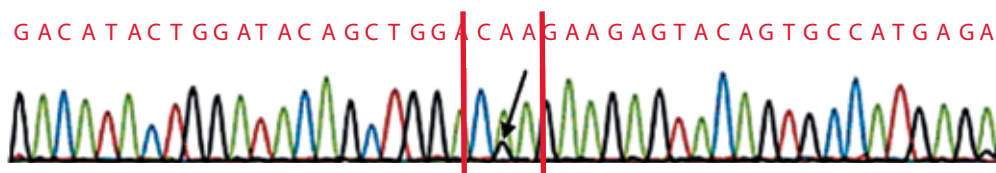


Рис. 2. Результат секвенирования ПЦР-продукта с мутацией *NRAS* p. Q61R (с. 182A>G) в ДНК, выделенной из клеток линии mel Ras и соответствующей экзону 2 гена *NRAS*

фаза экспоненциального роста практически отсутствовала до 20-х суток, а окончательный размер опухоли, несмотря на ее увеличение в 6,1 раза, составил $V_{cp} < 1,0 \text{ см}^3$ (табл. 2).

Таблица 2. Показатели роста подкожных опухолевых узлов беспигментной меланомы кожи человека *mel Ras* у мышей *Balb/c nude* на 1-м пассаже

Номер мыши	Объем п/к опухолевых узлов после трансплантации взвеси, мм ³		
	12-е сутки	15-е сутки	20-е сутки
1	16	72	216
2	20	108	1224
3	15	144	850
4	12	70	252
5	6	90	560
6	16	180	950
Показатель роста опухоли			
V_{cp}^*	14,2 ± 6,0	110,7 ± 47,0	675,3 ± 433,0
V_t/V_{t-1}^{**}	1,0	7,9	6,1

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4: * Средний объем опухоли.

**Соотношение средних объемов опухоли последующего и предыдущего (скорость роста).

На 4-м пассаже динамика роста опухолей прогрессивно изменялась (табл. 3). Латентная фаза сократилась до 7 сут с достижением $V_{cp} = 40,0 \pm 19,0 \text{ мм}^3$, что почти в 3 раза больше объема опухоли 1-го пассажа. Далее на 14-е сутки $V_{cp} = 293,0 \pm 202,0 \text{ мм}^3$ (кратность прироста 7,3), а на 19-е сутки $V_{cp} = 1048,0 \pm 444,0 \text{ мм}^3$, кратность прироста опухоли относительно 1-го пассажа 1,6 раза – соответственно стационарной фазе роста.

Устойчивая динамика роста опухоли, достигнутая к 4-му пассажу, сохранялась до 9-го пассажа с близкими временными характеристиками: латентная фаза – до 8 сут, $V_{cp} = 135,5 \pm 65,0 \text{ мм}^3$; экспоненциальная фаза – до 14 сут, $V_{cp} = 527,6 \pm 174,0 \text{ мм}^3$, стационарная фаза – до 19 сут, $V_{cp} = 1353,7 \pm 543,0 \text{ мм}^3$ (табл. 4).

Гистологическая картина п/к ксенографтов 9-го пассажа на 19-е сутки роста показала, что клеточный состав идентичен культуре клеток беспигментной меланомы кожи человека *mel Ras* (см. рис. 3, 4). Опухоль состоит из полиморфных клеток различных размеров и форм (округлых, овальных, веретенообразных). Ядра крупные, содержат ядрышки. Цитоплазма опухолевых клеток на большинстве участков темная, в отдельных местах светлая. Пигмент в опухолевых клетках не обнаружен. Опухолевые клетки образуют солидные поля, местами формируют тяжи различного размера, ячейки и альвеолярно-подоб-

Таблица 3. Показатели роста подкожных опухолевых узлов беспигментной меланомы кожи человека *mel Ras* у мышей-самок *Balb/c nude* на 4-м пассаже

Номер мыши	Объем п/к опухолевых узлов после трансплантации взвеси, мм ³		
	7	14	19
1	30	330	1008
2	45	300	1440
3	45	560	1680
4	28	100	672
5	24	90	648
6	68	378	840
Показатель роста опухоли			
V_{cp}^*	40 ± 19	293 ± 202	1048 ± 444
V_t/V_{t-1}^{**}	1,0	7,3	3,6

Таблица 4. Показатели роста подкожных опухолевых узлов беспигментной меланомы кожи человека *mel Ras* у мышей-самок *Balb/c nude*, 9-й пассаж

Номер мыши	Объем п/к опухолевых узлов после трансплантации взвеси, мм ³		
	8-е сутки	14-е сутки	19-е сутки
1	100	360	1105
2	90	351	1330
3	140	630	1750
4	135	765	2112
5	108	484	850
6	240	576	975
Показатель роста опухоли			
V_{cp}^*	135,5 ± 65,0	527,6 ± 174,0	1353,7 ± 543,0
V_t/V_{t-1}^{**}	1,0	3,9	2,6

ные структуры, разделенные на отдельные дольки тонкими соединительно-ткаными прослойками. В опухоли встречается много митозов – до 5–7 в так называемых горячих точках. Участки некрозов в опухоли единичные, мелкие. В отдельных местах по периферии опухолевого узла располагается жировая и мышечная ткань, в которую он прорастает. Опухолевый узел крупный, диаметром 0,8–1,0 см. Проведенное гистологическое исследование позволило установить, что штамм *mel Ras* является беспигментной меланомой преимущественно альвеолярно-дольчатого строения с участками солидного типа.

