

A microscopic image showing numerous human melanoma cells. The cells are characterized by large, dark, round nuclei and prominent, irregular borders. They are arranged in clusters and some show cytoplasmic extensions. The background is a light, uniform color.

КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
им. Н. Н. Блохина»

КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Монография

Под общей редакцией Михайловой И. Н., Давыдова М. М.

Санкт-Петербург
Наукоемкие технологии
2017

УДК 616.5-006.81

ББК 55.6

К 48

Рецензенты:

д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ Киселевский М. В.
д.м.н. Балдуева И. А.

Авторы:

Барышников А. Ю., Бурова О. С., Воронина Е. С., Голубева В. А.,
Давыдов М. М., Демидов Л. В., Григорьева И. Н., Жердева В. В.,
Ковалевский Д. А., Куликова К. В., Куравский М. Л., Лушникова А. А.,
Мазуренко Н. Н., Меерович И. Г., Михайлова И. Н., Морозова Л. Ф.,
Муронец В. И., Самойленко И. В., Синельников И. Е., Трещалина Е. М.,
Савицкий А. П., Севостьянова И. А., Цыганова И. В., Шмальгаузен Е. В.

К 48 Клеточные линии меланомы человека. Монография / Под общ. ред.
И. Н. Михайловой, М. М. Давыдова. – СПб.: Научное издательство «Лань»,
2017. – 174 с.: ил. – Авт. указаны на обороте тит. л.

ISBN 978-5-9909412-3-6

В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России создана коллекция клеточных линий меланомы человека, полученная от российских пациентов. Отличительная особенность этой коллекции – наличие в ней линий меланомы с различной степенью дифференцировки клеток, что позволяет рассматривать онкологический процесс в динамике и использовать эти линии для создания противоопухолевых вакцин и научных исследований. Создание этой коллекции – результат многолетнего труда многих ученых, работающих в сферах как экспериментальной, так и клинической онкологии.

Настоящая книга представляет собой описание коллекции клеточных линий меланомы кожи человека, охарактеризованных по основным биологическим параметрам, необходимым для решения задач фундаментальной и практической онкологии. Книга предназначена для специалистов, занимающихся исследованиями в области диагностики и лечения меланомы, в т.ч., в области разработки новых антимеланомных лекарственных средств.

ISBN 978-5-9909412-3-6

УДК 616.5-006.81

ББК 55.6

© Михайлова И. Н., Давыдов М. М., 2017

© Оформление. Издательство «Научное издательство «Лань», 2017

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BM	– Васкулогенная мимикрия
ГМ-КСФ/	– Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимули-
GM-CSF	рующий фактор
ДК	– Дендритные клетки
ИГХ	– Иммуногистохимия
ИФА	– Иммуноферментный анализ
ИЛ/IL	– Интерлейкин
МКА	– Моноклональные антитела
ПЦР	– Полимеразная цепная реакция
СПС	– Сосудистоподобные структуры
ЦТЛ	– Цитотоксические Т-лимфоциты
ФДТ	– Фотодинамическая терапия
HLA	– Human Leukocyte Antigen – главный комплекс гисто- совместимости у человека
GAPD	– Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
MHC	– Major Histocompatibility Complex – главный комплекс гистосовместимости
РТА	– Cancer-testis antigen – раково-тестикулярный антиген
PAS	– Гистохимический метод выявления гликогена

ОГЛАВЛЕНИЕ

Авторы	6
Предисловие.....	9
Введение.	
Давыдов М. М.	
Клеточные линии.....	11
Глава 1.	
Михайлова И. Н, Морозова Л. Ф., Голубева В. А., Бурова О. С., Синельников И. Е., Самойленко И. В., Давыдов М. М., Барышников А. Ю.	
Получение и культивирование клеточных линий меланомы кожи	15
Глава 2.	
Воронина Е. С., Морозова Л. Ф.	
Кариотип клеточных линий меланомы человека	20
Глава 3.	
Морозова Л. Ф., Бурова О. С., Ковалевский Д. А., Михайлова И. Н., Барышников А. Ю.	
Фенотип клеточных линий меланомы.....	25
Глава 4.	
Мазуренко Н. Н., Цыганова И. В., Лушников А. А., Морозова Л. Ф.	
Генотип клеточных линий меланомы.....	36
Глава 5.	
Григорьева И. Н.	
Васкулогенная мимикрия клеток меланомы.....	44
Глава 6.	
Меерович И. Г., Жердева В. В., Трещалина Е. М., Барышников А. Ю., Савицкий А. П.	
Флуоресцирующая клеточная линия <i>mel Kor-TurboRFP</i>	58
Глава 7.	
Михайлова И. Н.	
Трансфицированные линии <i>mel P</i> и <i>mel Kor</i>	67
Глава 8.	
Михайлова И. Н., Демидов Л. В., Барышников А. Ю.	
Цельноклеточные вакцины «Аллоген» и «Мелавак».....	70
Глава 9.	
Муронец В.И, Куравский М. Л., Севостьянова И. А., Куликова К. В., Шмальгаузен Е. В.	
Экспрессия спермоспецифичной глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы в меланомных клетках	74

Глава 10.

Давыдов М.М., Самойленко И.В.

Доклинические исследования современных иммунотерапевтических средств	100
Приложение 1. Клеточные линии меланомы человека.....	110
Клеточная линия меланомы человека <i>mel P</i>	110
Клеточная линия меланомы человека <i>mel Kor</i>	114
Клеточная линия меланомы человека <i>mel Il</i>	118
Клеточная линия меланомы человека <i>mel Ibr</i>	122
Клеточная линия меланомы человека <i>mel Mtp</i>	126
Клеточная линия меланомы человека <i>mel Is</i>	130
Клеточная линия меланомы человека <i>mel Si</i>	134
Клеточная линия меланомы человека <i>mel Gus</i>	138
Клеточная линия меланомы человека <i>mel Cher</i>	142
Клеточная линия меланомы человека <i>mel Ch</i>	146
Клеточная линия меланомы человека <i>mel Me</i>	150
Клеточная линия меланомы человека <i>mel Z</i>	154
Клеточная линия меланомы человека <i>mel Rac</i>	158
Клеточная линия меланомы человека <i>mel H</i>	162
Клеточная линия меланомы человека <i>mel Bgf</i>	166
Клеточная линия меланомы человека <i>mel Ksen</i>	170

АВТОРЫ

Барышников А. Ю. – профессор, д.м.н., директор ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, зав. лаб. экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей.

Бурова О. С. – к.б.н., старший научный сотрудник лаб. экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России.

Воронина Е. С. – к.м.н., ученый секретарь ФГБНУ "Медико-генетический научный центр".

Голубева В. А. – к.б.н., научный сотрудник лаб. экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России.

Давыдов М. М. – д.м.н., член-корреспондент РАН, директор НИИ КО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России.

Демидов Л. В. – профессор, д.м.н., зав.отд. биотерапии опухолей, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России.

Григорьева И. Н. – к.м.н., врач-оториноларинголог, Институт Аллергологии и Клинической Иммунологии.

Жердева В. В. – к.б.н., старший научный сотрудник лаб. физической биохимии, Институт биохимии им. А. Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии».

Ковалевский Д. А. – к.б.н., научный сотрудник лаб. геномной инженерии, ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России.

Куликова К. В. – к.б.н., научный сотрудник лаб. геномной терапии, Институт биологии гена РАН.

Куравский М. Л. – к.б.н., научный сотрудник отд. биохимии животной клетки, НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова.

Лушникова А. А. – д.б.н., ведущий научный сотрудник лаб. Онкогеномики, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России.

Мазуренко Н. Н. – профессор, д.б.н., зав.лаб. онкогеномики, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России.

Меерович И. Г. – к.х.н., научный сотрудник лаб. физической биохимии, Институт биохимии им. А. Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии».

Михайлова И. Н. – д.м.н., ведущий научный сотрудник отд. биотерапии опухолей, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России.

Морозова Л. Ф. – к.б.н., старший научный сотрудник лаб. экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России.

Муронец В. И. – профессор, д.б.н., зав.отд. биохимии животной клетки, НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова.

Самойленко И. В. – к.м.н., старший научный сотрудник отд. биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России.

Синельников И. Е. – к.м.н., ассистент кафедры онкологии лечебного факультета, ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Трещалина Е. М. – профессор, д.м.н., зав. лаб. комбинированной терапии опухолей, ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России.

Савицкий А. П. – профессор, д.х.н., зав. лаб. физической биохимии, Институт биохимии им. А. Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии».

Севостьянова И. А. – к.б.н., доцент, факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова.

Цыганова И. В. – к.б.н., научный сотрудник лаб. Онкогеномики, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России.

Шмальгаузен Е. В. – к.б.н., ведущий научный сотрудник отд. биохимии животной клетки, НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского, МГУ им. М. В. Ломоносова.

*Книга посвящается
УЧИТЕЛЮ, УЧЕНОМУ
Барышникову Анатолию Юрьевичу
С любовью и благодарностью!*

ПРЕДИСЛОВИЕ*

В течение последних десятилетий медицинская наука значительно продвинулась в понимании патофизиологии злокачественного роста, особенно после обнаружения различных молекулярных и клеточных мишеней для мишень-направленных («таргетных») препаратов. Как следствие, в свою очередь, интенсивное развитие получила экспериментальная онкология в плане разработки новых моделей и методов лечения и лекарственных препаратов, обеспечивших в XXI веке прорыв в лечении. В результате, наряду с утвердившимися классическими противоопухолевыми цитостатиками, в практику онкологии вошли таргетные препараты, противоопухолевые вакцины, технологии модулирования иммунного ответа и генетические модификации опухолевых клеток – вот неполный перечень того, что уже стало или становится реальностью.

Быстрое развитие медицинской науки обуславливает появление новых требований к изучаемым опухолям и экспериментальным моделям. Для исследования опухолевой клетки, для создания противоопухолевых препаратов и оценки эффективности разрабатываемых методик воздействия на клетку используются клеточные линии опухолей, созданные и поддерживаемые в онкологических институтах развитых стран мира.

Меланома кожи – одна из злокачественных опухолей, известных человечеству с древнейших времен. Впервые описанная еще в Древнем Египте, она и по сей день остается актуальной проблемой медицины. Заболеваемость меланомой кожи постоянно растет. Ежегодно в странах США и Западной Европы меланомой кожи болеет около 160 000 человек, около 8 000 заболевает ей в России. Лечение заболевших пациентов представляет собой сложную задачу ввиду высокой агрессивности опухоли и ее устойчивости к лекарственной терапии.

* Автор: Трещалина Е. М.

Создание таргетных и биологических препаратов против метастатической меланомы – одна из современных приоритетных задач экспериментальной и клинической онкологии, и выполнение этой задачи невозможно без создания адекватных экспериментальных моделей – как для изучения самой опухоли, так и для испытания на этих моделях новых активных противоопухолевых молекул и иных методов воздействия на опухолевые клетки.

В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России создана коллекция клеточных линий меланомы человека, полученная от российских пациентов. Отличительная особенность этой коллекции – наличие в ней линий меланомы с различной степенью дифференцировки клеток, что позволяет рассматривать онкологический процесс в динамике и использовать эти линии для создания противоопухолевых вакцин, исследований различных параметров опухолевого роста и изучения прогностических факторов развития меланомы у пациентов. Создание этой коллекции – результат многолетнего труда многих ученых, работающих в сферах как экспериментальной, так и клинической онкологии, и, безусловно, наличие такой коллекции в России – важная веха развития отечественной науки и медицины.

Настоящая книга представляет собой описание коллекции клеточных линий меланомы кожи человека, полученных от пациентов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, охарактеризованных по основным биологическим параметрам, необходимым для решения задач фундаментальной и практической онкологии. Эта коллекция предназначена для специалистов, занимающихся исследованиями в области диагностики и лечения меланомы, в т. ч. в области разработки новых антимеланомных лекарственных средств.

Введение.

КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ*

Культивирование тканей – процесс, который интересует человечество не одно столетие. Пионерами в этой области являются:

- А. Карел (A. Carrel, 1873-1944, США), разработавший эту методику настолько, что применение её стало возможным даже в скромной лаборатории и для ткани любого позвоночного животного;
- В. Ру (W. Roux, 1850-1924, Германия), выделил отдельные клетки из развивающегося зародыша;
- М. Борн (M. Born, Германия), экспериментировал с органами лягушки;
- Л. Леб, (L. Loeb, 1869-1959, Германия), для поддержания роста ткани применил в 1897 г. свернувшуюся кровь и лимфу;
- Ф. Гаррисон, (F. Harrison, 1851-1907, США) впервые приготовил в 1907 г. тканевую культуру *in vitro*;
- Берроус (Berrows), заменил в 1910 г. лимфу плазмой [1].

Различают первичные культуры и клеточные линии

Первичная культура – это культура, полученная непосредственно из организма. Она считается таковой до первого пересева (пассажа), после чего становится клеточной линией.

Клеточная линия исходно может быть получена из популяции клеток, а также из единичных клеток.

Если *клеточная линия* происходит из *единичной клетки*, то её называют *клоновой*, или *клоном*. Клеточные линии могут иметь ограниченный срок жизни *in vitro* (диплоидные фибробласты человека или других животных), а могут размножаться *in vitro* неограниченно долго (постоянные линии – *permanent* или *continuous cell lines*; [2]).

В 1951 г. впервые была получена бессмертная клеточная линия,

* Автор: Давыдов М. М.

известная в настоящее время как линия *HeLa*, полученная от пациентки Генриетты Лакс (Henriette Lax), страдавшей раком шейки матки. С использованием этой клеточной линии проводятся научные и практические работы. «Так получилось, что Генриетта умерла именно в тот день, когда Джордж Гей, её лечащий врач, выступал перед телевизионными камерами, держа в руках пробирку с её клетками, и заявил, что началась новая эпоха в медицинских исследованиях – эпоха новых перспектив в поиске лекарств и исследовании жизни» [3].

За прошедшие полвека получены десятки клеточных линий, касающихся как различных нозологий, так и непосредственно меланомы человека. Созданы коллекции клеточных культур (*cells culture collections*), которые широко распространены во всем мире, такие как ATCC; ECACC; ECCC; Российская коллекция клеточных культур, в которой и хранятся представленные ниже линии меланомы кожи человека.

Клеточные культуры были использованы в производстве противовирусных вакцин, некоторые из которых применяют до настоящего времени:

- культура почек макаки-резус (*Macaca mulatta*) для производства вакцины против полиомиелита;
- культура почек сирийского хомячка (*Mesocricetus auratus*) – вакцины против японского энцефалита;
- культура фибробластов из эмбрионов цыплят – вакцин против вирусов кори и паротита;
- человеческие лимфобластные клетки (*Namalwa*) в качестве клеточного субстрата в получении биологического продукта *in vitro* предложены в 1970-х гг. для производства интерферона и многие другие.

Отличительной особенностью настоящей коллекции является тот факт, что она представлена линиями меланомы кожи человека с различным уровнем дифференцировки клеток. Это отражается в их биологических параметрах и позволяет рассматривать злокачественный процесс в динамике. За период с 2000 г. по настоящее время получены и охарактеризованы следующие клеточные линии меланомы человека: *mel P*, *mel Kor*, *mel Mtp*, *mel Il*, *mel Is*, *mel Si*, *mel Me*, *mel Gus*, *mel Z*, *mel Ksen*, *mel Hn*, *mel Gi*, *mel Ibr*, *mel R*, *mel Rac*, *mel Ch*, *mel Bgf*, *mel H*, *mel Cher*, которые используют как в

научных, так и практических целях – в создании противоопухолевых вакцин:

- получение и характеристика клеточных линий меланомы кожи человека; 2011 [4];
- исследования экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов; 2010 [5];
- создание клеточных линий *mel Kor* и *mel P*, секретирующих GM-CSF и tag 7; 2009 [6; 7];
- изучение роли неканонической молекулы главного комплекса гистосовместимости человека HLA-E в регуляции противоопухолевого иммунного ответа; 2006 [8];
- спектрально-флуоресцентные свойства – KFP и использование этого белка для создания сенсоров, основанных на индуктивно-резонансном переносе энергии; 2010 [9];
- изучение васкулогенной мимикрии; 2011 [10];
- разработка цельноклеточных антимеланомных вакцин *mel Kor* и *mel P*, секретирующих GM-CSF и tag 7; 2012 [11];
- получение флуоресцирующей клеточной линии *mel Kor-TurboRFP*; 2012 [12];
- разработка ЛПФ противомеланомной вакцины; 2012 [13];
- изучение влияния ФНО на цитотоксичность и индукцию апоптоза противоопухолевыми препаратами; 2012 [14];
- влияние WNT-лигандов на формирование фенотипа клеточных линий меланомы человека; 2012 [15].

Список литературы

1. Румянцев А. В. Культуры тканей вне организма и их значение в биологии. М., 1932.
2. Никольский Н. Н., Вахтин Ю. Б., Игнатова Т. Н. и др. Биология клетки в культуре. Л.: Наука, 1984. – 280 с.
3. Старокодомская А. Бессмертные клетки Генриетты Лакс // Биомолекула. 2010. URL: <https://biomolecula.ru/articles/bessmertnyye-kletki-genrietty-laks> (дата обращения: 21.09.2017).
4. Бурова О. С. Получение и характеристика клеточных линий меланомы человека для создания противоопухолевых вакцин: дис. ... канд. биол. наук: 14.01.12. – М., 2010. – 120 с.
5. Ковалевский Д. А. Экспрессия генов раково-тестикулярных антигенов при меланоме кожи человека: дис. ... канд. биол. наук: 14.01.12, 03.01.04. – М., 2010. – 123 с.

6. Михайлова И. Н., Демидов Л. В., Барышников А. Ю., Киселев С. Л., Ларин С. С., Георгиев Г. П. и др. Клинические испытания аутологичной вакцины на основе опухолевых клеток, модифицированных геном tag 7. // Сибирский онкологический журнал. 2005. № 1(13). – С. 23–27.

7. Бережной А. Е., Ларин С. С., Гнучев Н. В., Георгиев Г. П., Захарова Е. С., Барышников А. Ю., Демидов Л. В., Михайлова И. Н., Бурова О. С., Морозова Л. Ф., Козлов А. М. Линия клеток меланомы человека KG, секретирующих рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор // Патент России № 2362805. 27.07.2009.

8. Закеева И. Р. Изучение роли неканонической молекулы главного комплекса гистосовместимости человека HLA-E в регуляции противоопухолевого иммунного ответа: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.03. – М., 2006.

9. Русанов А. Л. Спектрально-флуоресцентные свойства KFP и использование этого белка для создания сенсоров, основанных на индуктивно-резонансном переносе энергии: Автореф. дис. ... канд. хим. наук: 03.01.04. – М., 2010.

10. Григорьева И. Н. Васкулогенная мимикрия при меланоме кожи: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.12. – М., 2011. – 112 с.

11. Михайлова И. Н. Стратегия создания цельноклеточных антимеланомных вакцин: дис. ... док. мед. наук: 14.01.12. – М., 2012. – 223 с.

12. Меерович И. Г., Жердева В. В., Арсланбаева Л. Р., Савицкий А. П., Бурова О. С., Михайлова И. Н., Морозова Л. Ф., Барышников А. Ю. Флуоресцирующая клеточная линия mel Kog-TurboRFP и способ её использования для исследований *in vitro* в экспериментальной онкологии // Патент России № 2458123. 10.08.2012.

13. Михайлова Т. В. Разработка липосомальной лекарственной формы противомеланомной вакцины: Автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.01. – М., 2012.

14. Бигвава Х. А. Влияние фактора некроза опухоли на цитотоксичность и индукцию апоптоза противоопухолевыми препаратами на клеточных линиях меланом: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.01.12. – М., 2012.

15. Куликова К. В. Влияние WNT лигандов на формирование фенотипа клеточных линий меланомы человека: дис. ... канд. биол. наук: 03.01.03. – М., 2012. – 124 с.

Глава 1.

ПОЛУЧЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ^{1*}

Клеточные линии культивируют в смеси питательных сред RPMI (80%), ТЭС (20%), L-глутамина, 1%-го HEPES, гентамицина, комплекса аминокислот и витаминов (Flow Lab., USA) В культуральные флаконы объемом 25 см³ в 5 мл среды засевают 1×10^6 клеток. Температура культивирования + 37 °С. Монослой клеток формируется через 3–4 дня. При посевной концентрации 70-100 тыс. клеток/мл монослой формируется на 2–3 сутки без смены среды. Клетки снимают с использованием стандартных растворов (0,25%-й р-р трипсина и 0,02%-й р-р Версена) в соотношении 1 : 1. При посевной концентрации 500 000 клеток/мл индекс пролиферации через 48 ч культивирования составляет 3,6–4,6.

Условия криоконсервации

Для длительного хранения клетки консервируют путем замораживания в жидком азоте. Клетки ресуспендируют в среде для замораживания (RPMI (80%), ТЭС (20%), ДМСО 10%). Режим замораживания: жидкий азот, снижение температуры на 1 °С в минуту до –25 °С, затем быстрое замораживание до –70 °С. Хранение в жидком азоте при температуре –196 °С. Размораживание быстрое, при +37 °С. Клетки разводят в 10 мл бессывороточной среды и осаждают центрифугированием, ресуспендируют в 5 мл той же среды, содержащей 10% ТЭС, и переносят в культуральный флакон объемом 25 см³. Жизнеспособность клеток оценивают по включению трипанового синего. Жизнеспособность клеток после размораживания должна составлять не менее 90%.

** Авторы: Михайлова И.Н., Морозова Л. Ф., Голубева В. А., Бурова О. С., Синельников И. Е., Самойленко И. В., Давыдов М. М., Барышников А. Ю.*

Контаминация

При длительном наблюдении бактерии и грибы в культуре не обнаружены. Тест на наличие микоплазм отрицателен.

Характеристика полученных культур меланомных клеток

Культура, прошедшая не менее 20 пассажей, рассматривалась нами в дальнейшем как клеточная линия. Получено 19 стабильно растущих клеточных линий меланомы кожи человека. Каждой клеточной линии было дано название, которое соответствовало первым буквам фамилии или имени отчества пациента, за исключением одной, *mel P* (табл. 1.1). Количество пассажей, указанных в таблице, соответствует моменту депонирования клеточной линии.

Таблица 1.1.

Клеточные линии меланомы кожи человека

Линия	Инициалы больного	Дата получения первичного материала	Количество пассажей
<i>mel P</i>	Т.А.А.	27.01.99	>100
<i>mel Kor</i>	К. Г.А.	06.12.02	>100
<i>mel Mtp</i>	М.Т.П.	15.01.02	35
<i>mel Il</i>	И.А.И.	02.04.01	>100
<i>mel Is</i>	И.Л.В.	16.01.04	30
<i>mel Si</i>	С.И.А.	19.03.03	30
<i>mel Me</i>	М.Е.А.	22.11.02	25
<i>mel Gus</i>	Г.М.К.	13.01.04	30
<i>mel Z</i>	З.З.С.	26.06.03	28
<i>mel Ksen</i>	К.Н.С.	07.06.01	25
<i>mel Hn</i>	Х.Л.А.	19.11.04	20
<i>mel Gi</i>	Ж.А.И.	11.09.01	30
<i>mel Ibr</i>	И.А.У.	24.01.01	>100
<i>mel R</i>	Р.	29.06.99	25
<i>mel Rac</i>	Р.Д.М.	15.03.02	30
<i>mel Ch</i>	Ч.Н.Г.	06.12.02	30
<i>mel Bgf</i>	Б.Г.Ф.	09.04.03	30
<i>mel H</i>	Х.Н.С.	27.09.01	20
<i>mel Cher</i>	Ч.Н.О.	16.04.03	30

Цитоморфология клеточных линий

Из образцов, которые были взяты у 19 пациентов различных отделений НИИ КО РОНЦ с диагнозом «метастатическая меланома

кожи», получено 19 стабильно растущих клеточных линий. Они различны как по характеру роста в культуре, так и по цитоморфологическим признакам. Большинство культур имели монослойный характер роста пласта. Нередко наблюдается образование колоний, являющихся центром роста клеточного монослоя. Отдельные клеточные линии имеют полусуспензионный характер роста: часть клеток росла, прикрепляясь к поверхности пластика, а часть из них оставалась во взвешенном состоянии (рис.1.1).



