

СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК БЕСПИГМЕНТНОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ MEL Ibr/BRAF⁺ И ЕЕ СУБКЛОНА К РОСТУ У ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ МЫШЕЙ BALB/C NUDE ПРИ ПОДКОЖНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ

Н.В. Андропова, Л.Ф. Морозова, Н.М. Сураева, А.А. Лушникова, Д.В. Филоненко,
С.М. Ситдикова, И.Н. Михайлова, Е.М. Трещалина

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Сурия Мансуровна Ситдикова suriyasitdikova@yandex.ru

Введение. Лекарственная чувствительность метастатической меланомы кожи (МК) относительно невысока и связана, в том числе, с различной способностью к меланогенезу. Чаще всего (70 % случаев) зависимые от RAF/MEK/ERK сигнального пути терапевтически значимые мутации BRAF обнаруживаются именно в беспигментной МК. В коллекции линий клеток меланомы человека ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России имеется культура беспигментной МК линии *mel Ibr/BRAF⁺* и ее различные субклоны, в том числе *mel Ibr EE/BRAF⁺*, пригодные для создания моделей *in vivo*, необходимых для завершающего этапа доклинического изучения перспективных антимеланомных средств. Адаптация исходной линии и ее субклона направлена на получение такой модели.

Цель исследования — адаптация клеток беспигментной МК человека линии *mel Ibr/BRAF⁺* и ее субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺* к росту у иммунодефицитных мышей *Balb/c nude* при подкожной (п/к) имплантации.

Задачи. Верификация мутации BRAF-V600E в клетках изученных МК; определение числа удвоений клеток для расчета прививочной дозы *in vivo*; оценка прививаемости клеток мышам *Balb/c nude* при п/к имплантации; изучение динамики роста измеряемых п/к опухолевых узлов у мышей *Balb/c nude*.

Материалы и методы. Для адаптации использованы стабильно перевиваемая клеточная линия беспигментной МК человека *mel Ibr/BRAF⁺* и клетки субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺*, прошедшие более 30 пассажей в той же среде со сниженным до 5 % содержанием телячьей эмбриональной сыворотки. Мутацию V600E в экзоне 15 гена BRAF определяли, выделяя геномную ДНК из 3-суточной клеточной культуры с помощью набора «АмплиПрайм® ДНК-сорб-В» по инструкции производителя (ООО «НекстБио», Россия). Для поиска соматических мутаций в экзоне 15 гена BRAF использовали полимеразную цепную реакцию с соответствующими праймерами. Прививочная доза каждого инокулята была выбрана с учетом числа удвоений клеток, которое определяли по отношению количества выросших клеток к количеству рассеянных клеток 1 пассажа. Прививаемость клеток оценивали пальпаторно под визуальным контролем, а динамику роста измеряемых п/к опухолевых узлов — с помощью морфометрии.

Результаты. Показано, что скорость пролиферации клеток исходной линии беспигментной МК человека *mel Ibr/BRAF⁺* в 2 раза меньше, чем у ее субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺*: за 72 ч число удвоений составляет 3 против 6. При имплантации линии *mel Ibr/BRAF⁺* в максимальной для *in vivo* прививочной дозе 1×10^7 клеток на мышь полная прививаемость не достигнута: опухоль появилась у 1 из 2 мышей. При имплантации субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺* в прививочной дозе 3×10^6 клеток на мышь прививка состоялась у всех 3 мышей, прививаемость составила 100 %. Измеряемые п/к опухолевые узлы изученных МК увеличивались с различной динамикой: в случае *mel Ibr/BRAF⁺* без прогрессивного роста, размер солидного узла составил 120 мм³, а в случае *mel Ibr EE/BRAF⁺* 1-й пассаж при коротком латентном периоде (5 дней) дал прогрессивно увеличивающиеся до более чем 20-кратного размера опухолевые узлы с устойчивым экспоненциальным ростом.