Чувствительность п/к ксенографтов с мутацией *NRAS* установлена при проведении лечения специ-

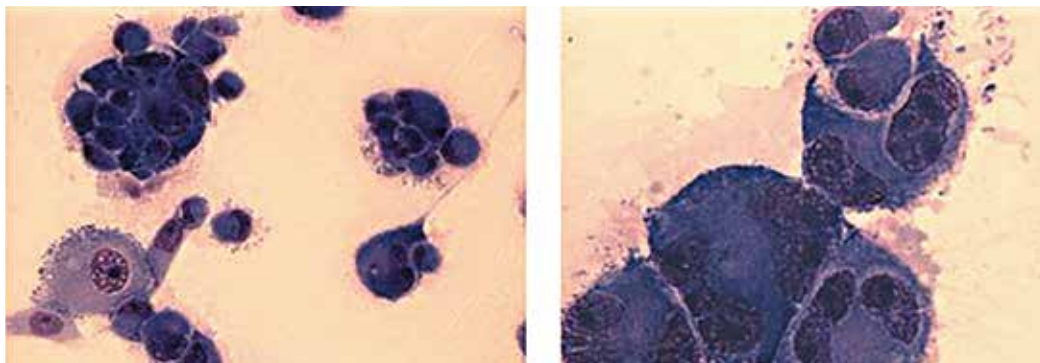


Рис. 3. Цитологическая картина клеточного состава линии клеток беспигментной меланомы кожи человека *mel Ras* (слева $\times 40$, справа $\times 100$)

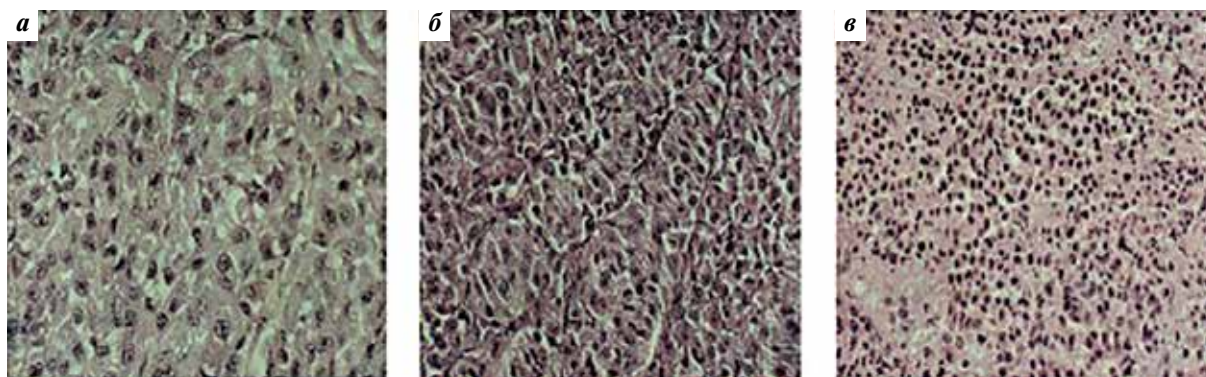


Рис. 4. Гистологическая картина подкожного ксенографта меланомы кожи человека *mel Ras* 9-го пассажа на 19-е сутки роста: а — опухолевые клетки крупные, полиморфные, цитоплазма темная, местами светлая. Клетки образуют солидные скопления. Видно несколько клеток с признаками митоза. $\times 400$; б — опухолевые клетки образуют тяжи, разделенные тонкими соединительно-тканными прослойками. Клетки крупные, местами веретенообразные. Единичные клетки с признаками митоза. $\times 400$; в — опухолевые клетки полиморфные, ядра гиперхромные. Клетки образуют солидные скопления, местами ячейки. $\times 100$

фическим ингибитором *NRAS* траметинибом мышей с п/к ксенографтами 9-го пассажа. Получена полная ремиссия опухоли у всех мышей в течение 11 сут после лечения до гибели мышей с опухолью в группе контроля (рис. 5).