Рис. 1.1. Клеточная линия *mel Gi* (фото культуры, $\times 100$)

Изучение цитограмм клеточных линий выявило разнообразие цитоморфологической характеристики опухолевых клеток. Преимущественно клеточные линии состоят из клеток трех видов: эпителиоподобных, веретенообразных, невусоподобных или их сочетаний. Линии различаются:

- по степени полиморфизма и атипии;
- по количеству пигмента, митозов, гигантских многоядерных и одноядерных клеток.

В некоторых линиях (из эпителиоподобных клеток) присутствует большое количество гигантских многоядерных клеток, беспорядочно разбросанных среди одноядерных клеточных элементов.

Одна из эпителиоподобных клеточных линий, *mel R*, состоит

преимущественно из перстневидноподобных клеток различного размера, частично – из клеток с ядрами округлой и овальной форм с 1-3 митозами в поле зрения.

Цитограммы веретенноклеточной меланомы характеризуются клетками вытянутой и веретенообразной формы с короткими или длинными отростками цитоплазмы, иногда переплетающимися с другими цитоплазматическими волоконцами. В небольшом количестве присутствуют многоядерные клетки с 3–5 ядрами, которые отличаются по строению от гигантских многоядерных клеток эпителиоподобной меланомы.

Встречаются клеточные линии, состоящие из невосоподобных клеток. В них обнаруживаются средние и мелкие клетки овальной, удлинённой и многоотростчатой форм. Среди полученных клеточных линий пигмент в цитоплазме присутствовал в четырех культурах.

В цитограммах линий клеточные элементы с морфологическими признаками лимфоцитов не обнаружено.

В результате цитоморфологического исследования выделено три группы, классифицированные как (табл. 1.2):

- высокодифференцированные;
- умеренно дифференцированные;
- низкодифференцированные.

Высокотифференцированные клеточные линии *mel Si*, *mel Me* представлены относительно мономорфными клетками небольшого размера, с небольшим количеством гигантских многоядерных клеток; митозы практически отсутствуют.

Умеренно дифференцированные *mel Bgf*, *mel Il*, *mel P*, *mel R*, *mel Ksen*, *mel Z*, *mel Hn* представлены полиморфными клетками: мелкими средними и крупными; с интенсивно базофильной цитоплазмой, без четких контуров или с фестончатыми краями с эксцентрично или центрально расположенными ядрами с грубоглыбчатым гиперхромным хроматином и одним, редко – 2–3 ядрышками. Гигантские многоядерные клетки немногочисленны; умеренное количество клеток находится в митозе.

Низкодифференцированные клеточные линии *mel Kor*, *mel Gus*, *mel Mtp*, *mel Is*, *mel Gi*, *mel Ibr*, *mel Cher*, *mel Ch*, *mel H*, *mel Rac* представлены резко полиморфными клетками, с множеством гигантских уродливых клеток и ядер. Выявлено большое количество округлых, овальных, удлинённых, неправильных ядер с неровными контурами.

Хроматин грубо глыбчатый, ядерная оболочка утолщена и неровная; ядрышки в количестве от одного до шести в ядре; выраженная гиперхромия. Отмечены атипичные многочисленные митозы.

Таблица 1.2.

Степень дифференцировки опухолевых клеток полученных линий

Степень дифференцировки	Количество линий	Название линии
Высокая	2	<i>mel Si; mel Me</i>
Умеренная	7	<i>mel Bgf; mel Il; mel P; mel R; mel Ksen; mel Z; mel Hn</i>
Низкая	10	<i>mel Cher; mel Rac; mel Kor; mel Mtp; mel Gus; mel Is; mel Ibr; mel Gi; mel Ch; mel H</i>

Получено 19 клеточных линий, адаптированных к росту *in vitro* из метастатических образцов меланомы человека. Клеточные линии обладают стабильными культуральными и морфологическими характеристиками. Для исследования клеточных линий использованы методы иммуофлюоресценции, иммуногистохимии, ПЦР. Клеточные линии прошли более 30 пассажей, это характеризует их (клетки) как обладающие неограниченным жизненным потенциалом. Это позволило создать рабочий и посевной банк стабильно растущих клеточных линий. Клеточные линии хранятся в банке криоконсервации биоматериалов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России в жидком азоте при температуре – 196 °С в созданном рабочем и посевном банке. 16 клеточных линий хранятся в специализированной коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Глава 2.

КАРИОТИП КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА*

В последнее время стало очевидно, что не только для лейкозов, но и для ряда других опухолей значение в практической медицине имеет выявление цитогенетических аномалий.

Во-первых, выявление кариотипически аномального клона почти всегда свидетельствует о злокачественности опухоли.

Во-вторых, некоторые генетические аномалии характерны для определенных заболеваний, что помогает в дифференциальной диагностике.

В-третьих, результаты цитогенетического анализа опухоли помогают в прогнозе, а иногда – и в выборе тактики лечения.

В клеточных линиях меланомы обнаружены разнообразные хромосомные нарушения. Некоторые являются специфичными для меланомы, что связано с наличием в перестроенных хромосомах генов, участвующих в инициации или прогрессии меланомы. Другие встречаются в клетках разных типов опухолей.

Так, например, в локусе 9p21 расположен ген-супрессор опухоли CDKN2A (p16), который играет роль при многих злокачественных новообразованиях. Он кодирует белок, участвующий в регуляции клеточного цикла и клеточного старения.

Потеря гетерозиготности в этом локусе обнаружена не только в тканях меланомы, но и в диспластических невусах, и даже в доброкачественных невусах. Это означает, что потерю гетерозиготности в этом локусе можно выявить даже в предполагаемых предраковых очагах, т. е. до появления гистологических признаков опухоли. Кроме того, мутации этого гена характерны для семейной меланомы.

* Авторы: Воронина Е. С., Морозова Л. Ф.

Нарушения хромосомы 10 часто встречаются в клетках меланомы человека, чаще всего это потеря целой хромосомы. Показано, что локус на длинном плече хромосомы 10 дистальнее 10q23.1 содержит ген-супрессор опухоли PTEN (фосфатаза), который отвечает за сильное торможение кинетики формирования меланомы. В свою очередь, участок на коротком плече 10p15.3 также оказывает эффект на рост меланомы *in vivo*, хотя и менее выраженный (эта область содержит ген-супрессор и для других опухолей, рака простаты и глиобластомы). Таким образом, потеря обоих участков, возникающая при моносомии по хромосоме 10, приводит к более значимому ускорению роста, чем при потере одного из локусов [1].

Потеря длинного плеча хромосомы 6 и, следовательно, локуса 6q22, в котором находится ген WISP3, приводит к гиперэкспрессии Rhoс ГТФ-азы, необходимой для метастазирования и инвазии опухолевых клеток. Часто потеря длинного плеча сочетается с увеличением копий короткого плеча хромосомы 6, где локализован ген NEDD9 (6p24.1), отвечающий за метастазирование меланомы.

Некоторые генные нарушения ассоциированы с метастазированием опухоли и низкой выживаемостью. В частности, рецепторы тирозинкиназ играют важную роль при различных злокачественных новообразованиях. Один из них – рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) – может вызывать или усиливать злокачественную трансформацию клеток при меланоме. Ген EGFR расположен на хромосоме 7 в районе 7p12.3-p12.1. Кроме того, повышение экспрессии данного гена может играть важную роль в метастазировании меланомы, т. к. по сравнению с первичной опухолью, экспрессия гена в метастазах выше. Это отражается полисомией по хромосоме 7, также более выраженной в метастазах. При наличии в клетках опухоли перестроек, затрагивающих хромосомы 7 или 11, выживаемость пациентов ниже по сравнению с теми, в опухолях которых эти хромосомы нормальные [2].

В настоящее время для исследования опухолей все чаще используются молекулярно-цитогенетические методы, такие как флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) и сравнительная геномная гибридизация (CGH). FISH на интерфазных клетках используется для изучения выявленных ранее хромосомных аномалий в опухолях хорошо изученных типов. Для исследования новых случаев больше преимуществ имеет метод CGH. Однако, несмотря на методические трудности, классическое цитогенетическое исследование опухолей,

в том числе меланомы, позволяет получить данные, которые не дают FISH или CGH.

Проведено цитогенетическое исследование 19 клеточных линий меланомы различной степени дифференцировки. Фиксацию клеток проводили стандартным способом. Готовые препараты окрашивали по G-методу.

Все изученные культуры характеризовались измененным хромосомным набором – как по числу хромосом, так и по структуре последних. Модальное число хромосом соответствовало околодиплоидному и околотриплоидному. В некоторых культурах встречались клетки с удвоенным по сравнению с основным пулом клеток числом хромосом (тетра- и гексаплоидные). Эти культуры характеризовались различающимися диаметрами ядер при одних и тех же плотности окраски и состоянии хроматина, характерных для интерфазных ядер. Принимая во внимание дублированность структурных аномалий хромосом (например, кольцевой хромосомы), можно утверждать: речь идет не о двух различных линиях клеток в одной культуре, а о повышенной ploидности в них.

При кариотипировании выявлено, что в высокодифференцированных клеточных линиях *mel Me*, *mel Si* модальное число хромосом соответствовало околодиплоидному набору (46–49 в клетках культуры *mel Si* и 47–50 в *mel Me*). Общее число идентифицированных хромосомных повреждений, включая структурные и числовые (анеусомии), составило в обеих культурах 4 на 1 клетку. В умереннодифференцированных клеточных линиях *mel Il*, *mel P*, *mel Bgf* число обнаруженных хромосомных аномалий в культурах составило от 5 до 7 на 1 клетку; линии были различной ploидности: ди-, три- и тетраплоидные. В низкодифференцированных клеточных линиях (*mel Kor*, *mel Gus*, *mel Mtp*, *mel Is*, *mel Gi*, *mel Ibr*, *mel Cher*, *mel Ch*, *mel H*, *mel Rac*) в 6 культурах модальное число хромосом соответствовало триплоидному набору, в 3 – тетраплоидному и 1 была околодиплоидной. Число идентифицированных структурных и числовых хромосомных аномалий в большинстве низкодифференцированных культур было больше 5 на 1 клетку, в частности, в диплоидной культуре *mel Gus* достигло 11. Меньшее количество выявленных нарушений в некоторых линиях связано с затрудненным анализом метафаз с большим количеством хромосом, а также малым количеством митозов в некоторых культурах. Обнаружен также высокий

уровень нестабильных хромосомных aberrаций: хроматидные обмены, ди- и трицентрические хромосомы, кольцевые хромосомы, клетки с множественными aberrациями. Среди крайне разнообразных числовых и структурных хромосомных нарушений (транслокации, делеции, дупликации, инверсии, кольцевые хромосомы, изохромосомы, маркерные хромосомы), некоторые встречались с высоким постоянством, в том числе: полисомия по хромосоме 7, полисомия по короткому плечу хромосомы 6, моносомия по короткому плечу хромосомы 9, различные транслокации с участием хромосомы 1.

Таблица 2.1.

Кариотип клеточных линий меланомы

Линия	Кариотип*
<i>mel P</i>	75~85<4n>, XXYY, der(4)t(4;21)(p12;q21)x2, del(6)(p22)x2, der(9)t(1;9)(q22;p21)x2, add(9)(p21)x2, add(20)(q13)x2, inc
<i>mel Kor</i>	64~84<3n>
<i>mel Mtp</i>	61~71<3n>, XXX, add(1)(p36), add(1)(p36), add(B)(q34-35), add(14)(p11), inc
<i>mel Il</i>	56~61<3n>, XX, -Y, +1, +del(1)(q21), +add(2)(q37.3), der(9;14)(q10;q10)x2, +15, der(15;22)(q10;q10)x2, add(17)(q25), +20, der(20)t(7;20)(q11;p12)x3, +22, +1~2mar, inc
<i>mel Is</i>	58~74<3n>, XXY, i(1)(q10), i(7)(q10), del(11)(q22), add(12)(p12), der(21)t(2;21)(q12;p11.2), der(?;5)(?;q10), inc
<i>mel Si</i>	46~49<2n>, XX, +2, dup(15)(q21q26.2), +2mar, inc
<i>mel Me</i>	47~50<2n>, XY, der(1)add(1)(p36)add(1)(q43), +2, +7, r(15), inc
<i>mel Gus</i>	48~52<2n>, XY, +1, +2, +3, dup(4)(q31.2q35), der(6)t(6;?)(p10;?), +7, der(7;9)(p10;q10), del(11)(q22), ?dup(17)(q22q24), +F, +22, inc
<i>mel Z</i>	44~46, XX, der(1;1;9)(1pter→1p31::1p36→1p10::9q10→9qter), i(1)(qter→q10::q10→qter), der(6;9)(6pter→6p10::9q10→9qter), t(6;17)(6pter→6q22::17q24→17qter; 17pter→17q24::6q22→6qter), +7, -11, inc
<i>mel Ksen</i>	45~48<2n>, X, -X, +der(1)t(1;5)(p32;q21), del(5)(q12)x2, i(6)(p10), +der(7)t(7;?)(p10;?), -10, der(15;21)(q10;q10), +mar, inc
<i>mel Hn</i>	58~75<3n>[54]/<6n>[13]
<i>mel Gi</i>	81~87<4n>, X, -X, -X, -X, -1, +7, i(7)(q10)x2, der(20)t(1;20)(q12;q13), add(20)(q11.2)x2, i(21)(q10), +2mar, inc
<i>mel Ibr</i>	71~84<3n>, XX, add(X)(q28), del(1)(p21), del(1)(q12), +7, +7, +7, i(21)(q10), inc
<i>mel R</i>	55~69<3n>, XXX, +1, der(9;?)(q10;?), der(14;?)(q10;?), der(15;?)(q10;?), add(19)(?q13.4), inc
<i>mel Rac</i>	70~84<3n>XX, -Y, add(1)(p36), +add(1)(p36), del(6)(q21)x2, i(7)(q10)x2, der(9;14)(q10;q10), +der(?)t(?;1)(?;q12)x2, +2~3mar, inc[22]/70~84<3n>, YY, -X, +3, add(5)(q35), add(9)(p21), inc[11]

Линия	Кариотип*
<i>mel Ch</i>	81~85<4n>, XXXX, del(1)(q11~12), del(1)(q32)×2, i(1)(q10)×3, i(6)(p10)×3, +7, add(20)(q13), +mar, inc
<i>mel Bgf</i>	64~78<3n>, XXX, der(1)t(1;?)(q11;?)t(?;1)(?;p21)×2, del(3)(p12)×2, der(5)t(1;5)(p13;q11)×2, i(7)(p10)×2, add(9)(p21)×2, der(19)t(1;19)(q12;p12)×2, add(22)(p11.2)×2, inc
<i>mel H</i>	54~65<3n>, XX, -Y, der(13;15)(q10;q10), add(Dq), inv(16)(p11q12), add(19)(q13.4), inc
<i>Mel Cher</i>	85~92<4n>, XXYY, del(4)(p12), i(7)(q10), add(9)(p21)×2, inc
*Кариотип представлен в соответствии с международной номенклатурой ISCN 2013 [3].	

Список литературы

1. Kwong L. N., Chin L. Chromosome 10, frequently lost in human melanoma, encodes multiple tumor-suppressive functions // Cancer Research. 2014. Vol. 74(6). P. 1814-1821.
2. Moore S.R., Persons D.L., Sosman J.A., et al. Detection of copy number alterations in metastatic melanoma by a DNA fluorescence in situ hybridization probe panel and array comparative genomic hybridization: a Southwest Oncology Group Study (S9431) // Clinical Cancer Research. 2008. Vol. 14. P. 2927–2935.
3. Shaffer L.G., McGowan-Jordan J., Schmid M. ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature (2013) / editors, Lisa G. Shaffer, Jean McGowan-Jordan, Michael Schmid. – S. Karger. Basel, 2013. – 140 p.

Глава 3.

ФЕНОТИП КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ МЕЛАНОМЫ*

Меланома считается «антигенной опухолью», экспрессирующей опухолеассоциированные антигены. Среди них довольно хорошо изученные – это группа дифференцировочных антигенов – родословно-специфические антигены, экспрессирующиеся как в опухолевых клетках, так и в нормальных клетках на определенных этапах развития. При этом в опухолевых клетках экспрессия дифференцировочных антигенов обычно повышается. При меланоме они экспрессируются на протяжении всех стадий опухолевой прогрессии от меланоцитов до меланомных клеток. Большинство дифференцировочных антигенов вовлечены в процесс синтеза меланина [1]. Некоторые меланомодифференцировочные антигены узнаются Т-клетками иммунной системы, например, тирозиназа (TYR) [2], gp100 (SILV) [3], MART-1 (MLANA) и TRP-1 (TYRP1) [4]. К опухолеассоциированным антигенам также относится группа раково-тестикулярных генов. С иммунологической точки зрения РТА могут быть хорошими мишенями для иммунотерапии опухолей, поскольку в нормальных тканях эта группа антигенов не экспрессируется (за исключением ткани яичек, которые недоступны для клеток иммунной системы из-за отсутствия их прямого контакта с иммунокомпетентными клетками [5] и отсутствия на них экспрессии антигенов HLA I класса [6]). В отличие от РТА, иммуногенность дифференцировочных антигенов меланоцитов невысока из-за иммунологической толерантности к этим "своим" антигенам, за исключением гена MLANA, антиген которого содержит несколько эпитопов для узнавания ЦТЛ и способен индуцировать генерацию меланомо-специфичных ЦТЛ. Таким образом, экспрессия различных опухолевых

* Авторы: Морозова Л. Ф., Бурова О. С., Ковалевский Д. А., Михайлова И. Н., Барышников А. Ю.

маркеров играет одну из ключевых ролей в индукции противоопухолевого иммунитета.

С помощью методов ИФА, ИГХ, ПЦР-анализа полученные нами клеточные линии исследованы на различные группы антигенов. РТА исследованы в реакции ПЦР. Антигены гистосовместимости определены с помощью моноклональных антител в реакции ИФА. Дифференцировочные меланомные маркеры исследованы с помощью МКА (табл. 3.1).

Таблица 3.1.

Дифференцировочные меланомные антигены,
РТА и АГ гистосовместимости

Маркеры, используемые в реакции ПЦР, иммунофлюоресценции, иммуногистохимии	Функции
CD63	Дифференцировочный
HMB45	Дифференцировочный
Melan A	Дифференцировочный
Tyrosinase	Дифференцировочный
HMW	Дифференцировочный
MAGE-3 и др.	Семейство раково-эпителиальных генов/антигенов
HLA(I класс) HLA-DR(II класс)	Антигены гистосовместимости первого и второго класса

Дифференцировочные меланомные маркеры, определяющие отношение данной линии к меланоме, исследованы с помощью МКА CD63, HMB45, MelanA, Tyrosinase, HMW. Иммуноцитохимическое исследование проведено на 19 клеточных линиях меланомы.

Для дальнейшей характеристики клеток были приготовлены цитологические препараты. Экспрессию всех исследованных маркеров наблюдали в цитоплазме клеток с различной интенсивностью окрашивания.

Отсутствие окрашивания и слабое окрашивание принимали за негативную реакцию, окрашивание со средней и сильной интенсивностью – за положительную реакцию.

Экспрессию CD63 наблюдали во всех исследованных образцах (100%), MelanA/MART1 и тиразиназе в 7 из 19 образцов, HMB45 – в 11 из 19 образцов (табл. 3.2).

Таблица 3.2.

Экспрессия дифференцировочных антигенов

Линия	CD63	Melan A	HMB45	Тирозиназа
<i>mel P</i>	pos*	neg**	pos	neg
<i>mel Kor</i>	pos	pos	pos	pos
<i>mel Mtp</i>	pos	neg	neg	neg
<i>mel Il</i>	pos	pos	pos	pos
<i>mel Is</i>	pos	pos	pos	pos (слабо)
<i>mel Si</i>	pos	neg	pos	pos
<i>mel Me</i>	pos	pos	pos	neg
<i>mel Gus</i>	pos	pos	pos	neg
<i>mel Z</i>	pos	pos	pos	pos
<i>mel Ksen</i>	pos	neg	pos	neg
<i>mel Hn</i>	pos	pos	pos (слабо)	pos
<i>mel Gi</i>	pos	neg	neg	neg
<i>mel Ibr</i>	pos	neg	neg	neg
<i>mel R</i>	pos	neg	neg	neg
<i>mel Rac</i>	pos	neg	neg	neg
<i>mel Ch</i>	pos	neg	neg	neg
<i>mel Bgf</i>	pos	neg	neg	neg
<i>mel H</i>	pos	neg	neg	neg
<i>mel Cher</i>	pos	neg	pos	pos
*pos – положительная реакция; ** neg – отрицательная реакция				

С помощью проточно-цитометрического анализа определен иммунофенотип клеток меланомы. На поверхности всех клеток, культивируемых клеточных линий, отсутствовали лимфоидные маркеры Т- и В-лимфоцитов (CD3 и CD20; табл. 3.3).

Все 19 клеточных линий, за исключением *mel Kor* экспрессировали антиген гистосовместимости первого класса (HLA-ABC). В 13 из 19 случаев отмечена экспрессия антигена гистосовместимости второго класса (14,3–97,8% антигенположительных клеток). При этом линия *mel Kor*, не имеющая антигена гистосовместимости первого класса, также не имела антиген гистосовместимости второго класса.

Экспрессия CD86 была оценена в 19 образцах (табл. 3.4), при этом положительная реакция отмечена лишь в одном (линия *mel P*) случае.

Экспрессия CD80 была оценена в 19 образцах (табл. 3.4), при этом положительная реакция отмечена в 9 случаях (10–24,4% антигенположительных клеток).

Таблица 3.3.