Заключение. Адаптационные характеристики к росту *in vivo* отсутствуют у МК линии *mel Ibr/BRAF⁺* и ярко выражены у клеток ее субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺*, что свидетельствует о его пригодности для получения солидной опухоли у мышей *Balb/c nude* без предварительного пассирования на мышах. Полученную модель можно рекомендовать для оценки эффективности многократной цитостатической терапии, направленной в том числе и на мутацию BRAF-V600E и стволовые опухолевые клетки.

Ключевые слова: беспигментная меланома человека, линия клеток *mel Ibr/BRAF⁺*, субклон *mel Ibr EE/BRAF⁺*, прививаемость, динамика роста опухоли

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-60-65

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

N.V. Andronova, L.F. Morozova, N.M. Suraeva, A.A. Lushnikova, D.V. Filonenko, S.M. Sittikova, I.N. Mihailova, H.M. Treshalina
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow 115478, Russia

Introduction. Drug sensitivity of metastatic skin melanoma (SM) is rather low and bound, including, with various ability to a melanogenesis. Most often (70 %) dependent on RAF/MEK/ERK of a signal pathway therapeutic significant BRAF of a mutation are found in the amelanotic SM. In the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia collection of human melanoma cell lines is a culture of amelanotic SM mel Ibr/BRAF⁺ and its various subclones, including, subclone mel Ibr EE/BRAF⁺ suitable for creation of the models in vivo that are necessary for the final stage of preclinical studying perspective antimelanoma agents. Adaptation to the in vivo growth of these cell cultures is directed to receiving such model.

Objective. Adaptation of the cell cultures of these SM to the growth at immunodeficient Balb/c nude mice by the subcutaneous implantation. There were a few positions: BRAF-V600E mutation verification in the cells; definition of number of cell doublings for calculation of an implanted dose for in vivo; implantation ability of SM cells into the Balb/c nude mice by s. c. inoculation; investigation of growth dynamics of measured s. c. tumor nodules in Balb/c nude mice.

Materials and methods. For adaptation are used stable transplanted human SM cell of mel Ibr/BRAF⁺ and the its subclone of mel Ibr EE/BRAF⁺ which passed more than 30 passages in the same environment with the reduced content up to 5 % of fetal serum veal. V600E mutation in an exon of the 15 gene of BRAF was defined in SM cells, emitting genomic DNA from 3-day cell culture by means of the «AmplifyPrime® DNA-sorb-V» set according to the instruction of the producer (NexBio Ltd., Russia). For searching of somatic mutations in an exon of the 15 gene of BRAF used polymerase chain reaction with the corresponding primers. Calculation of a implanted cell dose of each of SM cells is defined according to number of doubling cells, determined at cultivation by the relation of number of the dispelled cells which grew to quantity at a passage. The transplantable ability of the cells was controlled by hands and vision observation, the characteristics of the growth of subcutaneous tumor nodules with calculating of its dynamics was controlled by a morphometry.

Results. It was shown, that proliferation level of mel Ibr/BRAF⁺ was a twice less than at its subclone mel Ibr EE/BRAF⁺: in 72 h the number of doubling makes 3 against 6. At implantation of the mel Ibr/BRAF⁺ in the maximal for in vivo inoculated dose of 1×10^7 cells on mouse the complete transplantable ability was not reached, the tumor left at 1 of 2 mice. At implantation of a subclone of mel Ibr EE/BRAF⁺ in a vaccinating dose 3×10^6 cells on a mouse the inoculation took place at all 3 mice, 100 % transplantable ability was achieved. Measured s. c. tumor nodules of the studied melanomas grew with various dynamics, in case of mel Ibr/BRAF⁺ without malignant progressive, during of 3 weeks after tumor inoculation a volume of solid tumor nodule was only 120 mm³. In case of subclone mel Ibr EE/BRAF⁺ of 1st passage at the short latent period (5 days) gave the tumor nodules which are progressively increasing to more 20-fold size with steady exponential study.

Conclusion. Adaptation characteristics to the in vivo growth are absent at the mel Ibr/BRAF⁺ line and are brightly expressed for cells of a subclone of mel Ibr EE/BRAF⁺ that testifies to its suitability for receiving a solid tumor at Balb/c nude mice without preliminary browning on mice. The received model can be recommended for assessment of effectiveness of multiple cytostatic therapy, including for BRAF-V600E mutation.