Выводы

- Клеточная линия беспигментной меланомы кожи человека *mel Ras* с проспективно определенной мутацией *NRAS* адаптирована к росту у иммунодефицитных мышей-самок Balb/c

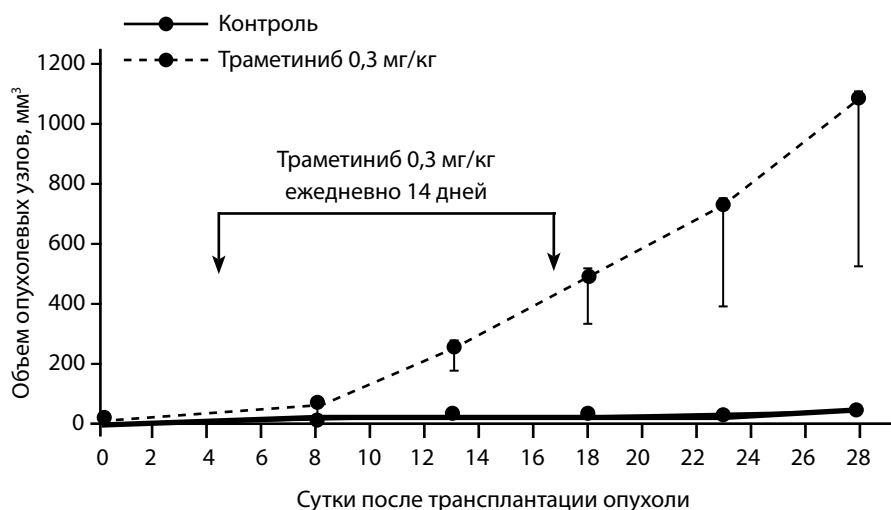


Рис. 5. Полная ремиссия подкожных ксенографтов беспигментной меланомы кожи человека *mel Ras* с мутацией *NRAS* 9-го пассажа под действием 14-суточного курса лечения траметинибом в дозе 0,3 мг/кг

nude в виде п/к ксенографтов идентичного клеточного состава.

- 100 % прививаемость достигается имплантацией 1×10^7 клеток mel Ras (нулевой пассаж).
- Трансплантации 50 мг взвеси опухолевой ткани приводит к устойчивой прививаемости п/к ксенографтов до 9 пассажей *in vivo*.

• Начиная с 4-го пассажа п/к ксенографтов mel Ras кинетика роста стабильна: латентная фаза — до 8 сут, экспоненциальная фаза — до 14 сут и стационарная фаза — до 19 сут с достижением $V_{cr} = 1353,7 \pm 543,0 \text{ мм}^3$.

• Стабильно растущие п/к ксенографты mel Ras высокочувствительны к таргетной терапии ингибитором *NRAS* траметинибом.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Демидов Л.В., Орлова К.В. Индивидуализация лекарственного лечения меланомы кожи. Практическая онкология 2013;14(4):239–46.
2. Albino A., LeStrange R. Transforming Ras genes from human melanoma: a manifestation of tumor heterogeneity? Nature 1984;308(5954):69–72. PMID: 6700714.
3. 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. DOI: 10.1200/JCO.2011.41.2452. PMID: 22614978.
4. Jakob J.A., Bassett R.L. Jr., Ng C.S. et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. Cancer 2012;118(16):4014–23. DOI: 10.1002/cncr.26724. PMID: 22180178.
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. DOI:

- 10.1016/S1470–2045(13)70024-X. PMID: 23414587.
6. Gottardo F., Liu C.G., Ferracin M. et al. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. Urol Oncol 2007;25(5):387–92. doi: 10.1016/j.urolonc.2007.01.019. PMID: 17826655.
7. 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0005717. PMID: 19492075.
8. Posch C., Moslehi H., Feeney L. et al. Combined targeting of MEK and PI3K/mTOR effector pathways is necessary to effectively inhibit NRAS mutant melanoma *in vitro* and *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 2013;110(10):4015–20. DOI: 10.1073/pnas.1216013110. PMID: 23431193.
9. Inma S. Dabrafenib/Trametinib combination approved for advanced melanoma. Published Online: Thursday, January 9, 2014.

<http://www.onclive.com/web-exclusives/FDA-Approves-First-Ever-Combination-for-Metastatic-Melanoma>.

10. Патент РФ № 2402602, 2009. Клеточная линия меланомы человека mel Ras, используемая для получения противоопухолевых вакцин. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В. и др. URL: <http://www.freepatent.ru/patents/2402602>.
11. Трещалина Е.М. Коллекция опухолевых штаммов человека. Под ред. М.И. Давыдова. М., 2009. С. 37–38.
12. Патент РФ № 2364624, 2008. Клеточная линия меланомы человека mel Cher, используемая для получения противоопухолевых вакцин. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В. и др. URL: <http://www.freepatent.ru/patents/2364624>.
13. Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши разведения ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Возможности использования. М., 2010. С. 26.