Иммунологический фенотип культивируемых клеточных линий

Линия	F(ab) ₂	CD3	CD20	HLA-ABC	HLA-DR
<i>mel P</i>	0,2±0,1	0,1±0,2	0,2±0,1	92,7±5,5	2,3±1,5
<i>mel Kor</i>	0,1±0,1	0,4±0,1	0,4±0,1	0,8±0,3	0,5±0,3
<i>mel Mtp</i>	0,4±0,2	0,9±0,2	1,0±0,2	94,0±5,0	70,8±7,5
<i>mel Il</i>	1,2±0,5	0,1±0,2	0,9±0,2	94,4±3,0	3,0±1,1
<i>mel Is</i>	0,5±0,2	1,2±0,1	0,6±0,3	72,6±10,6	25,9±1,5
<i>mel Si</i>	0,1±0,1	0,5±0,1	0,1±0,1	88,6±10,1	91,1±5,1
<i>mel Me</i>	0,2±0,1	0,5±0,1	0,3±0,1	88,7±6,5	36,7±7,0
<i>mel Gus</i>	1,4±0,7	1,5±0,3	0,7±0,3	93,1±5,3	93,9±3,1
<i>mel Z</i>	1±0,5	2,4±0,5	0,3±0,5	93,3±6,4	4,4±1,2
<i>mel Ksen</i>	1,0±0,3	1,9±0,4	0,8±0,4	81,3±13,7	94,7±3,1
<i>mel Hn</i>	0,4±0,2	0,6±0,2	0,4±0,2	70,4±18,9	19,5±3,4
<i>mel Gi</i>	2,1±0,7	2,8±0,5	1,6±0,5	89,8±5,0	34,8±2,2
<i>mel Ibr</i>	1,0±0,5	1,8±0,3	1,8±0,3	88,6±10,4	46,7±1,3
<i>mel R</i>	0,8±0,4	0,5±0,4	0,1±0,4	80,7±5,1	3,0±1,5
<i>mel Rac</i>	2,1±0,2	1,6±0,4	1,6±0,4	84,5±9,4	63,2±3,5
<i>mel Ch</i>	0,3±0,1	1,0±0,2	0,5±0,5	82,5±14,0	25,1±1,5
<i>mel Bgf</i>	0,7±0,3	0,9±0,3	1,9±0,3	76,1±11,6	14,3±2,3
<i>mel H</i>	0,2±0,1	0,6±0,1	0,6±0,1	84,8±14,5	6,9±1,5
<i>mel Cher</i>	1,2±0,5	1,2±0,5	1,0±0,5	85,7±9,5	61,0±3,5

Клеточная линия *mel P* экспрессировала обе молекулы, CD86 и CD80. Все исследованные клеточные линии экспрессировали на своей поверхности антиген CD54, молекулу адгезии ICAM-1, лиганд для LFA-1 и MAC-1, табл. 3.4.

При использовании МКА ICO218 к меланомаассоциированному антигену (HMW), полученному в НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина, положительная экспрессия HMW выявлена в 10 из 14 (71,4%) образцов клеточных линий (табл. 3.4.).

Методом иммунофлюоресценции на клеточных линиях *mel Mtp*, *mel Il*, *mel Ras*, *mel P*, *mel Is*, *mel Kor*, *mel Cher*, *mel Ibr* исследована экспрессия белков, контролирующих апоптоз в клетке, одни из которых индуцируют программированную клеточную гибель, а другие ингибируют её: белки семейства bcl-2 и антиген CD95, (рис. 3.1).

Таблица 3.4.

Иммунологический фенотип культивируемых клеточных линий

Линия	F(ab) ₂	CD54	CD80	CD86	ICO218 (HMW)
<i>mel P</i>	0,2±0,1	64,0±5,5	14,4±0,9	21,5±0,7	89,5±3,5
<i>mel Kor</i>	0,1±0,1	88,7±3,2	3,3±1,0	0,3±0,1	79,2±5,5
<i>mel Mtp</i>	0,4±0,2	11,1±3,5	7,1±0,5	0,7±0,1	59,7±10,3
<i>mel Il</i>	1,2±0,5	65,3±2,4	24,4±3,2	0,6±0,3	46,9±5,1
<i>mel Is</i>	0,5±0,2	67,8±3,2	16,7±0,5	1,5±0,1	н/о
<i>mel Si</i>	0,1±0,1	86,8±2,0	8,1±0,6	0,3±0,1	62,0±3,5
<i>mel Me</i>	0,2±0,1	50,5±1,5	14,4±0,4	0,6±0,1	10,5±0,5
<i>mel Gus</i>	1,4±0,7	76,5±3,5	10,0±1,2	2,7±0,2	н/о
<i>mel Z</i>	1±0,5	42,6±1,7	9,1±1,7	1,0±0,1	н/о
<i>mel Ksen</i>	1,0±0,3	87,2±2,3	4,4±2,2	0,9±0,1	н/о
<i>mel Hn</i>	0,4±0,2	80,6±1,5	7,3±1,5	0,4±0,2	н/о
<i>mel Gi</i>	2,1±0,7	35,7±5,0	5,1±1,1	0,1±0,1	91,8±2,5
<i>mel Ibr</i>	1,0±0,5	90,4±1,3	7,3±1,6	1,6±0,5	66,8±7,2
<i>mel R</i>	0,8±0,4	73,6±2,5	6,2±2,0	2,4±0,2	78,2±8,2
<i>mel Rac</i>	2,1±0,2	41,7±1,1	17,9±1,5	0,3±0,1	60,0±7,6
<i>mel Ch</i>	0,3±0,1	71,9±1,7	1,0±0,5	0,2±0,1	78,1±5,5
<i>mel Bgf</i>	0,7±0,3	83,7±1,2	3,3±1,5	0,8±0,2	11,7±0,3
<i>mel H</i>	0,2±0,1	76,3±1,5	2,0±0,8	0,4±0,1	11,7±0,1
<i>mel Cher</i>	1,2±0,5	62,3±2,1	12,2±0,2	3,9±0,3	6,5±4,5
н/о – не определяли					

Маркер апоптоза антиген CD95 экспрессируется на всех восьми исследованных клеточных линиях меланом, кроме одной, *mel Mtp* [1].

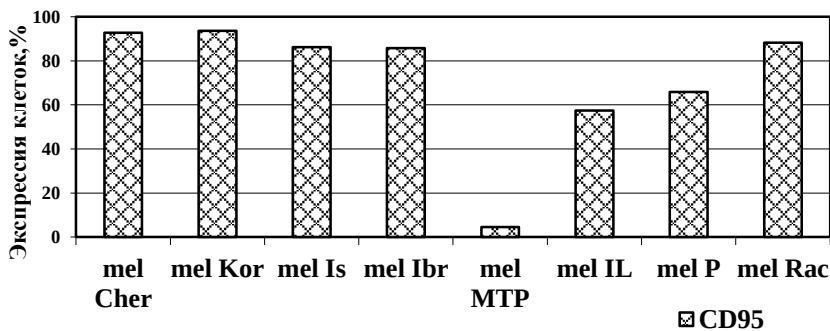


Рис. 3.1. Экспрессия CD95 на клеточных линиях меланомы [1]

Экспрессия *bcl-2* и *baх* на различных клеточных линиях варьирует от $12,0 \pm 1,4\%$ до $39,1 \pm 0,9\%$ и от $23,4 \pm 1,1\%$ до $94,4 \pm 2,6\%$ соответственно; с наименьшей экспрессией на клеточной линии *mel Mtp* (белок *bcl-2* – $1,7 \pm 0,2\%$, проапоптотический *baх* – $18,5 \pm 0,5\%$) (рис. 3.2) [1].

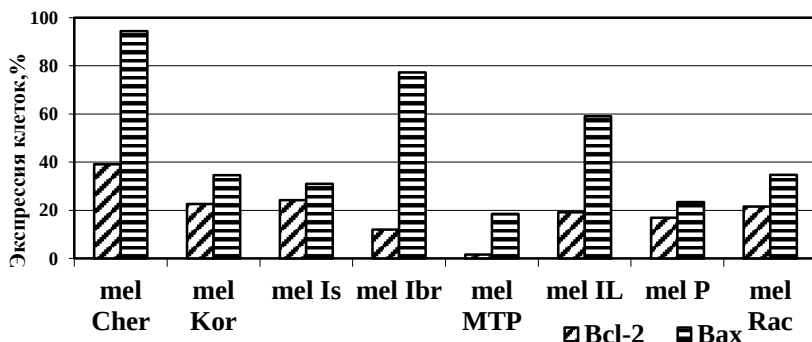


Рис. 3.2. Экспрессия *bcl-2* и *baх* на клеточных линиях меланомы [1]

Исследование экспрессии генов на клеточных линиях выполнено с помощью ПЦР [2]. Показано, что наиболее распространенным является ген *S100b*, который экспрессирован в 18 из 19 (95%) линий клеток. Реже встречается экспрессия гена *SILV* – в 16 из 19 (84%) линий клеток, гена *TYR* – в 15 из 19 линий клеток (79%) и гена *MLAN* – в 14 из 19 линий клеток (74%). Раково-тестикулярные гены экспрессированы более неоднородно: *MAGE A2* выявлен на 18 из 19 линий клеток (95%), а *MAGE B2* – только в 7 случаях (37%).

Экспрессию антигенов гистосовместимости I (HLA-A, B, C) и II (HLA-DR) класса смотрели в динамике на 10, 20 и > 30 пассажей (табл. 3.5; [3]). Только на одной из 19 клеточных линий при исследовании десятого пассажа отсутствовал антиген гистосовместимости первого класса (*mel Kor*). На этой линии также отсутствовал антиген гистосовместимости второго класса, что выявлялось и при исследовании последующих пассажей.

Количество АГ⁺ клеток HLA-A, B, C на 10 пассаже всех клеточных линиях колебалось от 43 до 99,3%. После длительного культивирования (20 и 25 пассажи) экспрессия антигена HLA-A, B, C только в одном случае значительно снизилась (от 93,3 к 31,7%).

Таблица 3.5.

Изменения экспрессии антигенов гистосовместимости
I (HLA-A, B, C) и II (HLA-DR) классов в динамике

Линия	HLA-ABC			HLA-DR		
	Пассаж			Пассаж		
	10	20	30	10	20	30
<i>mel P</i>	88,9±1,5	89,9±1,7	99,3±0,5	6,9±1,5	4,3±0,6	2,3±1,5
<i>mel Kor</i>	1,0±0,1	0,1±0,1	0,1±0,1	1,5±0,5	0,1±0,1	0,4±0,2
<i>mel Mtp</i>	99,3±0,3	99,1±0,2	83,5±1,5	10,1±1,2	78,2±1,2	63,3±1,3
<i>mel Il</i>	98,8±0,5	91,5±0,6	92,9±0,5	6,4±0,8	0,9±0,9	1,9±0,2
<i>mel Is</i>	43,0±5,3	88,5±3,5	86,2±2,3	4,3±0,5	24,5±0,5	26,2±1,0
<i>mel Si</i>	80,0±4,5	86,2±4,0	99,5±0,2	3,8±1,2	30,7±0,5	96,0±0,5
<i>mel Me</i>	87,6±3,7	84,3±3,5	94,1±0,5	9,7±2,1	29,7±1,0	43,7±1,3
<i>mel Gus</i>	81,8±5,2	98,4±0,5	98,2±0,5	2,6±0,9	97,8±0,5	90±1,5
<i>mel Z</i>	85,5±4,2	94,8±1,4	98,7±0,3	3,0±0,8	5,1±0,1	5,1±0,1
<i>mel Ksen</i>	60,4±1,5	61,8±2,5	97,4±0,5	42,9±1,2	97,6±0,9	91,7±1,0
<i>mel Hn</i>	93,3±0,8	86,3±3,4	31,7±10,8	24,9± 2,1	16,5±1,1	17,2±1,5
<i>mel Gi</i>	95,2±1,5	97,9±1,6	89,8±3,5	4,7±0,3	32,0±1,0	37,6±1,0
<i>mel Ibr</i>	84,5±3,4	81,9±3,5	99,5±0,3	9,5±1,1	46,2±1,2	47,2±1,2
<i>mel R</i>	85,1±2,5	83,7±2,4	73,3±4,4	4,7±1,2	2,9±0,9	1,4±0,5
<i>mel Rac</i>	80,9±3,1	78,8±2,3	93,8±2,1	0,1±0,2	17,7±1,0	63,2±2,2
<i>mel Ch</i>	83,5±5,0	68,0±5,5	96,0±1,2	2,2±0,1	12,6±0,6	25,1±1,1
<i>mel Bgf</i>	87,4±3,3	73,7±3,5	67,1±5,7	1,4±0,1	1,3±0,3	14,3±1,4
<i>mel H</i>	78,0±5,0	77,4±5,1	98,9±1,2	1,6±0,3	1,7±0,3	6,9±0,9
<i>mel Cher</i>	76,0±5,4	83,1±5,3	98,1±1,0	34,1±1,0	35,3±1,0	61,0±1,0

Исследование экспрессии антигенов гистосовместимости второго класса выявило в одних случаях полное их отсутствие на протяжении всех пассажей, а в других – тенденцию к увеличению. Количество антигенположительных клеток антигена гистосовместимости второго класса (HLA-DR) на 10 пассаже определялось на четырех линиях и составило от 10,1 до 42,9%. К 20 пассажиру уже 12 клеточных линий имели повышенный уровень экспрессии HLA-DR (от 16,5 до 78,2% АГ⁺ клеток), а к 30 пассажиру 13 линий имели повышенную экспрессию HLA-DR (от 14,3 до 96% АГ⁺ клеток).

Методом проточной цитометрии проанализировано наличие белка HLA-E и суммарного HLA-ABC на клеточной поверхности *mel Il*, *mel P*, *mel Cher*, *mel Ibr*, *mel Mtp*, *mel R*, *mel Kor* с использованием МКА.

Полученные данные позволили разделить тестируемые линии на 3 категории.

К *первой* относится линия, которая имеет на своей поверхности молекулы как МНС Ia класса, так и HLA-E – *mel Si*.

Ко *второй*, и наиболее многочисленной, относятся линии, экспрессирующие исключительно классические молекулы МНС (HLA-A, -B, -C) – *mel II*, *mel P*, *mel Cher*, *mel Ibr*, *mel Mtp*, *mel E*, *mel R*.

Единственной меланомной линией, на которой не было детектировано ни одной молекулы-представителя первого класса комплекса гистосовместимости была *mel Kor*. Этот результат вполне объясним, так как клетки *mel Kor* не содержат мРНК $\beta 2$ -микроглобулина, без которого не происходит сборки молекул HLA. Несмотря на высокий уровень белка HLA-E по данным вестерн-блот анализа в клеточной линии *mel II*, отмечено отсутствие HLA-E на этих клетках. Возможно существование аллельных вариаций в лидерных пептидах молекул МНС Ia класса в исследуемых линиях, которые бы приводили к образованию неправильных, т. е. неспособных к связыванию с HLA-E, пептидов. Не обнаружено клеточных линий, в которых наблюдалось бы одновременное снижение уровня молекул МНС Ia класса на фоне увеличения белка HLA-E на поверхности. Возможно это связано с тем, что во время иммунного ответа клетки опухоли находятся под воздействием многих факторов, и, в первую очередь, под воздействием цитокинов. Так, большинство процессов клеточной цитотоксичности сопровождается секрецией интерферона-гамма (INF- γ). Что касается гена HLA-E, его мРНК присутствовала во всех исследуемых клеточных линиях в количестве сравнимом, а иногда даже превышающем, суммарный уровень экспрессии генов тяжелых цепей классических HLA-A, -B и -C. Таким образом, транскрипт молекулы HLA-E не только был обнаружен во всех исследуемых меланомных линиях, но и присутствует в клетках в достаточном количестве для синтеза белкового продукта постоянным воздействием этого цитокина к связыванию с HLA-E, пептидов» [4-6].

Исследование HLA-фенотипа клеточных линий I класса

Исследование трансплантационного иммунитета (HLA-фенотипа I класса гистосовместимости) 19 клеточных линий выявило присутствие на клетках различных антигенов HLA, что также способствует определению рестриктивности генов, в зависимости от HLA-фенотипа (табл. 3.6).

Таблица 3.6.

HLA-фенотип I класса гистосовместимости клеточных линий

Линия	Фенотип	Рестриктированность (примеры)
<i>mel P</i>	A23(9); A26(10); B7; B56(22)	HLA23: MAGE-6; B7 (RAGE)
<i>mel Kor</i>	A3; A26(10); B62(15); B55(22)	HLA3: MAGE-1, MAGE-3
<i>mel Mtp</i>	A3; A26(10); B13; B41	HLA3: MAGE-1, MAGE-3
<i>mel Il</i>	A23(9); A26(10); B7; B56(22)	HLA23: MAGE-6
<i>mel Is</i>	A2; B7; B64(14)	HLA2: Тирозиназа; Gp100; MART-1
<i>mel Si</i>	A1; A3; B51(5); B39(16)	HLA1: MAGE-1, MAGE-3
<i>mel Me</i>	A2; A31(19); B58(17); B56(22)	HLA2: Тирозиназа; Gp100; MART-1
<i>mel Gus</i>	A1; A3; B8; B60(40)	HLA3: MAGE-1, MAGE-3
<i>mel Z</i>	A11; A26(10); B62(15); B44(12)	HLA26: sart-1
<i>mel Ksen</i>	A24(9); A30(19); B39(16); B60(40)	-
<i>mel Hn</i>	A1; A23(9); B51(5); B8	HLA1: MAGE-1, MAGE-3
<i>mel Gi</i>	A1; A30(19); B8; B44 (12)	HLA1: MAGE-1, MAGE-3
<i>mel Ibr</i>	A2; A24(9); B35; B62(15)	HLA2: Тирозиназа; Gp100; MART-1
<i>mel R</i>	A2, B27, B64(14)	HLA2: Тирозиназа; Gp100; MART-1
<i>mel Rac</i>	A23(9); A26(10); B39(16); B8	HLA23: MAGE-6
<i>mel Ch</i>	A1; A3; B8; B63(15)	HLA1: MAGE-1; MAGE-3
<i>mel Bgf</i>	A2; A23(9); B62(15); B18	HLA2: Тирозиназа; Gp100; MART-1
<i>mel H</i>	A3; A30(19); B13; B7	HLA3: MAGE-1, MAGE-3
<i>mel Cher</i>	A2; A25(10); B51(5); B49(21)	HLA2: Тирозиназа; Gp100; MART-1
WNT – лиганды и фенотип клеточных линий		

Самые часто встречаемые гены:

- A26(10) – выявлен на 6 линиях;
- HLA3 – на 6 линиях;
- HLA2 и HLA23 на 5 линиях.

Остальной фенотип отмечен менее чем на 4 линиях.

Меланома характеризуется высокой способностью к метастазированию. При этом активируются те же внутриклеточные программы, которые контролируют процессы эмбрионального развития. Считается, что одним из основных сигнальных каскадов, нарушения в регуляции которых приводят к формированию и развитию меланомы, является сигнальный путь Wnt, который включает в себя сложную сеть внутриклеточных взаимодействий. Его лиганды способны запускать как минимум три различные цепи передачи сигнала: каноническую и две неканонические. Каноническая ветвь сиг-

нального пути Wnt задействована в контроле пролиферации и дифференцировки клеток. Неканонические сигнальные пути Wnt, напротив, как правило, влияют на организацию цитоскелета и клеточную подвижность. На настоящий момент предполагают, что канонический и неканонические сигнальные каскады Wnt воздействуют на разные этапы развития опухоли. Канонический сигнальный путь Wnt участвует в формировании меланомы, в то время как неканонические ветви пути передачи сигнала от белков Wnt вовлечены в метастазирование [7].

В диссертации Куликовой К. В. «Влияние WNT лигандов на формирование фенотипа клеточных линий меланомы человека» [8] исследованы следующие клеточные линии: *mel R*, *mel G*, *mel Me*, *mel Ksen*, *mel Ibr*, *mel Il*, *mel Kor*, *mel P*, *mel Si*. Для всех этих клеточных линий характерна экспрессия генов маркеров эпителиально-мезенхимального перехода: *Slug*, *Twist1*, *Sip1*, виментина, что свидетельствует об активированном статусе программы эпителиально-мезенхимального перехода в изученных линиях. Показано, что накопление β -катенина в ядрах клеток линий меланомы человека не может служить достаточным условием для активации канонического Wnt сигнального пути. Канонический лиганд Wnt3a в модельной клеточной линии меланомы человека способен активировать два Wnt-сигнальных каскада: канонический R-катениновый и неканонический Wnt/Ca-зависимый. Этот лиганд блокирует пролиферацию опухолевых клеток и стимулирует их подвижность. Неканонические лиганды Wnt5a и Wnt11 также способны активировать Wnt/Ca-зависимый сигнальный путь в модельной клеточной линии меланомы человека. При этом Wnt5a влияет на миграционную способность клеток, а Wnt11 способствует пролиферации. Как канонический Wnt3a, так и не канонический Wnt5a-лиганды усиливают подвижность клеток линии меланомы человека *mel P*. Неканонический лиганд Wnt11 усиливает пролиферацию культуры клеточной линии меланомы человека *mel P*, в то время как канонический лиганд Wnt3a оказывает противоположное действие. В клеточной линии меланомы человека *mel P* канонический лиганд Wnt3a способен активировать сигнальный путь, связанный с увеличением уровня внутриклеточного кальция [8].

Список литературы

1. Бигвава Х. А. Влияние фактора некроза опухоли на цитотоксичность и индукцию апоптоза противоопухолевыми препаратами на клеточных линиях меланом: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.01.12. – М., 2012.
2. Ковалевский Д. А. Экспрессия генов раково-тестикулярных антигенов при меланоме кожи человека: дис. ... канд. биол. наук: 14.01.12, 03.01.04. – М., 2010. – 123 с.
3. Бурова О. С. Получение и характеристика клеточных линий меланомы человека для создания противоопухолевых вакцин: дис. ... канд. биол. наук: 14.01.12. – М., 2010. – 120 с.
4. Закеева И. Р. Изучение роли неканонической молекулы главного комплекса гистосовместимости человека HLA-E в регуляции противоопухолевого иммунного ответа: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.03. – М., 2006.
5. Бережной А. Е., Закеева И. Р., Кибардин А. В., Чернышева А. Д., Михайлова И. Н., Барышников А. Ю., Гнучев Н. В., Георгиев Г. П., Ларин С. С. Новые мишени для противоопухолевой иммунотерапии // International conference “Basic Science for Biotechnology and Medicine”. 2006. С. 27.
6. Бережной А. Е., Закеева И. Р., Кибардин А. В., Чернышева А. Д., Моиссенко В. М., Данилов А. О., Демидов Л. В., Барышников А. Ю., Гнучев Н. В., Георгиев Г. П., Ларин С. С. Анализ экспрессии молекул HLA-E в клетках меланомы человека // Российский биотерапевтический журнал. 2006. № 3. С. 66–71.
7. Куликова К. В., Кибардин А. В., Гнучев Н. В., Георгиев Г. П., Ларин С. С. Сигнальный путь Wnt и его значение для развития меланомы // Современные технологии в медицине. 2012. №3. С. 107–112.
8. Куликова К. В. Влияние WNT лигандов на формирование фенотипа клеточных линий меланомы человека: дис. ... канд. биол. наук: 03.01.03. – М., 2012. – 124 с.

Глава 4.

ГЕНОТИП КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ МЕЛАНОМЫ*

В последнее время достигнуты значительные успехи в понимании патогенеза меланомы [см. обзоры: 1, 2, 7, 12]. Меланома отличается генетической нестабильностью и повышенным уровнем соматических мутаций по сравнению с другими солидными опухолями [25]. При полногеномном секвенировании соматические мутации выявлены в 86% образцов меланомы в 43 из 46 генов, ассоциированных с канцерогенезом [4].