Keywords: human amelanotic melanoma of skin, cell cultures, mel Ibr/BRAF⁺, subclone mel Ibr EE/BRAF⁺, transplanted ability, tumor growth dynamics

Введение

В России меланома кожи (МК) относительно мало распространена, однако за 2007–2012 гг. абсолютное число заболевших увеличилось на 23 % среди мужчин и на 16 % среди женщин, причем 25 % впервые диагностированных опухолей уже имели метастазы [1]. Анализ базы данных Национального института рака США (Surveillance, Epidemiology and End Results program, 2006–2010) показывает, что средний возраст пациентов на момент постановки диагноза составляет 61 год [2].

Лекарственная чувствительность метастатической МК относительно невысока и связана с поликлональным характером и прогрессивным ростом клеточной популяции, полиорганном метастазированием и раз-

личной способностью к меланогенезу [3]. Открытые в последние годы молекулярные мишени для таргетной терапии МК (BRAF, NRAS, C-KIT, CTLA4 и др.) улучшили терапевтическую ситуацию, однако в меньшей степени для беспигментной (амеланотической) МК [4, 5]. В МК многочисленные механизмы накопленных мутаций сопряжены с активацией синтеза молекул адгезии (E- и N-кадгерина, α - и β -интегрин, β -катенина, мутации гена рецептора к меланокортину-1 MC1R), поддерживающих процесс канцерогенеза [6].

Тем не менее известно, что терапевтически значимые мутации BRAF, зависимые от сигнального пути RAF/MEK/ERK, обнаруживаются в 70 % случаев именно в беспигментной МК, причем в 89 %

из них опухоль имеет толщину менее 1 мм [7]. Уровень смертности составляет почти 80 %, что обусловлено высоким метастатическим потенциалом опухоли и низким уровнем диагностики именно беспилиментных форм заболевания. В случае наиболее инкурабельной узловой МК это иллюстрируют данные гистологии на фоне малоинформативной цитологии. Показано, что только гистологическое исследование способно выявить умеренно полиморфные опухолевые меланоциты с ядрами и узким ободком розовой цитоплазмы, а также субэпидермальный (инфильтративный) рост атипичных меланоцитов в виде крупноальвеолярных скоплений в беспилиментной МК [8]. В результате наших предварительных исследований сделано предположение о наличии признаков стволовых клеток у полученного субклона.

Перечисленные факторы позволяют считать перспективной разработку новых антимеланомных лекарственных средств, направленных на лечение беспилиментной МК с мутацией BRAF. Последнее невозможно без создания адекватных моделей этой опухоли *in vitro/in vivo*. В недавно созданной коллекции линий клеток меланомы человека, полученных и охарактеризованных в ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» (РОНЦ им. Н. Н. Блохина) Минздрава России, представлены разнообразные культуры МК, пригодные для исследований *in vitro* [9].

Адаптация линий беспилиментной МК с терапевтически значимой мутацией BRAF-V600E к росту у иммунодефицитных мышей направлена на создание моделей *in vivo*, необходимых для завершающего этапа доклинического изучения перспективных антимеланомных средств [10, 11].

Целью исследования была адаптация клеток беспилиментной BRAF-положительной МК человека линии mel Ibr/BRAF⁺ (исходная линия) [12–14] и ее субклона mel Ibr EE/BRAF⁺ [15], клетки которого обладали еще и признаками стволовых опухолевых клеток, к росту у иммунодефицитных мышей Balb/c nude при подкожной (п/к) имплантации.

Задачи: верификация мутации BRAF-V600E в клетках изученных МК; определение числа удвоенных клеток для расчета прививочной дозы *in vivo*; оценка прививаемости клеток МК мышам Balb/c nude при п/к имплантации; изучение динамики роста измеряемых п/к опухолевых узлов у мышей Balb/c nude.

Материалы и методы

В работе использована стабильно перевиваемая клеточная линия МК человека mel Ibr/BRAF⁺, полученная из опухолевого образца метастатического узла пациентки с диссеминированной МК.

Клетки из посевного банка после 30-го пассажа культивировали в среде RPMI-1640 с 10 % телячьей эмбриональной сывороткой (ТЭС), 2 ммоль L-глутамин, гентамицин, пирувата натрия, комплекса аминокислот и витаминов в разведении 1:1000 стандартных концентраций этих препаратов, выпускаемых фирмой «ПанЭко» (Россия). Клетки наращивали в инкубаторе при +37 °С в атмосфере 5 % CO₂ [12].

Субклон mel Ibr EE/BRAF⁺ получен указанным ранее методом [15]. Клетки субклона mel Ibr EE/BRAF⁺, прошедшие более 30 пассажей в той же среде со сниженным до 5 % содержанием ТЭС, использованы в качестве имплантата.

Динамику роста *in vitro* отслеживали по скорости удвоения клеток каждой культуры за фиксированный период времени. Клетки с одинаковой плотностью рассеивали по 1 × 10⁴ и одновременно культивировали в лунках. Через 72 ч подсчитывали прирост клеток. Монослой клеток в лунках обрабатывали раствором Версена, ресуспендировали в 100 мкл ростовой среды и добавляли 100 мкл 0,2 % раствора трипанового синего. В полученном объеме подсчитывали абсолютное количество клеток в лунках по стандартному методу, используя камеру Горяева под световым микроскопом. Число удвоений (2n) определяли по отношению количества выросших клеток (BK) к количеству клеток, рассеянных (PK) при пассаже: 2n = BK/PK.

Мутацию V600E в экзоне 15 гена BRAF в клетках определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на матрице геномной ДНК, выделенной из 3-суточной клеточной культуры с помощью набора «АмплиПрайм® ДНК-сорб-В» по инструкции производителя (ООО «НекстБио», Россия). Для поиска соматических мутаций в экзоне 15 гена BRAF использовали следующие праймеры:

BRAF_Ex15BR_For 5'-CTACTGTTTCTTTACTTACTACAC-3'
BRAF_Ex15BR_Rev 5'-ATCCAGACAACGTGTTCAAACGTATG-3'.

Реакцию амплификации проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 20 нг ДНК, 2,5 Ед Taq-полимеразы, буфер для ПЦР, 3 ммоль хлорида магния, по 200 мкмоль каждого из 4 нуклеотидтрифосфатов, по 0,3 пмоль прямого и обратного праймеров и стерильную деионизированную воду до 25 мкл. Использовали следующий режим ПЦР: 5 мин при +94 °С, затем 35 циклов амплификации (денатурация – 30 с при +94 °С, отжиг праймеров – 30 с при +60 °С, элонгация – 30 с при +72 °С) и финальная элонгация 5 мин при +72 °С.

После разделения в 2 % агарозном геле полоску, соответствующую последовательности экзона 15 гена BRAF длиной 173 пары нуклеотидов (рис. 1), вырезали из геля и выделяли из нее ДНК с помощью набора Wizard®PCR Preps DNA Purification System,

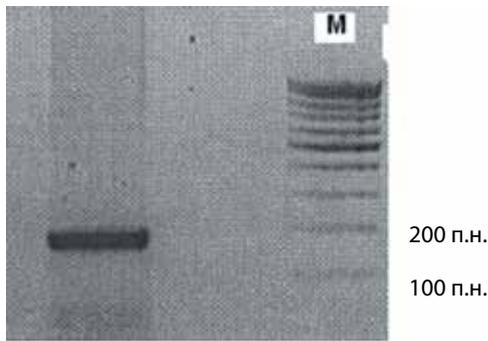


Рис. 1. Анализ продукта полимеразной цепной реакции, соответствующего последовательности экзона 15 гена BRAF, в агарозном геле. М – маркер молекулярного веса

(Promega, США). Затем ПЦР-продукт секвенировали на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США) по протоколам фирмы-производителя. Для анализа результатов ПЦР использовали компьютерные программы Chromas или GeneMapper. Ранее о наличии мутации BRAF-V600E в клетках МК mel Ibr и ее субклона mel Ibr EE не сообщалось.

Для исследований *in vivo* использовали половозрелых иммунодефицитных мышей Balb/c nude в возрасте 6–8 нед, обоего пола, конвенционального содержания [16].