Основная роль в патогенезе меланомы принадлежит MAPK (mitogen-activated protein kinase) сигнальному пути – ключевому регулятору клеточной пролиферации, дифференцировки, выживания, подвижности и ангиогенеза [3, 22]. MAPK сигнальный путь участвует в передаче сигнала от различных внешних стимулов (ростовые факторы, цитокины, гормоны и стрессы) к внутриклеточным белкам через серию событий, включающих фосфорилирование и белок – белковое взаимодействие. Гиперактивация MAPK-сигнального пути наблюдается в 90% случаев меланомы [6] и это достигается за счет активации различных участков каскада RAS-RAF-MEK-ERK. Регуляция MAP киназного пути происходит различным образом. Усиление сигналинга ERK происходит в результате активирующих мутаций или амплификации генов, кодирующих компоненты RAS-RAF-MEK-ERK пути. В меланоме кожи наиболее часто определяются точечные мутации в генах *BRAF* (50–70%) или *NRAS* (15–30%). Молекулярная классификация учитывает локализацию первичного узла (очага) меланомы, генетические изменения в опухоли и экспозицию ультрафиолетовому облучению [8].

Ген *BRAF* кодирует серин-треониновую киназу BRAF, мутации в активирующем домене которой, вызывают каскадную активацию

* Авторы: Мазуренко Н. Н., Цыганова И. В., Лушникова А. А., Морозова Л. Ф.

протеинкиназ MEK и ERK [19]. Серин-треониновые киназы MEK1 и MEK2 катализируют фосфорилирование по треонину и тирозину белков ERK1 и ERK2, которые имеют много цитоплазматических и ядерных субстратов. Активация последних вызывает усиление клеточной пролиферации, дифференцировки, выживания, подвижности и ангиогенеза.

В 80% случаев меланомы с мутацией гена *BRAF* выявляется нуклеотидная замена T1799A, приводящая к замене валина на глутаминовую кислоту в кодоне 600 (V600E) [9]. В 20% случаев встречается замена V600K, редко – замены V600R/D/M [19, 21]. Мутации в киназном домене приводят к конформационным изменениям и повышению активности BRAF киназы в 70–130 раз *in vivo* [18]. При других мутациях в 14 или 15 экзонах (кодоны L597, K601) активность BRAF киназы составляет лишь 30% от активности фермента с мутацией V600E [31].

Для лечения BRAF-положительной меланомы кожи одобрены для клинического применения и зарегистрированы препараты: вемурафениб (2011 г.), блокирующий димеризацию протеинкиназы BRAF с мутацией V600E [11, 32] и дабрафениб (2013 г.), который ингибирует BRAF с мутацией V600E/K, блокируя АТФ-связывающий сайт киназного домена [13, 20], а также ингибиторы нижележащей киназы MEK – траметининиб и кобиметиниб.

Вторым наиболее часто мутирующим геном в меланоме является ген *NRAS*. Белок NRAS относится к семейству малых ГТФ-связывающих белков и, в отличие от BRAF, активирует не только каскад RAF-MEK-ERK, но и другие сигнальные пути: Ral-GDS, PI3K-AKT-mTOR и PLC-ПКС [10].

Мутации NRAS выявлены в 15–18% меланомы кожи [17]. Большинство (80%) мутаций затрагивают кодон Q61 в 3 экзоне *NRAS*: нуклеотидная замена C436A приводит к замене глутамина на лизин (Q61K), а мутация A437G – к замене глутамина на аргинин (Q61R). Реже возникают мутации во 2 экзоне *NRAS* в кодонах G12, G13.

Часто в образцах меланомы, содержащих гены *BRAF* и *NRAS* дикого типа, амплифицированы гены *CDK4* и *CCND1* (циклина D1), кодирующие нижележащие субстраты ERK. Ген *CDK4* кодирует циклин зависимую киназу CDK4, входящую в комплекс CDK4/6. Нарушения гена *CDK4*, как и гена *CDKN2A*, встречаются в соматических меланомах, а герминальные мутации ассоциированы с риском раз-

вития семейной меланомы кожи [14]. Наследственные активирующие мутации гена *CDK4* делают комплекс CDK4/6 устойчивым к ингибированию p16^{INK4a}.

В 20–40% случаев семейной меланомы найдены мутации гена-супрессора *CDKN2A*, кодирующего белки p14^{ARF} и p16^{INK4a} [14]. Помимо наследственных мутаций в 50% образцов меланомы встречаются соматические мутации и эпигенетические изменения p16^{INK4a}. Низкая экспрессия p16^{INK4a} коррелирует с прогрессией заболевания, усилением пролиферации и плохим прогнозом при спорадической меланоме [29]. Инактивация p16^{INK4a} приводит к активации cyclin D/CDK4 и фосфорилированию pRB1, что ведет к активации клеточного цикла и пролиферации клеток. Мутации p14^{ARF} приводят к недостатку белка p53, который контролирует целостность и репарацию ДНК. Мутации гена *TP53* встречаются в 16% случаев меланомы кожи, часто в опухолях с мутациями *BRAF* или *NRAS* [26].

Для развития меланомы важным событием является активация сигнального пути PI3K-AKT-mTOR, причем, уровень активности AKT3 повышается с увеличением стадийности меланомы [28]. Активация серин-треониновой киназы AKT3 отмечена в 60% случаев спорадической меланомы: в 35% случаев за счет амплификации гена *AKT3*, а в 5% – за счет мутации гена *PI3KCA*.

В 40–60% меланомы наблюдается инактивация фосфатазы PTEN, которая негативно регулирует PI3K-AKT сигналинг [27]. Подавление экспрессии PTEN происходит в результате мутации кодирующего гена, потери гетерозиготности или утраты хромосомного локуса, либо в результате эпигенетических нарушений транскрипции гена за счет метилирования или микро-РНК регуляции [23]. Активация PI3K-AKT пути важна для прогрессирования невуса в меланому [26, 30]. Усиленная экспрессия онкогенных белков NRAS или BRAF недостаточна для трансформации нормальных меланоцитов. В процессе развития меланомы имеет место кооперация амплификации гена AKT3 и мутации BRAF [5].

Другие пути, регуляция которых нарушена при меланоме, включают ген *KIT* [1, 2]. Этот ген кодирует тирозинкиназный рецептор КИТ фактора роста стволовых клеток (SCF), который играет ключевую роль в эмбриогенезе меланоцитов, их дифференцировке и пролиферации. В результате взаимодействия с лигандом SCF, рецептор КИТ активирует ряд сигнальных путей (RAS-MAPK, PI3K-

АКТ, SRK и другие), усиливая клеточный рост, пролиферацию, инвазию, метастазирование и ингибируя апоптоз.

Мутации гена *KIT* встречаются в 2–6% меланомы кожи [1, 2, 4]. Рецептор *KIT* экспрессируется на ранних стадиях меланомы более, чем в 50% случаев [16], однако по мере прогрессирования и перехода меланомы в инвазивные стадии, экспрессия *KIT* утрачивается, что предполагает супрессорные функции *KIT* [24]. Действительно, трансфекция гена *KIT* в высоко метастатическую линию клеток меланомы A375SM ведет к уменьшению роста опухоли и метастазов при последующем введении этих клеток мышам. Введение фактора роста стволовых клеток SCF – лиганда рецептора *KIT*, приводит к высокому уровню апоптоза в *KIT*-позитивной линии клеток меланомы. Потеря экспрессии *KIT* коррелирует со злокачественной трансформацией меланоцитов, инвазией и метастазированием опухоли [24]. В небольшом проценте случаев меланомы кожи с диким типом *BRAF* и *NRAS* выявлены опухоли с гиперэкспрессией *KIT* и *CDK4* [33]. Мутации *KIT* не встречаются одновременно с мутациями *NRAS* или *BRAF*. Мутации *KIT* чаще всего представлены точечными заменами в экзоне 11, кодирующем регуляторный JM-домен рецептора, и реже заменами в экзонах 9, 13, 17 и 18 [2]. Тирозинкиназный ингибитор иматиниба мезилат эффективен при лечении меланомы кожи, если мутантный белок *KIT* к нему чувствителен, обычно вследствие мутаций в экзонах 11 или 13 кодирующего гена.

Случаи меланомы с мутациями *BRAF* и *NRAS* отличаются по клинико-морфологическим характеристикам и клиническому поведению.

Опухоли с мутациями *NRAS* чаще имеют больший размер и более высокий митотический индекс. Такие меланомы отличаются большей толщиной, чем опухоли с диким типом гена или мутацией *BRAF* и, по-видимому, связаны с вертикальной фазой роста меланомы. Трансфекция гена *RAS* в клеточные линии меланомы с эпителиоидно клеточной морфологией усиливает продукцию протеазы и клеточную подвижность, черты, характерные для фазы вертикального роста меланомы [10].

Наличие мутаций *BRAF* ассоциировано с более частым изъязвлением опухоли, с более частым развитием местных рецидивов и поражением регионарных лимфатических узлов, частота мутаций *BRAF* выше у пациентов с выживаемостью менее 5 лет. Мутации

BRAF ассоциированы с более ранним временем постановки диагноза, чем NRAS. Пациенты с меланомой и мутациями BRAF значительно моложе (49,8 лет), чем с мутациями NRAS (55,7 лет), или диким типом этих генов (59,5 лет) и это отличие статистически достоверно [15, 21].

Мутации NRAS чаще присутствуют в меланоме кожи, связанной с хроническим солнечным повреждением [8]. Также мутации NRAS выявляют в 94,7% случаев врожденных меланоцитарных новообразований, которые характеризуются повышенным риском трансформации в меланому. Показано, что мутации NRAS связаны с низкой общей выживаемостью и являются независимым признаком более короткого выживания у пациентов с меланомой IV стадии [15].

Таблица 4.1.

Мутации BRAF и NRAS в клеточных линиях меланомы

№	Клеточная линия	Мутация BRAF 15-й экзон (кодон 600 и 597)	Мутация NRAS 3-й экзон (кодон 61)	Степень дифференцировки клеток
1	<i>mel P</i>	V600E	Wt	умеренно
2	<i>mel Kor</i>	Wt	Q61K	низко
3	<i>mel Mtp</i>	Wt	Q61K	низко
4	<i>mel Il</i>	V600K	Wt	умеренно
5	<i>mel Is</i>	V600E	Wt	низко
6	<i>mel Si</i>	L597Q	Wt	высоко
7	<i>mel Me</i>	Wt	Q61K	высоко
8	<i>mel Gus</i>	Wt	Q61K	низко
9	<i>mel Z</i>	V600E	Wt	умеренно
10	<i>mel Ksen</i>	V600E	Wt	умеренно
11	<i>mel Hn</i>	V600E	Wt	умеренно
12	<i>mel Gi</i>	V600E	Wt	низко
13	<i>mel Ibr</i>	V600E	Wt	низко
14	<i>mel R</i>	V600E	Wt	умеренно
15	<i>mel Rac</i>	Wt	Q61R	низко
16	<i>mel Ch</i>	V600E	Wt	низко
17	<i>mel Bgf</i>	V600K	Wt	умеренно
18	<i>mel H</i>	V600E	Wt	низко
19	<i>mel Cher</i>	V600E	Wt	низко

Нами проведен анализ мутаций генов *BRAF* и *NRAS* в 19 культурах клеток меланомы. Мутация *BRAF* обнаружена в 13 клеточных линиях: в 10 выявлена замена V600E, в двух V600K и в одной – L597Q (табл. 4.1). Среди культур клеток меланомы с мутацией *BRAF* V600E/K большинство клеточных линий было низко (6) или умеренно (6) дифференцированы. Одна линия высокодифференцированных клеток меланомы (*mel Si*) содержала мутацию *BRAF* L597Q. Мутация *NRAS* Q61K выявлена в 4 линиях клеток меланомы, из которых 3 культуры были низко дифференцированными и одна – высоко дифференцированных клеток. В одной культуре низко дифференцированных клеток меланомы выявлена мутация *NRAS* Q61R. В культуре *mel Ksen* умеренно дифференцированных клеток мутации *BRAF* и *NRAS* не обнаружены.

Список литературы

1. Мазуренко Н. Н. Генетические особенности и маркеры меланомы кожи // Успехи молекулярной онкологии. 2014. Т.1, вып. 2. С. 26–35.
2. Bello D. M., Ariyan C. E., Carvajal R. D. Melanoma mutagenesis and aberrant cell signaling // Cancer Control. 2013. Vol. 20(4). P. 261–281.
3. Berger M. F., Garraway L. A. Applications of genomics in melanoma oncogene discovery // Hematol. Oncol. Clin. North Am. 2009. Vol. 23(3). P. 397–414.
4. Boland G. M., Piha-Paul S. A., Subbiah V., et al. Clinical next generation sequencing to identify actionable aberrations in a phase I program // Oncotarget. 2015. Vol. 6(24). P. 20099–20110.
5. Cheung M., Sharma A., Madhunapantula S. V., Robertson G. P. Akt3 and mutant V600E B-Raf cooperate to promote early melanoma development // Cancer Res. 2008. Vol. 68(9). P. 3429–3439.
6. Cohen C., Zavala-Pompa A., Sequeira J. H., et al. Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression // Clin. Cancer Res. 2002. Vol. 8(12). P. 3728–3733.
7. Coupland S. E., Lake S. L., Zeschnigk M., Damato B. E. Molecular pathology of uveal melanoma // Eye. (Lond) 2013. Vol. 27(2). P. 230–242.
8. Curtin J. A., Fridlyand J., Kageshita T., et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma // N. Engl. J. Med. 2005. Vol. 353(20). P. 2135–2147.

9. Davies H., Bignell G. R., Cox C., et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer // *Nature*. 2002. Vol. 417(6892). P. 949–954.
10. Fedorenko I. V., Gibney G. T., Keiran S. M. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management // *Oncogene*. 2013. Vol. 32(25). P. 3009–3018.
11. Flaherty K. T., Puzanov I., Kim K. B., Ribas A., McArthur G. A., Sosman J. A., O'Dwyer P. J., Lee R. J., Grippo J. F., Nolop K., Chapman P. B. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma // *N. Engl. J. Med*. 2010. Vol. 363(9). P. 809–819.
12. Gaudi S., Messina J. L. Molecular Bases of Cutaneous and Uveal Melanomas // *Pathol. Res. Int*. 2011. Article ID 159421. P. 1–8.
13. Hauschild A., Grob J. J., Demidov L. V., et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial // *Lancet*. 2012. Vol. 380(9839). P. 358–365.
14. Hayward N. K. Genetics of melanoma predisposition // *Oncogene*. 2003. Vol. 22(20). P. 3053–3062.
15. 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. Vol. 118(16). P. 4014–4023.
16. Janku F., Novotny J., Julis I., et al. KIT receptor is expressed in more than 50% of early-stage malignant melanoma: a retrospective study of 261 patients // *Melanoma Res*. 2005. Vol. 15(4). P. 251–256.
17. Kelleher F. C., McArthur G. A. Targeting NRAS in melanoma. // *Cancer J*. 2012. Vol. 18(2). P. 132–136.
18. Lin K., Baritaki S., Militello L., et al. The role of B-RAF mutations in melanoma and the induction of EMT via dysregulation of the NF-KB/Snail/RKIP/PTEN circuit // *Gen. Cancer*. 2010. Vol. 1(5). P. 409–420.
19. Long G. V., Menzies A. M., Nagrial A. M., et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma // *J. Clin. Oncol*. 2011. Vol. 29(10). P. 1239–4621.
20. Long G. V., Trefzer U., Davies M. A., Kefford R. F., Ascierto P. A., Chapman P. B. Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicenter, open-label, phase 2 trial // *Lancet. Oncol*. 2012. Vol. 13(11). P. 1087–1095.
21. Lovly C. M., Dahlman K. B., Fohn L. E., et al. Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials // *PLoS Onc*. 2012. Vol. 7(4). e35309.

22. Miller A. J., Mihm M. C. Jr. Melanoma // *N. Engl. J. Med.* 2006. Vol. 355(1). P. 51–65.
23. Mirmohammadsadegh A., Marini A., Nambiar S., et al. Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma // *Cancer Res.* 2006. Vol. 66(13). P. 6546–6552.
24. Mobley A. K., Braeuer R. R., Kamiya T., et al. Driving transcriptional regulators in melanoma metastasis // *Cancer and Metastasis Rev.* 2012. Vol. 31(3–4). P. 621–632.
25. Pleasance E. D., Cheetham R. K., Stephens P. J., et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome // *Nature.* 2010. Vol. 463(7278). P. 191–196.
26. Siroy A. E., Boland G. M., Milton D. R., et al. Beyond BRAF (V600): clinical mutation panel testing by next-generation sequencing in advanced melanoma // *J Invest Dermatol.* 2015. Vol. 135(2). P. 508–515.
27. Stahl J. M., Cheung M., Sharma A., et al. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma // *Cancer Res.* 2003. Vol. 63(11). P. 2881–2890.
28. Stahl J. M., Sharma A., Cheung M., et al. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma // *Cancer Res.* 2004. Vol. 64(19). P. 7002–7010.
29. Straume O., Sviland L., Akslen L. A. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma // *Clin. Cancer Res.* 2000. Vol. 6(5). P. 1845–1853.
30. Vredeveld L. C., Possik P. A., Smit M. A., et al. BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis // *Genes Dev.* 2012. Vol. 26(10). P. 1055–1069.
31. Wan P. T., Garnett M. J., Roe S. M., et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF // *Cell.* 2004. Vol. 116(6). P. 855–867.
32. Wellbrock C., Hurlstone A. BRAF as therapeutic target in melanoma // *Biochem. Pharmacol.* 2010. Vol. 80(5). P. 561–567.
33. Willmore-Payne C., Holden J. A., Hirschowitz S., Layfield L. J. BRAF and c-kit gene copy number in mutation positive malignant melanoma // *Human. Pathol.* 2006. Vol. 37(5). P. 520–527.

Глава 5.

ВАСКУЛОГЕННАЯ МИМИКРИЯ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ*

Интересной особенностью клеток меланомы кожи является их способность к васкулогенной мимикрии [1]. Этот феномен представляет собой уникальную способность высокоагрессивных опухолевых клеток формировать васкулярные каналы, окруженные базальной мембраной, в отсутствие эндотелиальных клеток [2].

В основе определения «васкулогенная мимикрия» [3] лежит термин «васкулогенез», который используется для обозначения формирования сосудов, окруженных эндотелиальными клетками *de novo*, в процессе эмбриогенеза.

Впервые ВМ была обнаружена в гистологическом материале больных меланомой глаза и впоследствии подтверждена *in vitro* при культивировании опухолевых клеток на внеклеточных матриксах Матригеле или коллагене [4]. Матригель – природный матрикс базальных мембран, экстрагированный из саркомы Энгельбрета-Холма-Суорма мыши. Основные его компоненты – ламинин, коллаген IV, протеингликаны, энтактин и нидоген.

Клеточные линии метастатической меланомы кожи человека *mel Cher*, *mel P*, *mel Si*, *mel Bgf*, *mel Ch*, *mel Kor*, *mel Mtp*, *mel Il*, *mel Ksen*, *mel Me*, *mel Gus*, *mel Ibr*, *mel R* были проверены в исследовании *in vitro* на возможность формирования сосудистоподобных структур ВМ. В качестве сравнения была взята клеточная линия SVEC-4-10 эндотелиальных клеток мыши, поскольку тест на образование сосудистоподобных структур *in vitro* был изначально разработан для выявления ингибиторов и активаторов ангиогенеза. При проведении этого исследования эндотелиальные клетки, прикрепляясь к гелю, имитирующему внеклеточный матрикс, формировали структуры, схожие с ангиогенными *in vivo* [5].

Культивирование клеток метастатической меланомы кожи в

* Автор: Григорьева И. Н.

низкой плотности на Матригеле приводило к формированию СПС через 10–16 ч (рис. 5.1–5.2).

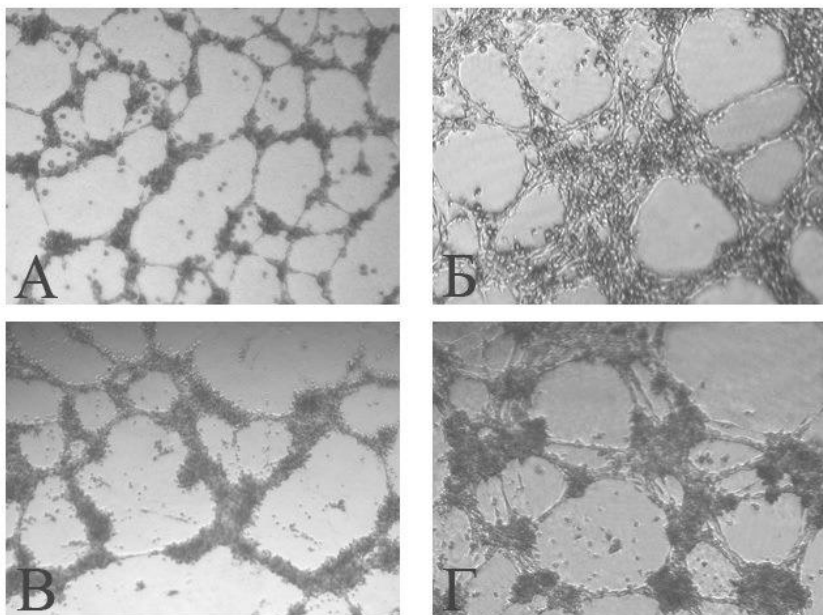


Рис. 5.1. Формирование нестабильных сосуудистоподобных структур, увеличение $\times 200$:

А – клеточная линия *mel Il*, Б – клеточная линия *mel Kor*,
В – клеточная линия *mel Mtp*, Г – клеточная линия *mel Gus*

Существовало ли отличие в краткосрочных тестах на формирование СПС между клеточными линиями метастатической меланомы кожи? Да, но не очень существенное.

Следует отметить, что *mel Cher*, *mel Si*, *mel Bgf*, *mel P*, *mel Ch*, *mel R* образовывали стабильные СПС, структура которых была сохранена через 24 ч (рис. 5.1, А–Г). В этом случае опухолевые клетки, культивированные на Матригеле, образовывали длинные, соединенные друг с другом трубочки, отсутствовали незамкнутые трубочки, не ограниченные контактами с другими клетками. Несколько клеточных линий (*mel Kor*, *mel Il*, *mel Gus*, *mel Mtp*) формировали нестабильные СПС, а часть клеточных линий формировали СПС не всегда. Нестабильными СПС были названы потому, что через 20–24 ч

инкубации на Матригеле начинали разрушаться контакты между клетками, появлялись разрывы контактов, нарушалась вытянутая структура СПС (*ibid.*).