Расчет прививочной дозы каждого инокулята определен в соответствии с числом удвоений, которое определяли эмпирически в соответствии с соотношением количества выросших к количеству рассеянных клеток 1 пассажа ($2n = BK/PK$) [17]

Имплантат в виде отмытых от культуральной среды 0,9 % раствором натрия хлорида клеток (пассаж 0), которые помещали в питательную среду № 199, вводили п/к мышам ($n = 2-3$) по стандартной методике в расчетных прививочных дозах в 0,2 мл питательной среды № 199 [18].

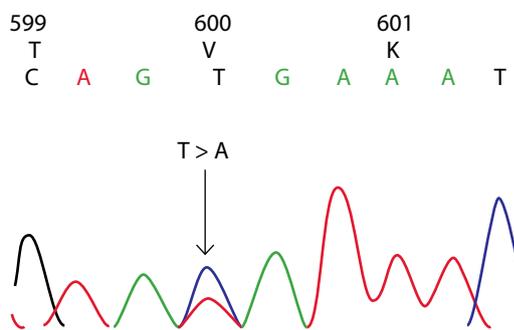


Рис. 2. Анализ мутации BRAF-V600E в клетках беспигментной меланомы кожи человека линии mel Ibr и ее субклона mel Ibr EE/BRAF⁺: мутация 1799T > A, приводящая к замене валина (V) на глутаминовую кислоту (E) в кодоне 600 (V600E, триплет GTG → GAG), показана стрелкой

Прививаемость клеток оценивали пальпаторно под визуальным контролем, динамику роста опухолевых узлов под кожей у мышей – с помощью морфометрии. Измеряли индивидуальный (V_0 , V_t) и вычисляли средний объем (V_{cp}) опухоли, а также скорость роста, которую определяли по соотношению средних величин V_t/V_0 в малочисленных группах; об экспоненциальной фазе роста судили по $V_t/V_0 \geq 3,0$.

Все манипуляции с имплантацией клеток МК человека выполняли под ламинаром (Lamsystems LS 240.120.00, Россия) с соблюдением асептики и антисептики. Манипуляции с лабораторными животными выполняли с соблюдением требований гуманного обращения, принятых в России [19, 20].

Результаты

В результате ПЦР на матрице геномной ДНК, выделенной из клеток беспигментной МК человека линии mel Ibr и ее субклона mel Ibr EE/BRAF⁺, была выявлена мутация 1799T > A, приводящая к замене валина на глутаминовую кислоту в кодоне 600 (V600E) (рис. 1, 2).

Определение числа удвоений показало, что за 72 ч клетки линии mel Ibr/BRAF⁺ прошли 3 удвоения, а клетки субклона mel Ibr EE/BRAF⁺ – 6 удвоений. Соответственно для имплантации мышам клеток mel Ibr/BRAF⁺ была рекомендована максимальная *in vivo* прививочная доза 1×10^7 клеток на мышь, а для имплантации клеток субклона mel Ibr EE/BRAF⁺ – достаточно небольшая прививочная доза 3×10^6 клеток на мышь.

Прививаемость клеток линии mel Ibr/BRAF⁺

После имплантации 1×10^7 клеток (пассаж 0) у 1 из 2 мышей на 12-е сутки (латентная фаза) появилась пальпируемая опухоль, которая к 20-м суткам роста достигла объема (V) 120 мм³ (стабильная фаза). Повторная трансплантация была невозможна из-за недостатка опухолевого материала. Таким образом, неполная прививаемость этой линии клеток с длительным развитием относительно небольшого п/к узла свидетельствует об отсутствии адаптации к росту *in vivo* при использованной прививочной дозе.

Прививаемость клеток субклона mel Ibr EE/BRAF⁺

После имплантации 3×10^6 клеток (пассаж 0) мышам ($n = 3$) на 5-е сутки (латентная фаза) у всех мышей появились опухолевые узлы диаметром 2–3 мм (пассаж 1). На 8-е сутки роста опухолевые узлы мышей достигли объемов (V_0) 16, 25 и 70 мм³ ($V_{cp} = 37$ мм³). На 12-е сутки роста опухолевые узлы мышей достигли объемов (V_t) 60, 144 и 324 мм³ ($V_{cp} = 176$ мм³), скорость роста (V_t/V_0) составила 4,8, что свидетельствует о начале экспоненциальной фазы с прогрессивным увеличением объема более

Таблица 1. Прививаемость клеток беспигментной меланомы кожи человека субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺* при подкожной имплантации мышам *Balb/c nude*

Показатели роста*	Объем опухолевого узла (мм ³) на сутки после имплантации (пассаж 1)			
	8	12	17	21
V_{cp}	37	176	654	1085
V_t/V_0	1,0	4,8	17,7	29,3

Примечание. *В малочисленных группах разброс не определяли.

Таблица 2. Динамика роста опухолевых узлов субклона меланомы человека *mel Ibr EE/BRAF⁺* при подкожной имплантации мышам *Balb/c nude*

Линия меланомы	Число клеток на мышь	Число мышей	Число мышей с опухолями на 12-й день	Латентный период (дни)
<i>mel Ibr/BRAF⁺</i>	1×10^7	2	1	11
<i>mel Ibr EE/BRAF⁺</i>	3×10^6	3	3	5

чем в 3 раза за 4 дня. На 17-е сутки роста опухолевые узлы мышей достигли объемов (V_t) 270, 672 и 1020 мм³ ($V_{cp} = 654$ мм³), скорость роста (V_t/V_0) составила 17,7; на 21-е сутки роста опухолевые узлы мышей достигли объемов (V_t) 540, 1120 и 1596 мм³ ($V_{cp} = 1085$ мм³), скорость роста (V_t/V_0) составила 29,3. Увеличение объема более чем в 10 раз в течение 5 дней свидетельствует о пике экспоненциальной фазы роста (табл. 1, 2).

Заключение

Известно, что лекарственная чувствительность метастатической МК относительно невысока и связана, в том числе, с различной способностью к меланогенезу. Чаще всего (70 % случаев) зависимые от RAF/MEK/ERK сигнального пути терапевтически значимые мутации BRAF обнаруживаются именно в беспигментной МК. В коллекции линий клеток меланомы человека ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохи-

на» Минздрава России имеется культура беспигментной *mel Ibr/BRAF⁺* и ее различные субклоны, в том числе *mel Ibr EE/BRAF⁺*, обладающие свойствами стволовых опухолевых клеток и пригодные для создания моделей *in vivo*, необходимых для завершающего этапа доклинического изучения перспективных антимиеланомных средств. Адаптация исходной линии и ее субклона направлена на получение такой модели. Целью исследования была адаптация клеток беспигментной *mel Ibr/BRAF⁺* и ее субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺* к росту у иммунодефицитных мышей *Balb/c nude* при п/к имплантации.

Результаты исследования показали, что скорость пролиферации клеток исходной линии беспигментной МК человека *mel Ibr/BRAF⁺* в 2 раза меньше, чем у ее субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺*: за 72 ч число удвоений составляет 3 против 6. При имплантации линии *mel Ibr/BRAF⁺* в максимальной для *in vivo* прививочной дозе 1×10^7 клеток на мышь полная прививаемость не достигнута. При имплантации субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺* в прививочной дозе 3×10^6 клеток на мышь прививка состоялась у всех 3 мышей, прививаемость составила 100 %. Измеряемые п/к опухолевые узлы *mel Ibr/BRAF⁺* не достигли прогрессивного роста, а 1-й пассаж субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺* дал высокую прогрессию с устойчивым экспоненциальным ростом и короткой латентной фазой.