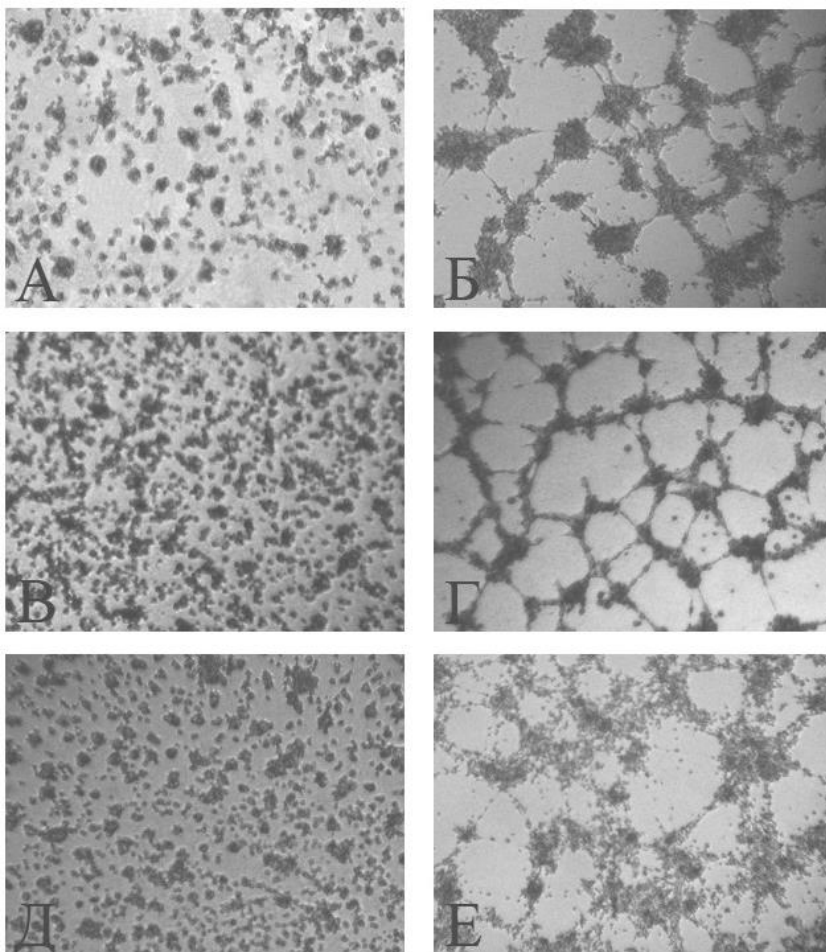


Рис. 5.2. Клеточные линии с низкой способностью формировать СПС, увеличение $\times 200$:

Формирование клеточной линией *mel Ksen* кластеров клеток (А) и СПС (Б), клеточной линией *mel Ibr* кластеров клеток (В) и СПС (Г), клеточной линией *mel Me* кластеров клеток (Д) и СПС (Е)

Изученные клеточные линии *mel Ksen*, *mel Ibr*, *mel Me* обладали низкой способностью к формированию СПС. В этом случае образование СПС не воспроизводилось от опыта к опыту, и часто зависело от наличия или отсутствия монослоя культуры клеток, взятых для эксперимента (рис. 5.2, А–Е). При этом опухолевые клетки, не формирующие СПС, образовывали малые кластеры клеток с короткими прерывающимися трубочками.

Таким образом, мы подтвердили, что при культивировании высокоагрессивных опухолевых клеток метастатической меланомы кожи на гелевых матриксах в течение 16–24 ч происходило формирование сосудистоподобных структур.

Чем же вызвана способность клеток метастатической меланомы кожи к ВМ? Одно из объяснений способности опухолевых клеток участвовать в микроциркуляции – их пластичность [6]. Ведь опухолевые клетки в стадии роста новообразования претерпевают определенную дифференцировку. Опухоль, моноклональная по своей природе, в процессе малигнизации приобретает все больший клеточный полиморфизм. Профиль генов, экспрессируемых агрессивными клетками меланомы кожи и глаза, при развитии васкулогенной мимикрии изменяется [7]. Так, он может быть сходен с эндотелиальными, стволовыми клетками и клетками других типов [8].

Многие белки, которые высоко экспрессируются в агрессивных опухолевых клетках, участвуют в процессах ангиогенеза и васкулогенеза. К ним относятся VE-кадгерин (CD144), EphA2, ламинин 5γ2. Было показано в экспериментах *in vitro*, что уменьшение экспрессии VE-кадгерина, EphA2 или ламинина 5γ2 приводит к полной неспособности агрессивных клеток меланомы формировать васкулогенные структуры на внеклеточных матриксах [9]. А моноклональные антитела к VE-кадгерину ингибируют ангиогенез в опухолях Льюиса и эпидермоидных опухолях [10].

Считается, что тирозинкиназный рецептор EphA2 важен для развития васкулогенной мимикрии при меланоме [9]. Высокий уровень экспрессии EphA2 и эфрина A1 ассоциируются с ростом меланомы, толщиной опухоли и более низкой выживаемостью больных [10]. Связывание ее с лигандом, эфрином A1, приводит к фосфорилированию и активированию нижележащих сигнальных путей, которые в свою очередь усиливают пролиферативную активность опухоли [11].

Нельзя обойти вниманием и семейство VEGFR. Известно, что

VEGFA обладает способностью запускать полную последовательность событий, ведущих к росту новых сосудов [12], и может стимулировать ангиогенез *in vivo* [13]. VEGF A связывается с тирозинкиназными рецепторами VEGFR-1 и VEGFR2 [14].

В проведенных нами исследованиях на клеточных линиях метастатической меланомы кожи анализ экспрессии VEGFA и его рецепторов показал высокую экспрессию белков данного семейства (рис. 5.3). Однако, в опухолевых клетках отсутствовало окрашивание антителами к VEGFR-2, фосфорилированному по Tyr 951 (основной сайт аутофосфорилирования для VEGFR-связывающих белков) и Tyr1175 (основной сайт аутофосфорилирования для VEGF-A) доменам [15]. При анализе особенностей экспрессии белков линиями из разных групп возможной взаимосвязи изменения формирования СПС с изменением уровня экспрессии VEGF A не выявлено.

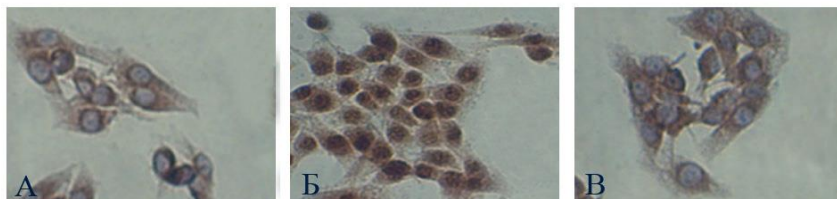


Рис. 5.3. Экспрессия VEGF и его рецепторов опухолевыми клетками линии *mel Cher*, увеличение $\times 200$:

А – экспрессия VEGF, Б – экспрессия VEGFR-1,
В – экспрессия VEGFR-2

Далее была исследована способность клеточных линий метастатической меланомы кожи *mel Cher*, *mel P* и *mel Ch*, стабильно формирующих сосудистоподобные структуры, экспрессировать VE-кадгерин, эфрин A2 (EphA2) и белки базальных мембран.

Клетки изученных линий метастатической меланомы кожи экспрессировали эфрин A2, локализация окрашивания – цитоплазма клетки (табл. 5.1).

Три клеточные линии метастатической меланомы кожи, стабильно формирующие СПС (*mel Cher*, *mel P* и *mel Ch*), экспрессировали неодинаково белок гомотипического узнавания и клеточной адгезии VE-кадгерин, который участвует в процессе васкулогенной мимикрии. Так же VE-кадгерин, как белок адгезии, специфичен для эндотелиальных клеток [16]. VE-кадгерин принадлежит к семейству

трансмембранных протеинов и способствует гомотипическому межклеточному взаимодействию [17].

Таблица 5.1.

Экспрессия клетками линий меланомы кожи
эфрина A2 и VE-кадхерина

Клеточная линия	Экспрессия эфрина A2 (интенсивность, локализация, % + клеток)	Экспрессия VE-кадхерина (интенсивность, локализация, % + клеток)
<i>mel Cher</i>	2+ цитоплазма 100% клеток	2+ цитоплазма 100% клеток
<i>mel P</i>	3+ цитоплазма 80% клеток	1+ цитоплазма 90% клеток
<i>mel Ch</i>	3+ цитоплазма 95% клеток	Отсутствует окрашивание клеток

Опухолевые клетки линии *mel Ch* не экспрессировали VE-кадхерин, а для клеток линии *mel P* показано слабое цитоплазматическое окрашивание 90%. Однако выявлено, что цитоплазматическая экспрессия VE-кадхерина характерна для 100% опухолевых клеток линии *mel Cher*.

Исследование белков базальных мембран показало, что 90% клеток клеточной линии *mel Cher* экспрессировали ламинин 5γ2 (табл. 5.2). Ламинин 5γ2, по данным некоторых авторов, считается триггером прогрессии меланомы [18].

Таблица 5.2.

Экспрессия белков базальных мембран
клетками линий меланомы кожи

Клеточная линия	Экспрессия ламинина общего (интенсивность, локализация, % + клеток)	Экспрессия ламинина 5γ2 (интенсивность, локализация, % + клеток)
<i>melCher</i>	3+ цитоплазма и мембрана 70% клеток	2+ цитоплазма и мембрана 90% клеток
<i>melP</i>	3+ цитоплазма и мембрана 90% клеток	2+ цитоплазма и мембрана 60% клеток
<i>melCh</i>	3+ цитоплазма и мембрана 95% клеток	2+ цитоплазма и мембрана 40-50% клеток

Это позволило выделить клеточную линию метастатической меланомы кожи *mel Cher* для дальнейших экспериментов по созданию положительной модели васкулогенной мимикрии. На момент создания модели ВМ, основной зарубежной линией для изучения ВМ являлась клеточная линия увеальной меланомы человека

MUM2B, которая формирует СПС *in vitro* в долгосрочных (до двух недель) тестах [19]. Формирование ВМ *in vivo* происходит лишь при определенных (имплантации сфероидов клеток) условиях [20].

По данным Maniotis A. J., et al., при культивировании высокоагрессивных опухолевых клеток на внеклеточных матриксах в течение длительного периода времени происходило формирование тубулярных структур. Такие структуры начинали образовываться на первый день эксперимента, на 14 день микроинъекция контрастирующего агента в такие каналы *in vitro* показывала способность проводить контраст [20].

Клеточная линия *mel Cher* в долгосрочных экспериментах на двух внеклеточных матриксах, Матригеле и фибронектине, формировала тубулярные структуры. Тубулярные структуры представлены на рис. 5.4 А и В. Для данных структур характерна положительная PAS-реакция, что свидетельствует о присутствии белков базальных мембран.

PAS-окрашивание тубулярных структур, сформированных опухолевыми клетками клеточной линии метастатической меланомы кожи *mel Cher*, представлено на рисунке 5.4 Г. Для сравнения была взята клеточная линия из третьей группы – *mel Me*, относящаяся к группе линий с низкой способностью формировать сосудистоподобные структуры. Клетки линии *mel Me* не были способны формировать тубулярные структуры при инкубации на Матригеле или фибронектине (рис. 5.4 Б).

Наши исследования показали, что клеточная линия *mel Cher* может быть использована и в качестве модели для исследования ВМ *in vivo*. Исследование феномена ВМ на бестимусных мышах проводилось впервые в мире. Для имплантации мышам оптимальным количеством опухолевых клеток, взятым из культуры *in vitro*, можно считать 3×10^6 . В случае имплантации 5×10^6 опухолевых клеток отмечена лучшая воспроизводимая динамика роста подкожных ксенографтов, но также отмечено и появление некрозов. В легких иммунодефицитных мышей при окрашивании гематоксилин-эозином парафиновых срезов не выявляются метастатические очаги (рис. 5.5 А).

Морфологический и иммуногистохимический анализ проводили на срезах опухолей, полученных на 25 день после перевивания. При гистологическом исследовании опухоль состояла из пласта средних, полиморфных клеток, разделенных узкими прослойками соединительной ткани.

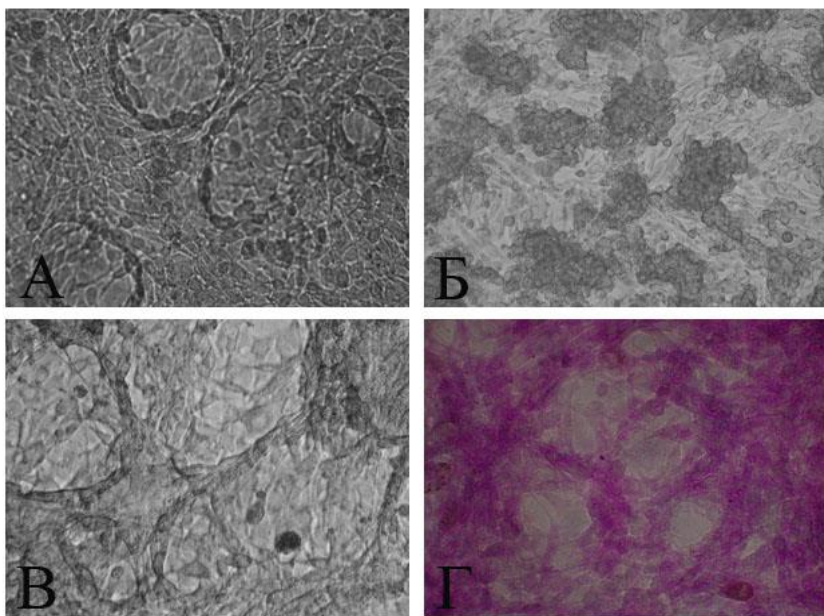


Рис. 5.4. Формирование тубулярных структур, увеличение $\times 200$:
 А – начало формирования тубулярных структур клеточной линией *mel Cher* на 5 день инкубации на Матригеле,
 Б – отсутствие формирования клеточной линией *mel Me* тубулярных структур при инкубации на Матригеле,
 В – формирование тубулярных структур клеточной линией *mel Cher* на второй неделе инкубации,
 Г – PAS-окрашивание тубулярных структур

В некоторых опухолевых клетках наблюдалось наличие небольшого количества пигмента (меланина). Ядра опухолевых клеток были овально-округлой формы, встречались немногочисленные сосуды. Среднее количество $CD34^+$ сосудов в опухоли было равно $8+2$ сосуда в поле зрения (рис. 5.5 Б).

В качестве оптимального подхода для исследования ксенографтов любых клеточных линий на ВМ мы предлагаем следующую схему гистохимического исследования:

- исследование PAS-структур (метод PAS-окрашивания);
- исследование ВМ-структур и сосудистой плотности опухоли (метод комбинированного $CD31/CD34/PAS$ -или $CD34/PAS$ -окрашивания).

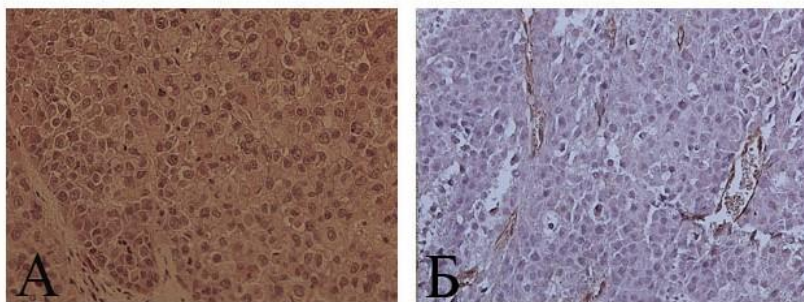


Рис. 5.5. Исследование подкожных ксенографтов линии *mel Cher*, увеличение $\times 200$:

А – гистологическое исследование опухоли, окрашивание гематоксилин-эозином,
Б – CD34⁺ сосуды

Важным является наличие в ткани опухоли PAS⁺ параллельных с пересечением каналов, петель и/или сетей. Наличие CD34-/PAS⁺ структур свидетельствует о ВМ.

Проведено окрашивание срезов опухоли реактивом Шиффа на наличие базальных мембран (рис. 5.6).

Данное окрашивание выявляет соединительную ткань, базальную мембрану ангиогенных сосудов (состоящих из эндотелиальных клеток) и структуры ВМ, представляющие собой каналы, окруженные клетками опухоли.

Комбинированное PAS-окрашивание на наличие базальных мембран и иммуногистохимическое исследование на маркер CD34 показало, что не все PAS-положительные структуры окрашивались антителами к CD34, что является признаком ВМ в опухолевой ткани подкожных ксенографтов (рис. 5.7).

Комбинированное CD34/PAS-окрашивание представлено на рис. 5.4. Был проведен анализ пролиферативной активности опухолевой ткани подкожных ксенографтов и анализ экспрессии VEGF и его двух рецепторов (VEGFR-1 и VEGFR-2). В результате иммуногистохимического анализа опухолевой ткани подкожных ксенографтов была выявлена высокая экспрессия рецепторов сосудистого фактора роста VEGF (рис. 5.8).

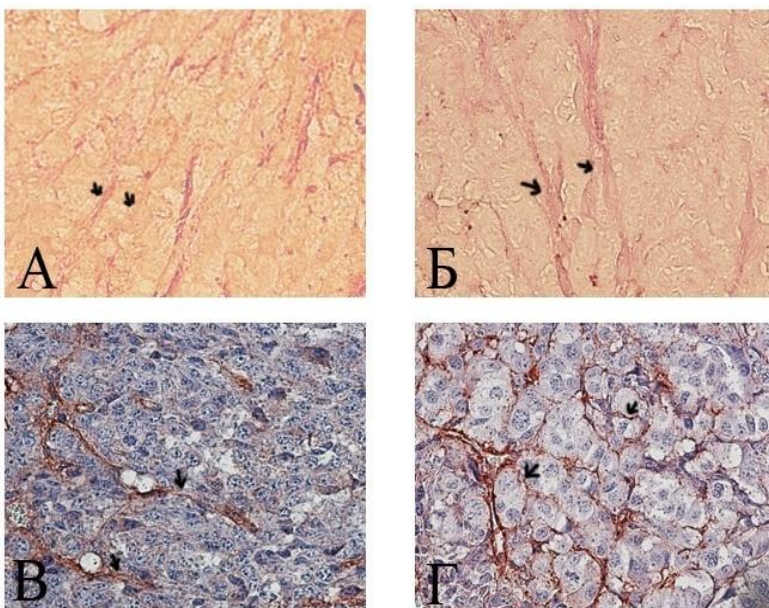


Рис. 5.6. Окрашивание подкожных ксенографтов на наличие базальных мембран, увеличение $\times 200$:

- А – PAS⁺ параллельные каналы (стрелки),
 Б – PAS⁺ параллельные с пересечением каналы (стрелки),
 В – ламинин⁺ параллельные с пересечением каналы (стрелки),
 Г – ламинин⁺ петли и арки (стрелки)

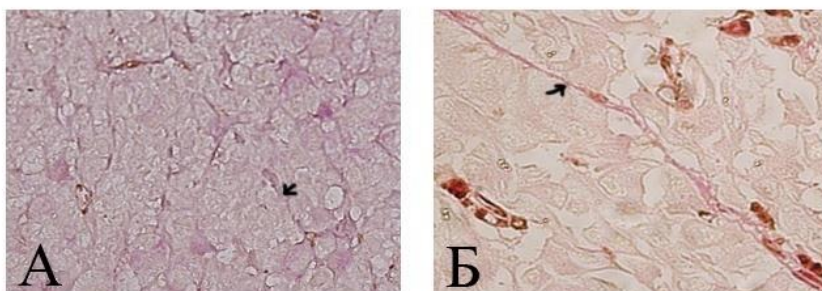


Рис. 5.7. Комбинированное CD34/PAS-окрашивание:
 А – комбинированное CD34/PAS-окрашивание, $\times 200$, выявление CD34-/PAS⁺-структур (BM-структур, стрелка),
 Б – BM-структура (стрелка), $\times 400$

Отметим, что при повышении VEGFA увеличивается экспрессия VEGFR-1, что свидетельствует об активации сигнальных механизмов, запускаемых данным рецептором, приводящим к усилению миграционного потенциала опухолевых клеток, реализуемого через PI3K и ERK [21].

Для VEGF характерно цитоплазматическое окрашивание средней интенсивности. Ядерная экспрессия Ki-67 была характерна для 30–40% клеток опухоли (рис. 5.8 Г).

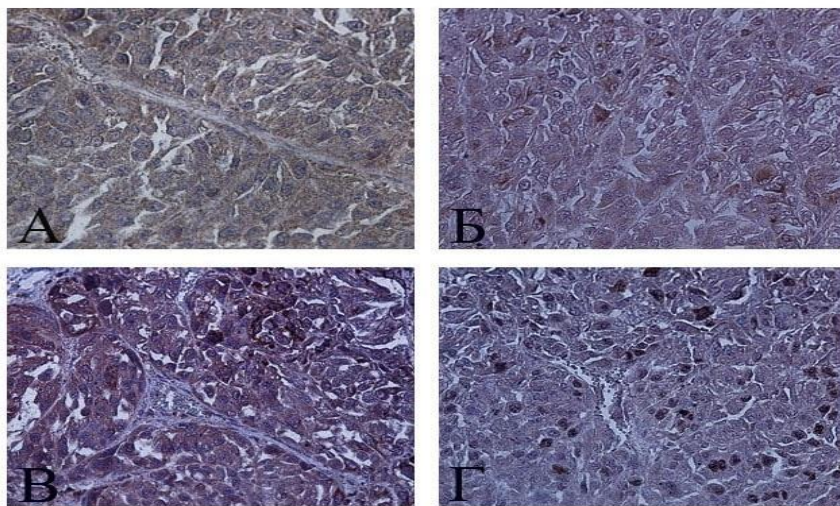


Рис. 5.8. Экспрессия VEGF и его рецепторов, маркера пролиферации Ki-67, $\times 200$:

А – экспрессия VEGF, Б – экспрессия VEGFR-2,
В – экспрессия VEGFR-1, Г – экспрессия Ki-67

Таким образом, клеточную линию *mel Cher* можно рассматривать как модель для изучения ВМ *in vitro* и *in vivo*. Экспериментальная модель васкулогенной мимикрии, клеточная линия *mel Cher*, запатентована и рекомендуется для исследования феномена ВМ в качестве положительной модели.

Разработаны и специальные экспериментальные подходы для исследования изменения экспрессии белков ВМ в момент формирования сосудистоподобных структур на Матригеле. Различная способность клеточных линий метастической меланомы кожи к васкулогенной мимикрии является в данном случае преимуществом [22].

Список литературы

1. Kerbel R. S. Tumor angiogenesis: past, present and the near future // *Carcinogenesis*. 2000. Vol. 21(3). P. 505–515.
2. Степанова Е. В., Вартанян А. А., Личиницер М. Р. Васкулярная мимикрия при злокачественных образованиях // *Молекулярная медицина*. 2006. Т.1. С. 23–30.
3. Hendrix M. J. C., Seftor E. A., Hess A. R., Seftor R. E. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma // *Nature Reviews Cancer*. 2003. Vol. 3(6). P. 411–421.
4. Seregard S., Spangberg B., Juul C., Oskarsson M. Prognostic accuracy of the mean of the largest nucleoli, vascular patterns, and PC-10 in posterior uveal melanoma // *Ophthalmology*. 1998. Vol. 105(3). P. 485–491.
5. Donovan D., Brown N. J., Bishop E. T., Lewis C. E. Comparison of three in vivo human angiogenesis assays with capillaries formed in vivo // *Angiogenesis*. 2001. Vol. 4(2). P. 113–121.
6. Abbott D. E., Bailey C. M., Postovit L. M., Seftor E. A., Margaryan N., Seftor R. E., Hendrix M. J. The epigenetic influence of tumor and embryonic microenvironments: how different are they? // *Cancer Microenvironment*. 2008. Vol. 1(1). P. 13–21.
7. Seftor E. A., Meltzer P. S., Schatteman G. C., Gruman L. M., Hess A. R., Kirschmann D. A., Seftor R. E. B., Hendrix M. J. C. Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry // *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 2002. Vol. 44(1). P. 17–27.
8. Van der Schaft D. W. J., Seftor R. E. B., Seftor E. A., Hess A. R., Gruman L. M., Kirschmann D. A., Yokoyama Y., Griffioen A. W., Hendrix M. J. C. The differential effects of angiogenesis inhibitors on vascular network formation by endothelial cells versus aggressive melanoma tumor cells // *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2004. Vol. 96(19). P. 1473–1477.
9. Hess E. A., Seftor E. A., Gardner L. M. G., Carles-Kinch K., Schneider G. B., Kinch M. S., Seftor R. E. B., Hendrix M. J. C. Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation: role of epithelial cell kinase (Eck/EphA2) // *Cancer Res*. 2001. Vol. 61(8). P. 3250–3255.
10. Easty D. J., Hill S. P., Hsu M. Y., Fallowfield M. E., Flores V. A., Herlyn M., Bennett D. C. Up-regulation of ephrin-A1 during melanoma progression // *Int. J. Cancer*. 1999. Vol. 84(5). P. 494–501.