Таким образом, адаптационные характеристики к росту *in vivo* отсутствуют у линии *mel Ibr/BRAF⁺* и ярко выражены у клеток субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺*, что свидетельствует о его пригодности для получения солидной опухоли у мышей *Balb/c nude* без предварительного пассирования на мышах. По нашему мнению, намного больший объем и более высокая скорость роста узлов, при меньшей в 3 раза дозе имплантированных клеток субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺* по сравнению с исходной линией, связаны с наличием в данном субклоне большего числа клоногенных клеток, что еще раз подтверждает их причастность к стволовым опухолевым клеткам. Полученную модель можно рекомендовать для оценки эффективности многократной цитостатической терапии, направленной в том числе и на мутацию BRAF-V600E.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 году. М.: Издательская группа РОНЦ, 2014. 226 с.
2. Howlader N., Noone A.M., Krapcho M. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2010. Bethesda: National Cancer Institute, 2012. DOI: 10.3322/саас.21262.
3. Демидов Л.В., Утяшев И.А., Харкевич Г.Ю. Подходы к диагностике и терапии меланомы кожи: эра персонализированной медицины. Consilium medicum (приложение) 2013;2–3:42–7.
4. Chakraborty R., Wieland C.N., Comfere N.I. Molecular targeted therapies in metastatic melanoma. Pharmgenomics

- Pers Med 2013;6:49–56.
DOI: 10.2147/PGPM.S44800.
PMID:23843700.
5. Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В., Лушников А.А. и др. Спектр мутаций онкогенов различается в субтипах меланомы кожи. Молекулярная биология 2015;49(6):1022–9.
 6. Фицпатрик Т., Джонсон Р., Вульф К. и др. Дерматология. Атлас-справочник. Пер. с англ. М.: Практика, 1999. С. 385–391.
 7. Мазуренко Н.Н. Генетические особенности и маркеры меланомы кожи. Успехи молекулярной биологии 2014;2:26–35.
 8. Снарская Е.С., Аветисян К.М., Андрюхина В.В. Беспигментная узловатая меланома кожи голени. Российский журнал кожных и венерических болезней. Дерматоонкология 2014;2:4–7.
 9. Коллекция клеточных линий меланомы человека. Под ред. И.Н. Михайловой, А.Ю. Барышников. М.: Издательская группа РОНЦ, 2016. 109 с.
 10. Walker G.J., Soyer H.P., Terzian T., Voh N.F. Modelling melanoma in mice. Pigment Cell Melanoma Res 2011;24(6):1158–76.
DOI: 10.1111/j.1755-148X.2011.00923.x.
PMID: 21985222.
 11. Андрюхина Н.В., Морозова Л.Ф., Михайлова И.Н. и др. Моделирование подкожного ксенографта меланомы кожи человека mel Cher с мутацией V600E BRAF на иммунодефицитных мышцах для доклинического изучения таргетных противоопухолевых средств. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(4):58–64.
 12. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Морозова Л.Ф. и др. Клеточная линия меланомы человека mel Ibr, используемая для получения противоопухолевых вакцин. Патент РФ № 2287576, 2006.
 13. 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;1(37):29–39.
 14. Голубцова Н.В., Степанова Е.В., Бармашов А.Е. и др. Определение специфических противоопухолевых антигенов у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии. Российский биотерапевтический журнал 2012;3(11):25–7.
 15. Сураева Н.М., Морозова Л.Ф., Самоилов А.В. и др. Изменение морфологических и иммунологических характеристик клеток меланомной линии (mel Ibr) в результате воздействия куринового эмбрионального экстракта. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2015;159(4):521–4.
 16. Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши разведения ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Возможности использования. М.: Издательская группа РОНЦ, 2010. 16 с.
 17. Гаврилов Л.А., Гаврилова Н.С. Поиск механизмов, определяющих продолжительность жизни. Предел клеточных делений – ключ к механизму детерминации продолжительности жизни? В кн.: Биология продолжительности жизни. М.: Наука, 1991. С. 183–194.
 18. Трещалина Е.М., Андрюхина Н.В., Гарин А.М. Доклиническое изучение противоопухолевых препаратов. В кн.: Рациональная фармакотерапия. М.: Литтерра, 2015. С. 75–82.
 19. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, ЕЭС, Страсбург, 1985. Ланималогия 1993;1:29.
 20. Большаков О.П. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. ВОЗ, 2000. Рекомендации комитетам по этике, проводящим экспертизу биомедицинских исследований. Качественная клиническая практика 2002;9:1–15.
PMID: 27296126.