11. Straume O., Akslen L. A. Importance of vascular phenotype by basic fibroblast growth factor, and influence of the angiogenic factors basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor-1 and Ephrin-A1/EphA2 on melanoma progression // *Am. J. Pathol.* 2001. Vol. 160(3). P. 1009–1019.
12. Zhu Z., Witte L. Inhibition of tumor growth and metastasis by targeting tumor-associated angiogenesis with antagonists to the receptors of vascular endothelial growth factor // *Invest New Drugs.* 1999. Vol. 17(3). P. 195–212.
13. Levy A. P., Tamargo R., Brem H., Nathans D. An endothelial cell growth factor from the mouse neuroblastoma cell line NB4 // *Growth Factors.* 1989. Vol. 2(1). P. 9–19.
14. Rahimi N., Dayanir V., Lashkari K. Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275(22). P. 16986–16992.
15. Takahashi T., Yamaguchi S., Chida K., Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-g and DNA synthesis in vascular endothelial cells // *EMBO J.* 2001. Vol. 20(11). P. 2768–2778.
16. Martin T. A., Watkins G., Lane G., Jiang W. G. Assessing microvessels and angiogenesis in human breast cancer, using VE-cadherin // *Histopathology.* 2005. Vol. 46(4). P. 422–430.
17. Folberg R., Hendrix M. J. C., Maniotis J. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis // *Am. J. Pathol.* 2000. Vol. 156(2). P. 361–381.
18. Giannelli G., Falk-Marzillier J., Schiraldi O., Stetler-Stevenson W. G., Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5 // *Science.* 1997. Vol. 277(5323). P. 225–228.
19. Seftor E. A., Meltzer P. S., Kirschmann D. A., Pe'er J., Maniotis A. J., Trent J. M., Folberg R., Hendrix M. J. C. Molecular determinants of human uveal melanoma invasion and metastasis // *Clin. Exp. Metastasis.* 2002. Vol. 19(3). P. 233–246.
20. Maniotis A. J., Folberg R., Hess A., Seftor E. A., Gardner L. M., Pe'er J., Trent J. M., Meltzer P. S., Hendrix M. J. C. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry // *Am J Pathology.* 1999. Vol. 155(3). P. 739–752.
21. Seetharam L., Gotoh N., Maru Y., Neufeld G., Yamaguchi S.,

Shibuya M. A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for Vascular endothelial growth factor VEGF // Oncogene. 1995. Vol. 10(1). P. 135–147.

22. Григорьева И. Н. Васкулогенная мимикрия при меланоме кожи: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.12. – М., 2011. – 112 с.

Глава 6.

ФЛЮОРЕСЦИРУЮЩАЯ КЛЕТОЧНАЯ ЛИНИЯ MEL KOR-TURBORFP*

Возможности современной онкологии значительно расширились с появлением фотодинамической терапии. ФДТ – один из новых методов лечения злокачественных новообразований, основанный на использовании фотодинамического повреждения опухолевых клеток в ходе фотохимической реакции, основана на селективном накоплении фотосенсибилизатора в опухоли с последующим облучением новообразования светом определенной длины волны, соответствующей пику поглощения ФС. В результате в опухоли или её сосудистой системе происходит фотохимическая реакция с образованием синглетного кислорода и кислородных свободных радикалов, оказывающих токсическое действие на опухолевые клетки. Опухоль резорбируется и постепенно замещается соединительной тканью [1].

Современные достижения в области флуоресцентного имиджинга позволяют проводить непрерывный визуальный мониторинг многочисленных процессов, происходящих в живых организмах на клеточном и молекулярном уровнях. Флуоресцентный молекулярный имиджинг давно и успешно осуществляется с клеточным разрешением [2]. Уход в красную область спектра позволяет увеличить глубину проникновения света в живой организм и минимизировать токсические последствия облучения.

Одним из ключевых моментов экспериментальной онкологии является получение адекватных *in vivo* моделей опухолей лабораторных животных, рост, развитие и метастазирование которых можно было бы изучать в режиме реального времени, по возможности не-

* Авторы: Меерович И. Г., Жердева В. В., Трещалина Е. М.,
Барышников А. Ю., Савицкий А. П.

инвазивным способом, без умерщвления животных в процессе эксперимента и последующих сложных препаративных гистологических и гистохимических процедур. В частности, для этого используется трансфекция клеток опухолевой культуры цветными флуоресцентными белками. Последние являются уникальными генетическими маркерами для изучения молекулярных процессов в живых, постоянно развивающихся клетках и организмах. Эти белки могут быть гетерологически экспрессированы в любых клетках, а для появления их флуоресцентного сигнала не требуются дополнительные ферменты или кофакторы [3].

Использование FP-меченых опухолей и неинвазивного флуоресцентного имиджинга для целей ФДТ открывает дополнительные возможности при изучении механизма действия ФС и эффективности такой терапии. Известны работы, в которых различные аспекты ФДТ изучались на опухолях, развившихся из FP-экспрессирующих опухолевых клеток. В частности, В.Chen et al. проводили ФДТ на модели опухоли, экспрессирующей флуоресцирующий белок EGFP. При помощи неинвазивной флуоресцентной визуализации EGFP они проводили мониторинг развития опухоли, а по флуоресценции введенного после сеанса ФДТ конъюгата флуорохрома с альбумином – васкулярный ответ опухоли на ФДТ [4].

С использованием флуоресцирующих моделей больших и малых метастазов изучалось распределение производного фотосенсибилизатора [5] в опухолях, экспрессирующих красный флуоресцирующий белок.

Получение клеточной линии *melKor-TurboRFP*

На основе клеточной линии человеческой меланомы *mel Kor*, полученной из опухолевого образца диссеминированной меланомы кожи человека [6], при помощи вектора TurboRFP-C [7], кодирующего экспрессию красного флуоресцирующего белка TurboRFP и предназначенного для клеток млекопитающих, была получена флуоресцирующая клеточная линия *melKor-TurboRFP* (рис. 6.1) [8]. Для этого плазмидную ДНК рTurboRFP-C (“Евроген”, Россия) нарабатывали с использованием штамма *E. coli* DH5α, затем выделяли и очищали при помощи набора “EndofreePlasmidMaxiKit” (Qiagen, США) с целью очистки от эндотоксинов, что уменьшает токсичность процесса трансфекции для клеток. Трансфекцию проводили при помощи липосомального реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen,

США), оптимизируя условия для получения наиболее интенсивно флуоресцирующих и жизнеспособных трансфицированных клеток. После трансфекции смесь трансфицированных и нетрансфицированных клеток подвергали селекции при помощи генетина (антибиотик G418, аналог неомицина) в концентрации в ростовой среде 800 мкг/мл. Смену селектирующей среды с антибиотиком производили каждый 4 день, селекцию производили в течение 2 нед. Из полученной популяции трансфицированных клеток выделяли индивидуальные клоны флуоресцирующих клеток меланомы с использованием клонирующих цилиндров. Для повышения эффективности клонирования в полную среду добавляли кондиционную среду от гомологичных клеток, отобранную в log-фазе от клеток *mel Kor* меланомы и обогащенную среду Ham's F12 (DMEM, Ham's F12 и кондиционная среды взяты в соотношении 1 : 1 : 1).

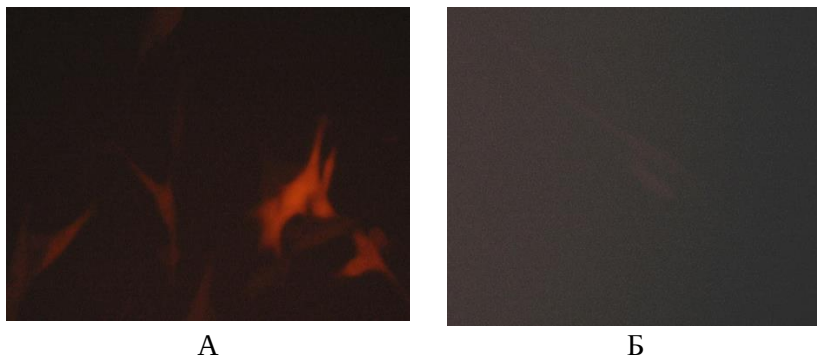


Рис. 6.1. Флуоресцентные микрофотографии опухолевых клеток
Микроскоп TE 2000-U, $\times 40$:
А – линия *mel Kor-TurboRFP*;
Б – исходные клетки *mel Kor*.

Из полученных клонов производили отбор по следующим признакам:

- интенсивность флуоресценции (определялась визуально при помощи флуоресцентного инвертированного микроскопа и компьютеризированной спектрально-флуоресцентной установки «СПЕКТР-Кластер» («Кластер», Россия), в качестве базовой линии принималась автофлуоресценция нетрансфицированных клеток);
- стабильность флуоресценции после многократных пассажей в среде без селектирующего антибиотика G-418.

Характеристика клеточной линии *mel Kor-Turbo-RFP*

Клеточная линия *mel Kor-Turbo-RFP* не продемонстрировала существенных отличий от исходной *mel Kor* – как в условиях культивирования *in vitro*, так и при росте опухолей *in vivo* у мышей Nu/Nu.

Полученная клеточная линия *mel Kor-Turbo-RFP*, обладающая стабильными культуральными и морфологическими характеристиками, с помощью методов иммуофлуоресценции и иммуногистохимии была исследована на экспрессируемые антигены (дифференцировочные и гистосовместимости).

Дифференцировочные меланомные маркеры, определяющие отношение данной линии к меланоме, исследовали с помощью МКА к антигенам CD63 (при помощи иммуофлуоресцентных методов и последующей проточной флуоресцентной цитометрии), HMB45, MelanA, Tyrosinaza (при помощи иммуногистохимического исследования срезов флуоресцирующей опухоли).

Экспрессия антигенов гистосовместимости исследовали при помощи иммуофлуоресцентных методов и последующей проточной флуоресцентной цитометрии.

Экспрессию антигенов CD63 и гистосовместимости изучали как для культивированных клеток *mel Kor-TurboRFP*, так и для клеток, выделенных из выращенной у животного флуоресцирующей опухоли.

Установлено, что клеточная линия *mel Kor-TurboRFP* характеризуется экспрессией меланомных (дифференцировочных) маркеров CD63, HMB45, MelanA, Tyrosinase, и отсутствием экспрессии антигенов гистосовместимости I и II классов, что подчеркивает специфичность данной клеточной линии и соответствует свойствам исходной клеточной линии *mel Kor* [9].

Использование флуоресцирующей клеточной линии *mel Kor-TurboRFP*

Клетки *mel Kor-TurboRFP*, находящиеся в log-фазе роста, рассаживали на 96-луночные культуральные планшеты, за исключением крайних вертикальных и горизонтальных рядов, в полной ростовой среде в количестве, необходимом для получения 80% монослоя к моменту исследования противоопухолевого действия. Затем ростовую среду, в которой происходил рост клеток, заменяли на ростовую

среду, содержащую противоопухолевый агент в различных концентрациях (каждая – в 6 повторях), и оставляли клетки в условиях CO₂-инкубатора. После инкубации заменяли среду, содержащую противоопухолевый агент, на полную ростовую среду и оставляли на сутки. Затем параллельно проводили два теста для определения количества выживших клеток. В одном случае клетки отмывали от среды при помощи фосфатно-солевого буфера Дюльбекко (PBD) и добавляли по 100 мкл этого же буфера в каждую лунку планшета, а затем измеряли флуоресценцию при помощи флуориметра Labsystems Fluoroscan II (для возбуждения флуоресценции использовался интерференционный фильтр с длиной волны спектрального максимума 544 нм, для регистрации – фильтр с длиной волны максимума 607 нм). В другом случае использовали известный метаболический тест, отражающий жизненную активность клеток, основанный на использовании производного флуоресцеиндиацетата [10], проведенный по методике [11]. В обоих случаях число выживших клеток определялось на основе калибровочной кривой. Последняя строилась как зависимость флуоресцентного сигнала от количества посаженных клеток, для чего использовался культуральный микропланшет, в котором клетки были посажены одновременно с вышеуказанными планшетами, но следующим образом: во 2 ряду – то же количество клеток, что и в планшетах для определения противоопухолевой активности, в 3-1 рядах – раститровка от этого количества в 2 раза. 12 ряд на всех планшетах использовался как контроль без клеток.

Произведенные эксперименты с противоопухолевым препаратом лизомустин [12] продемонстрировали хорошую корреляцию между полученными кривыми выживаемости клеток, между концентрациями, необходимыми для достижения доли погибших клеток 50 и 90%, определенными при помощи этих методов. Эксперименты с циклофосфамидом, который не действует на опухолевые клетки в условиях *in vitro*, также показали корреляцию между двумя методами (рис. 6.2).

Таким образом, с использованием флуоресцирующей клеточной линии *mel Kor-TurboRFP* противоопухолевую (противомеланомную) эффективность веществ *in vitro* можно определять без использования дополнительных функциональных тестов, которые предполагают инкубацию с реагентами для определения выживаемости и ряд дополнительных манипуляций.

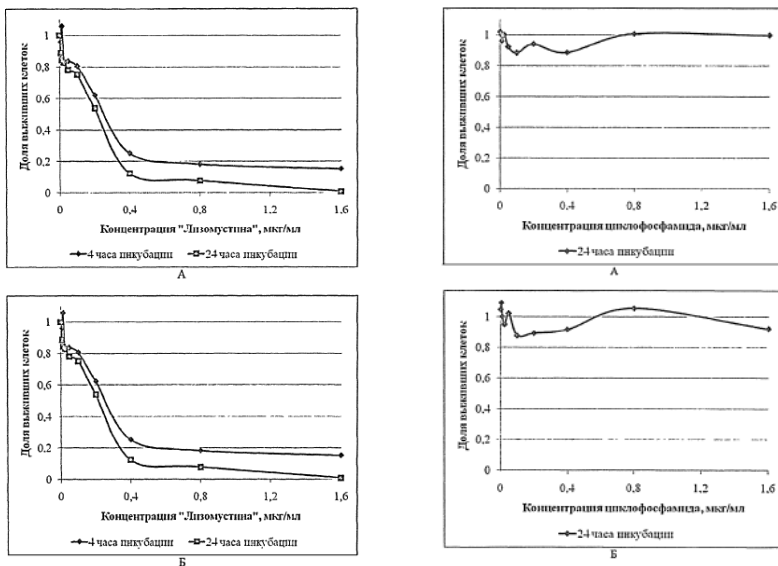


Рис. 6.2. Действие цитотоксических агентов на клетки линии *mel Kor-TurboRFP in vitro*:

А – определение по собственной флуоресценции клеток,

Б – определение по ФДА-тесту

Использование клеток клеточной линии *mel Kor-TurboRFP in vivo*

Клетки выращивают в культуральных флаконах в необходимом количестве, снимают раствором трипсин-ЭДТА, трижды отмывают холодным фосфатно-солевым буфером Дюльбекко с последующим центрифугированием (1000 об/мин, 5 мин), ресуспендируют в необходимом количестве (100–400 мкл) этого же буфера или физиологического раствора хлорида натрия и хранят на льду до инокуляции (не более получаса). Суспензия клеток в объеме 100–400 мкл вводится подкожно мышам линии Nu (самки, возраст 8–11 нед.). Минимальная перевивочная доза составляет 2×10^6 к-к на животное.

При перевивочной дозе 8×10^6 к-к на животное опухоли образуются в 100% случаев.

Скорость роста опухоли *mel Kor-TurboRFP* не имеет существенных отличий от скорости роста опухоли *mel Kor*.

Флуоресценция опухоли *mel Kor-TurboRFP* в красно-оранжевой

области регистрируется при помощи флуороспектрометрии и других флуоресцентных методов в течение всего периода развития опухоли. Клетки полученной клеточной линии экспрессируют цветной флуоресцирующий белок, что позволяет исследовать развитие первичных опухолей в режиме реального времени при помощи приборов, предназначенных для регистрации флуоресценции.

Рост опухолей и их ответ на противоопухолевое воздействие также может быть зафиксирован при помощи диффузной флуоресцентной томографии. При использовании этого метода реконструируется трехмерное изображение флуоресцентной опухоли в организме мыши. Например, нами было показано воздействие ФДТ с ФС “Фотосенс” [9] и “Тиосенс” [13] на флуоресцирующие опухоли *mel Kor-TurboRFP*.

Другие флуоресцирующие клеточные линии, созданные на основе *mel Kor*

Были созданы клеточные линии, экспрессирующие красный флуоресцирующий белок DsRed2 и дальне-красный флуоресцирующий белок mKate2.

Представляются также интересными свойства полученной нами клеточной линии *mel Kor*, экспрессирующей генетически кодируемый сенсор каспазы 3. Этот сенсор представляет собой FRET-пару, включающую красный флуоресцирующий белок TagRFP и возгорающийся флуоресцентный белок KFP, разделенную спейсером, включающим сайт распознавания и расщепления каспазой 3. При возникновении каспаза-зависимого апоптоза происходит расщепление спейсера, в результате увеличивается время жизни флуоресценции.

Таким образом, клетки полученных клеточных линий экспрессируют генетически кодируемые сенсоры на основе цветных флуоресцирующих белков, что позволяет:

- эффективно исследовать действие противоопухолевых агентов на монослои этих клеток *in vitro*, не применяя трудоемкий подсчет клеток при помощи камеры Горяева или функциональные тесты жизнеспособности клеток, требующие дополнительных манипуляций с соответствующими реагентами;
- исследовать развитие первичных опухолей и метастазов, а также ответ опухоли на терапию в режиме реального времени при

помощи приборов, предназначенных для регистрации флуоресценции и времени жизни флуоресценции.

Список литературы

1. Henderson B. W., Dougherty T. J. How does photodynamic therapy work? // *Photochem Photobiol.* 1992. Vol. 55(1). P. 145–157.
2. Hoffman R. M. Imaging in mice with fluorescent proteins: from macro to subcellular // *Sensors.* 2008. Vol. 8(2). P. 1157–1173.
3. Hoffman R. M. Advantages of multi-color fluorescent proteins for whole-body and in vivo cellular imaging // *J. of Biomed. Optics.* 2001. Vol. 10(4). P. 1–10.
4. Chen B., Crane C., He C. Disparity between prostate tumor interior versus peripheral vasculature in response to verteporfin-mediated vascular-targeting therapy // *Int. J. Cancer.* 2008. Vol. 123(3). P. 695–701.
5. Goldshaid L., Rubinstein E., Brandis A., Segal D., Leshem N., Brenner O., Kalchenko V., Eren D., Yechezkel T., Salitra Y., Salomon Y., Scherz A. Novel design principles enable specific targeting of imaging and therapeutic agents to necrotic domains in breast tumors // *Breast Cancer Res.* 2010. Vol. 12(3).
6. Михайлова И. Н., Барышников А. Ю., Морозова Л. Ф., Бурова О. С., Демидов Л. В., Козлов А. М., Ларин С. С., Георгиев Г. П., Ворожцов Г. Н., Гнучев Н. В. Клеточная линия меланомы человека mel Kor, используемая для получения противоопухолевых вакцин // Патент РФ № 2287578, 22.04.2005.
7. Lukyanov S. A., Chudakov D. M. Fluorescent proteins and methods for using same // Patent US 8138320, 25.01.2006.
8. Меерович И. Г., Жердева В. В., Арсланбаева Л. Р., Савицкий А. П., Бурова О. С., Михайлова И. Н., Морозова Л. Ф., Барышников А. Ю. Флуоресцирующая клеточная линия mel Kor-TurboRFP и способ её использования для исследований in vitro в экспериментальной онкологии // Патент РФ №2458123, 10.08.2012.
9. Savitsky A. P., Meerovich I. G., Zherdeva V. V., Arslanbaeva L. R., Burova O. S., Sokolova D. V., Treshchalina E. M., Baryshnikov A. Yu., Fiks I. I., Orlova A. G., Kleshnin M. S., Turchin I. V., Sergeev A. M. Three-dimensional in vivo imaging of tumors expressing red fluorescent proteins. In: “In Vivo Cellular Imaging Using Fluorescent Proteins”, Ed. R.-M. Hoffman // *Methods in Molecular Biology.* 2012. Vol. 872. P. 97–114.
10. Sellers R., Cook S., Goldmacher V. C. A cytotoxicity assay utilizing a fluorescent dye that determines accurate surviving fractions of cells // *Immunol. Meth.* 1994. Vol. 172(2). P. 255–264.

11. Meerovich I. G., Jerdeva V. V., Derkacheva V. M., Meerovich G. A., Lukyanets E. A., Kogan E. A., Savitsky A. P. Photodynamic activity of dibiotinylated aluminium sulphphthalocyanine in vitro and in vivo // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*. 2005. Vol. 80(1). P. 57–64.

12. Ланцова А. В., Барышников А. Ю., Оборотова Н. А. Наноструктурированные формы противоопухолевых препаратов. // М.: Lambert Academic Publishing. 2012. 188 с.

13. Меерович И. Г., Казачкина Н. И., Савицкий А. П. Изучение действия фотосенсибилизатора Тиосенс на опухолевую модель *mel Kor-TurboRFP*, экспрессирующую красный флуоресцирующий белок // *Российский химический журнал*. 2013. № 3. С. 55–60.

14. Rusanov A. L., Ivashina T. V., Vinokurov L. M., Fiks I. I., Orlova A. G., Turchin I. V., Meerovich I. G., Zherdeva V. V., Savitsky A. P. Lifetime imaging of FRET between red fluorescent proteins // *Journal of Biophotonics*. 2010. Vol. 3(12). P. 774–783.

Глава 7.

ТРАНСФИЦИРОВАННЫЕ ЛИНИИ MEL P И MEL KOR*

Генно-инженерные вакцины – препараты, полученные с помощью биотехнологии, которая, по сути, сводится к генетической рекомбинации. Для начала получают ген, который должен быть встроен в геном реципиента. В настоящее время для этого используют ПЦР с праймерами к последовательности желаемого гена и последующим клонированием полученного фрагмента в векторную молекулу с использованием эндонуклеаз рестрикции. Вектором служат плазмиды, бактериофаги, вирусы человека или животных. Экспрессируемый ген встраивается в клетку, которая начинает синтезировать не свойственное ей ранее вещество, кодируемое введенным генно-инженерным конструктором.

Повышение антигенности и, соответственно, иммунного ответа на вакцину достигается с помощью трансфекции клеток вакцин различными генами, продуцирующими значимые для данной патологии белки-антигены [1]. Для клеток меланомы изучены различные генные модификации. Один из выбранных генов – ген *tag-7* (PGRP-S), принадлежащий к новому семейству генов – пептидогликан распознающих белков [2]. Известно, что человеческий ген *tag-7* кодирует белок мМ около 25 кДа, который существует как в клеточно-ассоциированной, так и в секреторной форме. Образцы его экспрессии обнаруживают в костном мозге, селезенке, легких, кишечнике. Эозинофилы и нейтрофилы секретируют этот белок во время оксидативного взрыва и дегрануляции. Последовательность ДНК и аминокислотная последовательность находятся в GeneBank под номером AF076483. Природный секретируемый белок *tag-7* обладает рядом биологических особенностей. Секретирующие белок *tag-7* вакцинные клетки проявляют 2 вида биологической активности: хемо-

* Автор: Михайлова И. Н.

таксис по отношению к моноцитам периферической крови и способность активировать созревание ДК, для которых он является хемотактантом. Секретируемый белок tag-7 выявляется в мембранной функции клеток в культуральной среде и индуцирует апоптоз в различных линиях опухолевых клеток человека [2]. При цитологическом исследовании модифицированной tag7 опухоли показано резкое снижение митотической активности на фоне усиления процесса апоптоза с обширной инфильтрацией В-лимфоцитами. Экспрессия гена *tag-7* носит сложный и многокомпонентный характер и проявляется ингибированием пролиферации опухолевых клеток, сопряженной с активацией противоопухолевого иммунного ответа. В эксперименте на линии клеток слабо метастазирующей мышинной аденокарциномы молочной железы BMR-O, стабильно трансфицированной геном *tag-7* под контролем CMV-промотора, показано, что подкожная имплантация изогенным мышам приводит к получению клонов, стабильно продуцирующих белок tag-7. Полученная опухоль оказалась идентичной исходной по метастатической активности, но отличалась более медленным ростом *in vivo*, причем степень замедления роста коррелировала с уровнем экспрессии гена *tag-7*. Более того, добавление модифицированных клеток к интактным приводило к снижению их имплантационной способности. Это позволило считать, что трансфекция опухолевых клеток геном *tag-7* может быть использована для подавления опухолевого процесса [3].

Клеточная линия *mel Kor* использована в изобретении создания новой клеточной линии меланомы человека KG, обладающей способностью секретировать иммуноактивирующий цитокин-гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор. Способность клеток линии KG секретировать рекомбинантный GM-CSF достигается при помощи генной модификации клеток меланомы *mel Kor* генной конструкцией, содержащей комплементарную ДНК GM-CSF человека (SEQ ID NO : 1), встроенную в вектор, предназначенный для экспрессии в клетках млекопитающих. Секретируемый клетками KG GM-CSF обуславливает активацию иммунного ответа в отношении опухолевых антигенов, экспрессируемых клетками KG, при введении инактивированных клеток пациентам. Дополнительный технический результат, достигаемый при использовании клеток KG, заключается в том, что клетки KG, культивируемые *in vitro*, могут являться источником биологически активного GM-CSF,

который может быть использован для культивирования клеток, которым требуется присутствие GM-CSF в культуральной среде. Рекомбинантный GM-CSF человека, продуцируемый клетками KG, может быть использован как в качестве изолированного, высокоочищенного белка, так и в составе культуральной среды или ее дериватов. Полученная клеточная линия обладает стабильными культуральными, морфологическими и иммунологическими свойствами и обладает способностью секретировать рекомбинантный GM-CSF человека в результате генной модификации. Все клетки линии KG характеризуются стабильной секрецией GM-CSF, сохраняющейся после инактивации клеток ионизирующим облучением в дозе 100 Гр, надежно предотвращающей пролиферацию инактивируемых клеток. Линия клеток KG депонирована в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур под номером РККК (П) 699Д [4].

Список литературы

1. Dranoff G., Jaffee E., Lazenby A., et al. Vaccination with irradiated tumour cell engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumour immunity // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1993. Vol. 90(8). P. 3539–3543.
2. Kiselev S. L., Kustikova O. S., Korobko E. V., Prokhortchouk E. B., Kabishev A. A., Lukanidini E. M., Georgiev G. P. Molecular cloning and Characterization of the Mouse tag7 gene encoding a novel cytokine // *J. Biological chemistry*. 1998. Vol. 273(29). P. 18633–18639.
3. Киселев С. Л., Ларин С. С., Гнучев Н. В., Георгиев Г. П. Ген tag7 и генотерапия рака // *Генетика*. 2000. Т. 36, № 11. С. 1431–1435.
4. Бережной А. Е., Ларин С. С., Гнучев Н. В., Георгиев Г. П., Захарова Е. С., Барышников А. Ю., Демидов Л. В., Михайлова И. Н., Бурова О. С., Морозова Л. Ф., Козлов А. М. Линия клеток меланомы человека KG, секретирующих рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор // *Патент России* № 2362805, 27.07.2009.

Глава 8.

ЦЕЛЬНОКЛЕТОЧНЫЕ ВАКЦИНЫ «АЛЛОГЕН» И «МЕЛАВАК»*

Перспективы развития иммунотерапии меланомы связывают с созданием новых селективных методов, основанных на достижениях молекулярной и клеточной биологии.

Одним из таких методов является вакциноterapia, включающая различные модификации клеточной технологии. Среди последних лучшие терапевтические характеристики имеют генно-инженерные и дендритные вакцины. Вакциноterapia – метод, основанный на использовании антигена или комплекса антигенов для модуляции иммунного ответа [1]. Первые сообщения о противоопухолевой вакцине опубликованы более ста лет назад W. Coley [2], американским хирургом, который использовал экстракт синегнойной палочки для стимуляции противоопухолевого иммунного ответа. Главная цель иммунотерапии меланомы – увеличение у пациентов популяции CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), способных убивать опухолевые клетки [3]. Антигенный материал, используемый для создания таких вакцин, может быть в виде цельных опухолевых клеток (аллогенных или аутологичных) или специфических антигенов, РНК, протеинов или пептидных эпитопов, рестриктированных по первому или второму классу гистосовместимости [4]. В экспериментах и в клинике изучают подходы, использующие аутологичные меланомные клетки, трансфицированные геном ИЛ-12, ГМ-КСФ, ИЛ-2, ИЛ-4 и др. Вакцины на основе ауто- и аллогенных опухолевых клеток, модифицированных указанными генами, проходят клинические испытания [5; 6]. Помимо изучения таких вакцин в монорежиме, как правило, в последние годы их комбинируют с адъювантами, которые представлены цитокинами или нагруженными

* Авторы: Михайлова И. Н., Демидов Л. В., Барышников А. Ю.

дендритными клетками, инициирующими иммунный ответ презентацией антигенных эпитопов к Т-лимфоцитам [7]. Механизм действия вакцин связан с презентацией дендритными клетками опухолеассоциированных антигенов Т-клеткам пациента [8]. Чаще всего используют 1-2 антигенные детерминанты, чтобы достичь монотаргетного контакта вакцины с мишенью, что важно, прежде всего, для уменьшения некоторых побочных эффектов. Однако, по аналогии с цельноклеточными антибактериальными вакцинами, более эффективное их применение определяет большее число присутствующих в них антигенов [9]. Для лечения диссеминированной меланомы кожи монотаргетная стратегия создания вакцин пока себя не оправдывает в силу поликлональности опухоли, а также быстрой селекции клонов. Селекция является следствием не только скорости пролиферации, но и влияния микроокружения. Профиль экспрессии опухолеассоциированных антигенов чрезвычайно разнообразен, что требует мультитаргетных контактов с эффекторами для запуска программы клеточной гибели. Для осуществления этого актуально создание коллекции культур клеток меланомы, презентующих различные опухолеассоциированные антигены. Созданная Коллекция клеточных культур меланомы является источником вакцин, направленных на различные антигенные детерминанты и способных использовать максимальное число клеток-мишеней у разных пациентов на разных этапах роста и метастазирования опухоли.

Таким образом, создание Коллекции клеточных линий, их последующая трансфекция, проведение доклинических и клинических исследований определяют стратегию разработки цельноклеточных вакцин.

Основой создания вакцины «Аллоген» стала клеточная линия меланомы человека *mel P*, трансфицированная геном *tag7*. Линия *mel P* прошла более 100 пассажей и хорошо адаптирована к росту *in vitro* на среде с 10%-ной сывороткой.

Вакцина «Аллоген» получена из клеток меланомы человека линии *mel P/tag7*. Для проведения трансфекции геном *tag7* использовали препараты катионных липидов серии Unifectin-56. Для исключения туморогенности трансфицированные клетки сублетально облучали в дозе 100 Гр на γ -установке «Стебель3А» при мощности 5 Гр/мин. Лекарственная форма вакцины «Аллоген» представляет собой прозрачную бесцветную жидкость для внутрикожного приме-

нения. Готовый вакцинный препарат прошел стандартное тестирование на отсутствие каких-либо загрязнений, стерилизован на γ -установке «Стебель3А», разлит в аликвоты по 1 и 5 млн соответственно начальной разовой дозе для человека.

Основой для создания модифицированной генноинженерной вакцины «Мелавак» стала клеточная линия меланомы человека *mel Kor*. Она была трансфицирована геном GM-CSF. Линия *mel Kor* прошла более 100 пассажей и хорошо адаптирована к росту *in vitro* на среде RPMI с 10%-й сывороткой. Линия стабильно трансфицирована геном GM-CSF и имеет генетическую конструкцию – вектор рВК-CMV (Clon Tech, США) со встроенной кДНК GM-CSF человека (под руководством акад. РАН Георгиева Г. П.). Вид трансфекции – стабильная, интегрированная, метод трансфекции – липофекция, при помощи набора Unifectin-56. Уровень трансфекции составил 100%.

Количество секретируемого GM-CSF – 84,0 нг в 1×10^6 клеток за 24 ч. Для исключения туморогенности трансфицированные клетки сублетально облучали в дозе 100 Гр на γ -установке «Стебель3А» при мощности 5 Гр/мин. Лекарственная форма вакцины «Мелавак» для внутрикожного применения представляет собой взвесь клеток *mel Kor* в питательной среде при трансфекции не менее 30–80%. Это прозрачная бесцветная жидкость в эпендорфах, которые хранят в сосуде Дьюара с жидким азотом при температуре -196°C . Вакцина «Мелавак» предназначена человеку для внутрикожного применения.

Список литературы

1. Restifo N., Sznol M. Cancer vaccines / Cancer: Principles & Practice of Oncology, 5th ed./Eds. V. DeVita, S. Helmann, S. Rosenberg. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1997. Chapter 61. P. 3023–3043.
2. Coley W. B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: With a report of ten original cases // Am. J. Med. Sci. 1893. Vol. 105(5). P. 487–511.
3. Shanker A., Buferne M., Schmitt-Verhulst A-M. Cooperative action of CD8 T lymphocytes and natural killer cells controls tumour growth under conditions of restricted T-cell receptor diversity // Blackwell Publishing Ltd, Immunology. 2009. Vol. 129(1). P. 41–54.
4. Heimburg-Molinaro J., Lum M., Vijay G., Jain M., Almogren A.,

Rittenhouse-Olson K. Cancer vaccines and carbohydrate epitopes // *Vaccine*. 2011. Vol. 29(48). P. 8802–8826.

5. Soiffer R., Hodi F. S., Haluska F., Jung K., Gillessen S., Singer S., Tanabe K., Duda R., Mentzer S., Jaklitsch M., Bueno R., Clift S., Hardy S., Neuberg D., Mulligan R., Webb I., Mihm M., Dranoff G. Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma // *J. Clin. Oncol.* 2003. Vol. 21(17). P. 3343–3350.

6. Maio M., Fonsatti E., Lamaj E., Altomonte M., Cattarossi I., Santantonio C., Melani C., Belli F., Arienti F., Colombo M. P., Parmiani G. Vaccination of stage IV patients with allogeneic IL-4- or IL-2-gene-transduced melanoma cells generates functional antibodies against vaccinating and autologous melanoma cells // *Cancer Immunol Immunother.* 2002. Vol. 51(1). P. 9–14.

7. Zhang H. L., Yuan C., Zhang D. M., Shi H. S., Li M., Luo Z. C., Wan Y., Lu L., Luo S. T., Yang L. A novel combined conjugate vaccine: enhanced immunogenicity of bFGF with CRM197 as a carrier protein // *Mol. Med. Report.* 2011. Vol. 4(5). P. 857–863.

8. Nencioni A., Grunebach F., Patrone F., Brossart P. Anticancer vaccination strategies // *Annals of Oncology.* 2004. Vol. 15. P. 153–160.

9. Geier D., Geller M. The true story of pertussis vaccination // *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences.* 2002. Vol. 57(3). P. 249–284.

Глава 9.

ЭКСПРЕССИЯ СПЕРМОСПЕЦИФИЧНОЙ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ В МЕЛАНОМНЫХ КЛЕТКАХ*

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа – один из самых изученных и распространенных ферментов. К настоящему времени механизм реакции окисления глицеральдегид-3-фосфата и строение соматического фермента детально исследованы. Нативная молекула GAPD состоит из четырех идентичных субъединиц массой по 36 кДа и содержит четыре активных центра, состоящих из субстрат- и кофактор-связывающих доменов.

GAPD катализирует реакцию гликолитической оксидоредукции, в результате которой образуется первое макроэргическое соединение в цепи гликолиза – 1,3 дифосфоглицерат, используемый далее для синтеза АТФ. Кроме того, в этой реакции происходит восстановление NAD до NADH, который является одним из субстратов окислительного фосфорилирования в митохондриях.

GAPD присутствует в значительных количествах в клетках всех органов и тканей животных – ее содержание достигает 5–15% от содержания растворимых белков клеток. GAPD является конститутивным белком, кодируемым «геном домашнего хозяйства» («*housekeeping gene*»). По этой причине мРНК GAPD и белок GAPD используют в качестве стандартного контроля при исследовании экспрессии или синтеза различных белков в клетке. Долгое время было принято считать, что никакой регуляторной роли GAPD не играет, и какая-либо связь между активностью этого фермента и развитием патологических состояний отсутствует. Однако постепенно стало накапливаться все больше фактов о негликолитических функ-

* Авторы: Муронец В.И., Куравский М. Л., Севостьянова И. А., Куликова К. В., Шмальгаузен Е. В.

циях этого фермента. Так, было показано, что GAPD принимает участие во многих перечисленных ниже негликолитических процессах, которые как раз и могли бы быть связаны с возникновением различных патологий: эндоцитоз [1–3], слияние плазматических мембран [4], сборка микротрубочек [5–7], транспорт секреторных везикул [8, 9], фосфорилирование белков [10, 11], трансляционный и транскрипционный контроль генной экспрессии [12–14], регуляция структуры теломерных участков хромосом [15, 16], слияние ядерных мембран [17], транслокация молекул мРНК через ядерную мембрану [18], эксцизионная репарация ДНК [19, 20] и индукция апоптоза [21–25]. Кроме того, GAPD может быть вовлечена в механизм развития таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера [26–28] и болезнь Хантингтона [28–30].

Хорошо известно, что наряду с разнообразными особенностями раковых клеток, для них характерно нарушение индукции апоптоза и регуляции гликолиза. В оба эти процесса может быть вовлечена GAPD.

Так, известно, что эффект Пастера, заключающийся в подавлении гликолиза в аэробных условиях, не характерен для раковых клеток. В них наблюдается активное протекание гликолиза, скорость которого не замедляется в присутствии кислорода. Такое изменение регуляции энергетического обмена известно как эффект Варбурга. Переход на бескислородный способ энергетики, согласно Варбургу, приводит к автономному бесконтрольному существованию клетки: она начинает вести себя как самостоятельный организм, стремящийся к воспроизведению [31, 32]. Обнаруженное нами появление ацилфосфатазной активности у частично окисленной GAPD при сохранении основной гликолитической функции может играть определенную роль в сопряжении гликолиза и дыхания. Мы показали, что в нормальных клетках частичное окисление GAPD приводит к разобщению окисления и фосфорилирования в гликолизе, что позволяет скоординировать процессы, происходящие при дыхательном фосфорилировании с гликолитическими реакциями (рис. 9.1).

Кроме того, как в наших работах, так и в работах других исследователей было показано, что GAPD образует комплексы с различными гликолитическими ферментами [35–38], а также со структурными элементами клетки, что позволяет регулировать скорость протекания гликолиза [5, 39–41]. Очевидно, что изменение свойств

GAPD или появление ее изоферментов при онкологических патологиях может изменять сопряжение гликолиза и дыхательного фосфорилирования, а также характерные для GAPD белок-белковые взаимодействия, участвуя тем самым в возникновении эффекта Варбурга и в иных нарушениях энергетического метаболизма.

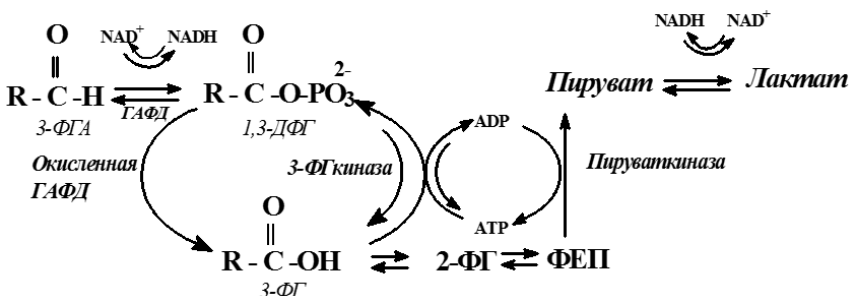


Рис. 9.1. "Футильный" цикл гликолиза – разобщение окисления и фосфорилирования [33, 34]

За последние 15 лет накопилось также много фактов об участии GAPD в индукции апоптоза [21, 42–45]. В нормальных клетках большая часть GAPD находится в виде активных тетрамерных молекул и локализована в цитоплазме. Некоторое количество GAPD адсорбировано на структурных элементах клетки – актиновых стресс-фибриллах, микротрубочках и т.д. Вероятно, часть адсорбированной GAPD находится в димерной или мономерной форме, что позволяет идентифицировать ее с помощью специфических МКА против нативных форм фермента. Ситуация изменяется при воздействии на клетку цитотоксических факторов и при индукции апоптоза ФНО или H_2O_2 . В этом случае происходит транслокация мономерных или димерных форм GAPD в ядро. На первом этапе происходит окисление сульфгидрильных групп активного центра GAPD, вызывающее ослабление связывания с ферментом кофактора NAD. Образующаяся апоформа GAPD легко диссоциирует на субъединицы, проникающие за счет пассивного транспорта в ядро клетки. После связывания субъединиц GAPD с ядерными нуклеиновыми кислотами происходит дальнейшее разворачивание белка с экспонированием «сигнала ядерного экспорта» ("nuclear export signal" – NES). Денатурированные полипептидные цепи GAPD переходят в цитоплазму, где могут подвергаться дальнейшим превращениям – агрегации, связы-

ванию с шаперонами и убиквитинированию. Перемещение ненативных форм GAPD из цитоплазмы в ядро без каких-либо внешних сигналов характерно также для некоторых линий раковых клеток – например, клеток HeLa.

Очевидно, что в процесс индукции апоптоза GAPD вовлечена не как гликолитический фермент, а как «мессенджер» белковой природы, участвующий в разнообразных белок-белковых и белок-лигандных взаимодействиях. Важнейшую роль в этой функции GAPD играют ее способность чрезвычайно прочно кооперативно связывать кофактор NAD, возможность регулирования этого связывания путем модификации сульфгидрильных групп активного центра и, наконец, присутствие «сигнала ядерного экспорта». В заключение следует отметить, что все указанные выше особенности GAPD характерны для соматической формы дегидрогеназы, которая и исследовалась в течение длительного времени практически во всех работах. Очевидно, что отсутствие любого признака, характерного для соматического фермента, должно кардинальным образом изменять как энергетический метаболизм, так и те элементы апоптического пути клеток, в которые он вовлечен.

Спермоспецифичная глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDS)

Далее мы подробно остановимся на особенностях другой формы глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы – спермоспецифичной – и проиллюстрируем возможность ее участия в развитии злокачественной трансформации клеток результатами, полученными в наших работах. Спермоспецифичная GAPDS приспособлена для осуществления гликолиза с целью обеспечения энергией подвижности хвоста сперматозоида. У этого фермента отсутствуют почти все негликолитические функции, характерные для соматической формы. Без этих функций он прекрасно функционирует в сперматозоидах, однако экспрессия спермоспецифичной GAPDS в других клетках должна существенно влиять на их жизнедеятельность. Таким образом, главной целью нашей работы было получение доказательств экспрессии GAPDS в раковых клетках для выяснения ее роли в регуляции энергетического обмена и индукции апоптоза.

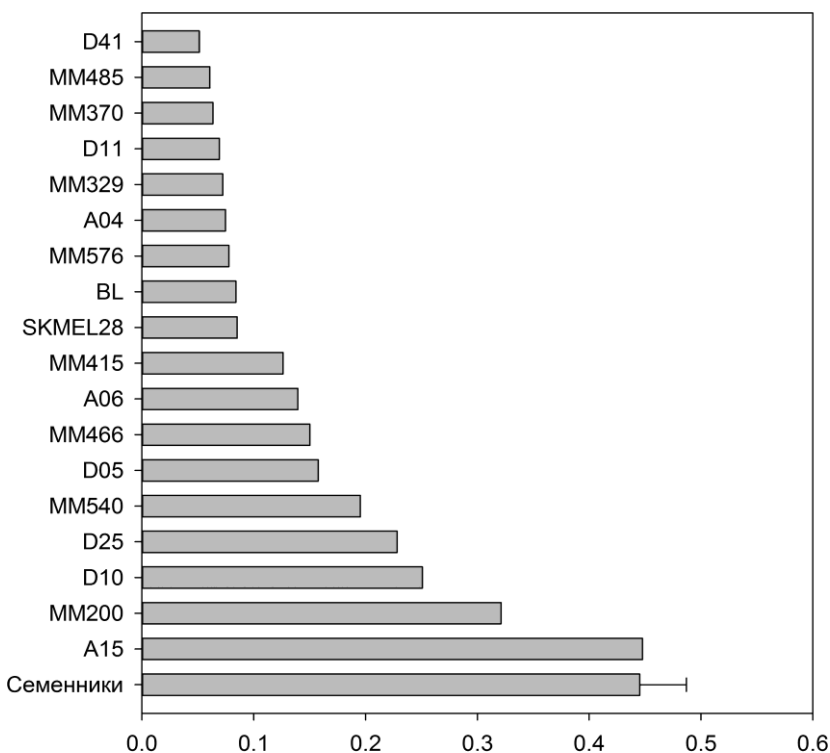
GAPDS – изофермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, который встречается только в сперматозоидах. Соматическая GAPD кодируется у человека на 12 хромосоме, однако у нее существует

паралог – ген GAPDS на 19 хромосоме, который экспрессируется только в сперматозоидах [46–48]. GAPDS на 68% идентична соматической GAPD, состоит из 408 аминокислотных остатков и содержит на N-конце дополнительную последовательность из 72 аминокислот, благодаря которой белок связывается с цитоскелетом жгутика сперматозоида [49]. Молекулярная масса GAPDS, рассчитанная из аминокислотной последовательности, составляет примерно 44,5 кДа, однако есть данные, что благодаря обилию остатков пролина молекула обладает аномальной подвижностью при Ds-Na-электрофорезе в полиакриламидном геле и даёт полосу на уровне 56 кДа [47].

Ранее в нашей лаборатории было показано, что общими для соматической и сперматозоидной GAPD являются мотивы, обеспечивающие участие в гликолизе. В составе соматической GAPD выявлены два специфических мотива, связанных с ее ядерными функциями (репарация и репликация ДНК, а также мотив, определяющий внутриклеточную локализацию). Отсутствие этих мотивов в GAPDS позволяет предположить, что ядерные функции соматической GAPD для нее нехарактерны. Это согласуется с данными о том, что GAPDS связана своим N-концевым доменом с нерастворимыми компонентами клетки и в силу этого может терять ряд функций, характерных для GAPD. Возможно, GAPDS принимает участие в процессе сборки веретена деления в сперматидях. При этом для соматической GAPD участие в данном процессе (в других типах клеток), по-видимому, нехарактерно [50].

Экспрессия мРНК GAPDS в клеточных линиях меланомы

Известно, что различные спермоспецифичные белки (точнее белки семенников – «testis specific proteins») могут быть маркерами отдельных типов онкологических заболеваний. Экспериментальные исследования экспрессии мРНК GAPDS к началу нашей работы были немногочисленны, а сведения о синтезе этого белка в каких-либо раковых тканях или раковых клеточных линиях отсутствовали. Однако имелись указания о присутствии необычных форм глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы при некоторых видах злокачественных опухолей [51].



Отношение концентраций мРНК GAPDS и GAPD

Рис. 9.2. Уровни транскрипции мРНК GAPDS в различных линиях меланом и семенниках. Диаграмма построена по результатам экспериментов ArrayExpress E-TABM-185, E-GEOD-7127, E-GEOD-7307, E-GEOD-10843 (www.ebi.ac.uk/arrayexpress)

Нами был проведен анализ баз данных по экспрессии мРНК сперматоспецифического белка GAPDS в соматических клетках в норме, а также при различных онкологических заболеваниях. Мы проанализировали базу данных ArrayExpress (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) на предмет транскрипции мРНК GAPDS в здоровых тканях человека и в различных опухолевых линиях. Были также рассмотрены результаты экспериментов E-TABM-185, E-GEOD-2109, E-MTAB-37, E-GEOD-7127, E-GEOD-10843 и E-GEOD-7307 (название экспериментов в базе данных ArrayExpress), в общей сложности содержавшие информацию

об уровне транскрипции генов в 9765 образцах (количество контролей и опытных образцов). Проанализированные данные свидетельствуют о том, что в клетках здоровых соматических тканей и большинстве опухолей транскрипция мРНК GAPDS практически не происходит: содержание ее мРНК в среднем на два порядка ниже, чем в семенниках. Однако высокие уровни транскрипции (см. рис. 9.2) мРНК GAPDS наблюдались в некоторых меланомх (линии A15 и MM200).

Синтез белка GAPDS в клеточных линиях меланомы

Мы предположили, что фермент GAPDS может продуцироваться в тех видах опухолей, где уровень транскрипции ее мРНК достаточно велик.

Для проверки этого предположения было предложено протестировать различные клеточные линии меланомы на наличие белка GAPDS. Для этого нам были необходимы антитела против GAPDS, причем антитела как против нативной формы GAPDS (для выделения GAPDS из клеточных экстрактов методом иммунопреципитации), так и против денатурированных форм GAPDS (для детекции методом иммуноблоттинга).

Нами был разработан оригинальный метод получения поликлональных антител двух типов, специфически взаимодействующих с нативными или с денатурированными формами GAPDS [52].

Полученные антитела разных типов были использованы для проведения иммунопреципитации, для детекции GAPDS в клетках, а также для идентификации GAPDS после проведения электрофореза в денатурирующих условиях.

Ряд клеточных линий меланомы был протестирован на наличие белка GAPDS методом иммуноблоттинга с использованием полученных поликлональных антител против GAPDS. Материалом для исследования послужили клеточные линии меланомы человека (*mel Il*, *mel Kor*, *mel P*). Клеточные линии были ранее получены в НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина и НИИ онкологии им. проф. Н. Н. Петрова [53, 54]. В качестве положительного контроля использовали лизат человеческих сперматозоидов и рекомбинантный белок dN-GAPDS. В качестве отрицательного контроля использовали лизат клеток тератокарциномы и препарат соматической GAPD, полученный из мышц кролика.

В экстракте сперматозоидов окрашивалась полоса молекулярной массой 56 кДа (рис. 9.3, дорожка 1), что согласуется с литературными данными относительно подвижности полноразмерной GAPDS в полиакриламидном геле [47], и полосы 37 и 36 кДа, соответствующие продуктам протеолиза полноразмерного белка GAPDS. На дорожке 2 с нанесенным препаратом dN-GAPDS также детектировалась полоса 37 кДа. Во всех 3-х исследованных нами клеточных лизатах меланомных линий содержался белок, который взаимодействовал с антителами к GAPDS человека (дорожки 4–6). Окрашенный продукт имел молекулярную массу около 37 кДа (рис. 9.3).

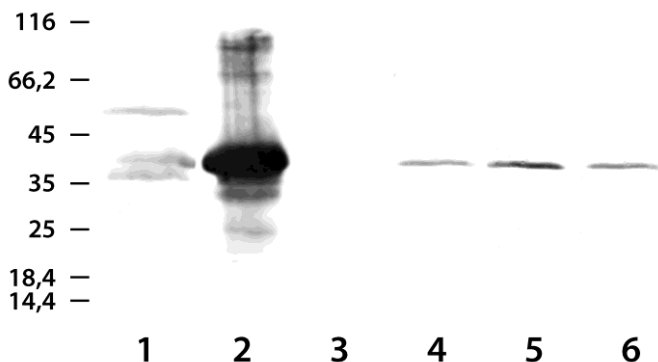


Рис. 9.3. Детекция GAPDS в разных клеточных линиях меланом методом иммуноблоттинга:

1 – лизат сперматозоидов человека; 2 – препарат dN-GAPDS; 3 – препарат соматической GAPD; 4–6 – лизаты клеточных линий меланом (*melIII*, *melP* и *melKor*, соответственно)

В результате проведенного исследования нам удалось показать, что лизаты меланомных клеток содержат белок, взаимодействующий с антителами к GAPDS. Молекулярная масса обнаруженного белка составляла около 37 кДа. Нам не удалось детектировать в лизатах меланомных клеточных линий полосу 56 кДа, соответствующую полноразмерной GAPDS. Это может быть обусловлено либо частичным протеолизом полноразмерной GAPDS при получении лизатов, либо протеолизом данного белка в меланомных клетках. Однако мРНК полноразмерного белка GAPDS не обнаруживалась

ни в одной из линий меланомных клеток. Таким образом, было показано, что в клетках некоторых линий меланомы продуцируется GAPDS без N-концевого домена. Согласно проведенному в нашей лаборатории анализу матричных РНК из базы данных GenBank, GAPDS без N-концевого фрагмента встречается в активно делящихся соматических клетках (эмбриональные клетки и клетки регенерирующих тканей) у некоторых позвоночных (*Anolis carolinensis*) [55]. В этих случаях отсутствие N-концевого домена GAPDS обусловлено альтернативным сплайсингом. Поскольку N-концевой фрагмент необходим GAPDS для связывания с цитоскелетом жгутика сперматозоида, его наличие не является обязательным для функционирования данного фермента в других клетках.

Присутствие GAPDS в клеточных линиях меланом было подтверждено экспериментами по иммунопреципитации [56]. Для иммунопреципитации мы использовали кроличьи поликлональные антитела против нативной GAPDS, иммобилизованные на протеин G-сефарозе и лизат клеток меланомы *mel Kor* и *mel P*. Мы показали, что в клеточных линиях меланом *mel Kor* и *mel P* содержится белок, который специфически взаимодействует с антителами против GAPDS. Молекулярная масса данного белка 37 кДа, что соответствует массе GAPDS без N-концевого фрагмента. Следует отметить, что содержание этого белка в линии *mel Kor* существенно меньше, чем в линии *mel P*. Наличие белка GAPDS в экстракте *mel P* было подтверждено методом MALDI-MS спектрометрии. Выделенный с помощью иммунопреципитации белок, содержит также соматическую форму GAPD, причем содержание двух изоформ глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (спермоспецифичной и соматической) в лизате меланомных клеточных линий, является близким. Полученные результаты указывают на то, что комплекс, изолированный методом иммунопреципитации из лизата клеточной меланомной линии *mel P*, содержит гетероолигомерные формы фермента, состоящие из мономеров GAPD и GAPDS. Возможно гетероолигомер GAPD содержит один димер соматического фермента GAPD и один димер спермоспецифичного фермента GAPDS. Ранее были описаны такие гибридные формы GAPDS: при экспрессии крысиной GAPDS в клетках *E.coli* наблюдали образование тетрамеров содержащих два типа субъединиц: рекомбинантной GAPDS крысы и собственной GAPD *E.coli* [57]. По-видимому, аналогичную ситуацию мы и наблюдаем в клетках меланомы.

Подтвердив наличие белка GAPDS в некоторых меланомных клеточных линиях, мы решили убедиться, что синтез этого белка является специфичным именно для меланомных клеток. Для этого мы провели оценку уровня транскрипции мРНК GAPDS в ряде немеланомных опухолевых клеточных линиях. Наличие белка GAPDS в лизатах этих клеток анализировали методом Ds-Na-электрофореза и иммуноблоттинга. Как видно из данных, представленных в табл. 9.1, во всех исследованных клеточных линиях транскрипция мРНК GAPDS практически не происходит, содержание ее мРНК в среднем на два порядка ниже, чем в семенниках. Белковых продуктов, взаимодействующих с антителами против GAPDS, также не было обнаружено.

Таблица 9.1.

Уровень мРНК GAPD и GAPDS, а также наличие белка GAPDS в некоторых тканях и клеточных линиях.

Данные по экспрессии мРНК взяты из базы данных ArrayExpress (эксперименты E-MTAB-37, E-MTAB-62 и E-GEOD-7127), за единицу принят уровень экспрессии GAPDS в клетках семенников

Линия клеток	Ткань или тип клеток	Белок GAPDS (иммуноблоттинг)	мРНК GAPDS	мРНК GAPD
	Семенники	+	1.0	7.21
	Фибробласты	—	0.04	14.87
HEK293T	Эмбриональные клетки почек	—	0.04	8.16
SKOV-3	Рак яичников	—	0.02	6.39
HL60	Промиелоцитарная лейкемия	—	0.04	9.72
LnCaP	Аденокарцинома простаты	—	0.03	9.21
Raji	Лимфома Беркитта	—	0.05	15.08
K562	Миелогенная лейкемия	—	0.03	11.29
PC3	Аденокарцинома простаты	—	0.05	12.11
Jurkat	T-лимфобластная лейкемия	—	0.04	14.04
HT-1080	Фибросаркома	—	0.04	8.48
A549	Аденокарцинома легких	—	0.04	13.41
MCF7	Аденокарцинома груди	—	0.03	14.96
RKO	Аденокарцинома прямой кишки	—	0.04	11.30
melIII	Меланома	+		
melP	Меланома	+	0.01–4*	7–14*
melKor	Меланома	+		

*дан разброс значений для 63 линий меланомы (GEOD-7127 по данным ArrayExpress).

Внутриклеточная локализация GAPDS в клеточных линиях меланомы

Таким образом, мы показали, что продукция белка GAPDS характерна для меланомных клеток. Как уже упоминалось выше, методом масс-спектрометрического анализа мы подтвердили, что белок, который был нами обнаружен в лизатах меланомных клеточных линий, специфически взаимодействующий с антителами против GAPDS, является спермоспецифичной формой глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы без N-концевой аминокислотной последовательности. Поскольку N-концевой фрагмент необходим GAPDS для прикрепления к цитоскелету жгутика сперматозоида, очевидно, что в случае продукции фермента без N-концевого фрагмента белок GAPDS должен находиться в цитозольной фракции, так же как и цитоплазматическая изоформа GAPD. Чтобы подтвердить наше предположение, мы провели иммунохимическое окрашивание клеток меланомных линий *mel P* и *mel Kor* с использованием кроличьих поликлональных антител против нативной GAPDS. В качестве отрицательного контроля мы использовали клетки фибробластов, в которых, как нами было показано (табл. 9.1), белок GAPDS не синтезируется. Результаты иммунохимического окрашивания представлены на рис. 9.4.

Как видно из рис. 9.4, GAPDS локализована в цитоплазме клеток меланомы. Фибробласты, которые были использованы в качестве отрицательного контроля, не окрасились (рис. 9.4, В). Для обоих типов клеток не наблюдалось окрашивания после обработки только вторичными антителами против IgG кролика (рис. 9.4, С и D). Аналогичные результаты были получены при иммунохимическом окрашивании клеток меланомы *melKor*, однако окрашивание GAPDS было менее интенсивным.

Локализация GAPDS в цитоплазме может способствовать формированию гетеролигомеров глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, состоящих из сперматозоидного и соматического ферментов.

Формирование таких гибридных белковых молекул, с одной стороны, может приводить к исчезновению некоторых свойственных соматическому ферменту негликолитических функций, а именно, способности участвовать в апоптозе, с другой стороны, за счет присутствия сперматозоидного фермента, данный гибридный

фермент начинает проявлять повышенную устойчивость к различным неблагоприятным воздействиям. В целом, такие, вновь приобретенные свойства гетероолигомера, могут вносить свой вклад в метаболизм опухолевых клеток, приводя к повышению выживаемости клеток, и, тем самым, к прогрессии опухоли. Изучение корреляции между прогрессией клеточных линий меланомы и продукцией в них GAPDS. Меланома представляет собой довольно агрессивное злокачественное новообразование. Составляя всего 3–5% всех кожных новообразований, она является причиной смерти 80% пациентов с онкологическими заболеваниями кожи [58]. Высоко агрессивный характер развития меланомы прежде всего связан с высокой метастатической активностью клеток этого новообразования.

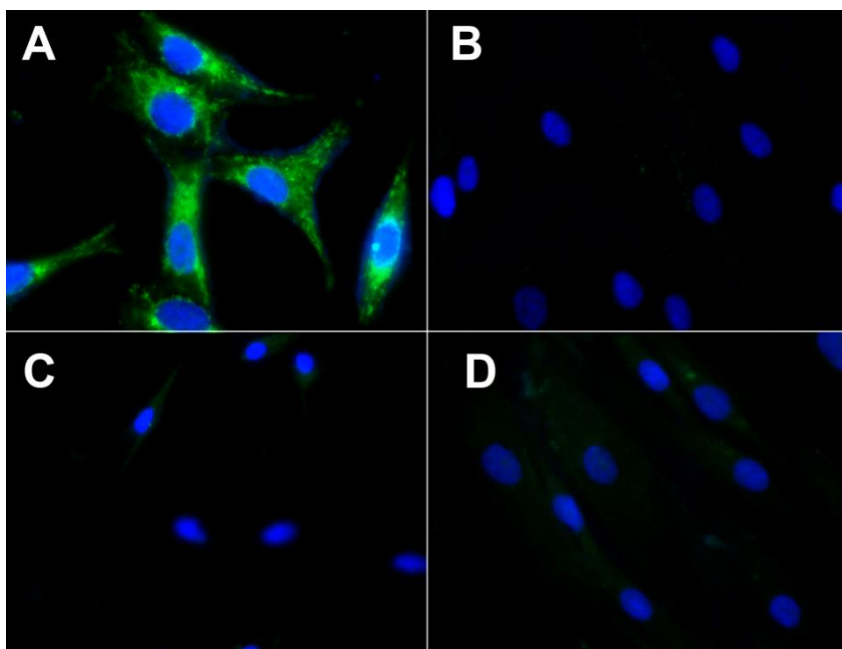


Рис. 9.4. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток меланомы *mel P* (A, C). Фибробласты (B, D) были использованы в качестве отрицательного контроля. Образцы инкубировали с кроличьими поликлональными антителами против нативной GAPDS, а затем с вторичными антителами против IgG кролика, сопряженными с Alexa Fluor® 488 (A, B), или только с вторичными антителами (C, D). Ядра окрашивали DAPI (A–D) [56].

Известно, что злокачественная трансформация меланоцитов сопровождается сменой типа молекул клеточной адгезии (Е-кадгерин на N-кадгерин) [59, 60] и подавлением экспрессии генов, регулирующих клеточную дифференцировку, например, MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) [61]. При прогрессии меланомы повышается экспрессия ряда генов, включая S100A4/MTS1 [62].

Мы предположили, что, возможно, наличие и уровень транскрипта гена GAPDS в меланомных линиях может являться наряду с транскриптами генов Е-кадгерина, N-кадгерина, MITF и S100A4/MTS1 маркером стадии опухолевой прогрессии.

Для того, чтобы проверить, есть ли корреляция между уровнем транскрипции мРНК GAPDS и уровнем синтеза этого белка в меланомных клеточных линиях со степенью прогрессии меланомы, нами были получены лизаты меланомных линий. Были проведены эксперименты по определению уровня транскрипции мРНК GAPDS в этих линиях методом полимеразной цепной реакции, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). На рис. 9.5 приведены данные ПЦР-анализа различных клеточных линий меланомы. Анализ экспрессии генов GAPD и актина использовали в качестве положительного контроля.

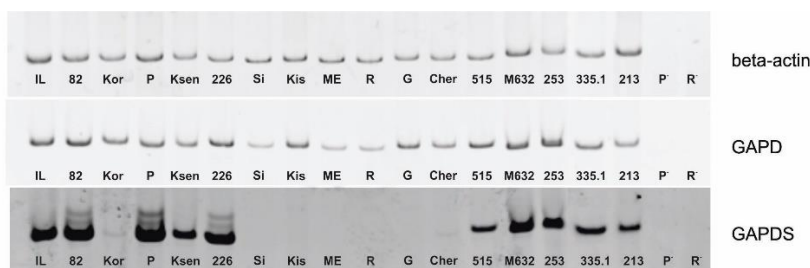


Рис. 9.5. Анализ экспрессии гена GAPDS в разных линиях меланомы

По степени дифференцировки некоторые проанализированные линии опухолевых клеток могут быть разделены на три типа:

- высокодифференцированные: *mel Si*, *mel Me*;
- умеренно дифференцированные: *mel Il*, *mel P*, *mel R*, *mel Ksen*;
- низкодифференцированные: *mel Cher*, *mel Kor*.

Как видно из рис. 9.6, транскрипты GAPDS были обнаружены примерно в половине исследованных линий меланом, которые, как правило, относятся к умеренно дифференцированным. Единственным исключением является линия *MelR*, в которой транскрипты GAPDS не были найдены. В высоко и в низко дифференцированных клетках транскрипты GAPDS отсутствуют. Однако следует отметить, что в клетках линии *mel Kor* транскрипты GAPDS были выявлены только в следовых количествах. При проведении стандартного иммуноблоттинга наличие значительного количества белкового продукта GAPDS удалось обнаружить лишь в клетках линий *mel P*, *mel 82*, *mel 226* и *mel 335.1* (рис. 9.6). В качестве маркера для сперматозоидной изоформы белка использовали рекомбинантный белок без N-концевого домена (dN-GAPDS) с молекулярной массой 37 кДа, для соматической GAPD – фермент из мышц кролика (36 кДа). В клетках линии *mel Kor* и *mel II* белковый продукт GAPDS представлен в следовых количествах. Приведенные на рис. 9.6 данные свидетельствуют также о том, что в тех линиях клеток, в которых белковый продукт GAPDS выявляется стандартным иммуноблоттингом, содержатся достаточно высокие его концентрации и, следовательно, оказываемое им влияние на жизнедеятельность клеток может быть существенно более выраженным, чем в случае ранее исследованных нами клеточных линий *mel Kor* и *mel II*.

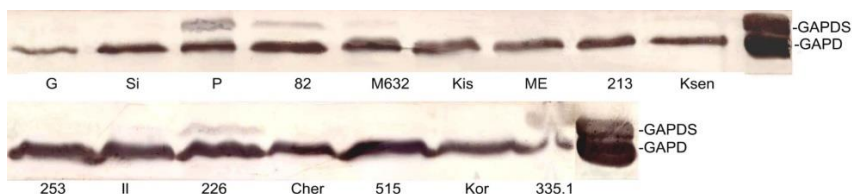


Рис. 9.6. Анализ клеточных линий меланомы на присутствие белка GAPDS методом иммуноблоттинга.

Как видно из рис. 9.6, самый высокий уровень транскрипции гена GAPDS наблюдался в клетках *mel II*, *mel P*, *mel 82*, *mel 226*, средний уровень – в клетках *mel Ksen*, в то время как в клетках *mel Si*, *mel Kis*, *mel R* и *mel G* транскриптов GAPDS не обнаружено. Самый высокий уровень продукции белка GAPDS обнаружен в клетках линий *mel P* и *mel 226* и средний уровень в клетках *mel 82*. В клетках линий *mel Si*, *mel Kis*, *mel Me*, *mel G*, *mel Ksen*, *mel Cher* белок GAPDS не обнаруживается (рис. 9.6).

На основании полученных данных можно заметить, что все случаи обнаружения GAPDS относятся к линиям, соответствующим умеренно дифференцированным клеткам. Полученные данные согласуются с результатами исследования, которое выявило ген GAPDS среди генов, регулируемых фактором транскрипции MITF в клетках меланомы [63]. Согласно данным Lekmine et al, экспрессия MITF способствует клеточной дифференцировке и формированию менее агрессивного фенотипа [61].

Для поздних стадий развития меланомы характерно уменьшение экспрессии гена, кодирующего белок MITF, и, следовательно, снижение продукции GAPDS. Однако согласно другим данным, MITF является показателем агрессивности опухоли: амплификация MITF в клетках меланомы сопровождается высокой степенью метастазирования опухоли и низкой выживаемостью пациентов [64]. Таким образом, полученные результаты вместе с данными литературы дают нам основание предполагать, что продукция GAPDS в линиях меланомы является результатом повышения экспрессии фактора транскрипции MITF, однако данные о связи уровня экспрессии MITF с агрессивностью опухоли противоречивы и требуют дополнительного анализа.

Эффективность гликолиза в клеточных линиях меланомы

Необходимо напомнить, что белок GAPDS без N-концевой последовательности, обнаруженный в некоторых линиях меланомы, встречается также в активно делящихся соматических клетках некоторых позвоночных (эмбриональные клетки и клетки регенерирующих тканей у ящериц *Anolis carolinensis*) [55].

То есть, GAPDS встречается в интенсивно делящихся клетках, и эти клетки не обязательно злокачественные.

Возможно, продукция этого белка дает делящимся клеткам какие-то преимущества в получении энергии путем гликолиза.

Как было показано раньше, рекомбинантный белок dN-GAPDS (GAPDS без N-концевого домена) сохраняет ферментативную активность и к тому же проявляет повышенную стабильность [65].

Таким образом, продукция этого белка в клетках может влиять на метаболизм. Поэтому было предложено сравнить интенсивность гликолиза в клетках меланомы, продуцирующих GAPDS, и в тех клетках, где этого белка нет.

Для сравнения были выбраны линии меланомы *mel P* и *mel 226*,

клетки которых продуцируют GAPDS, и линии *mel Kis* и *mel Si*, клетки которых не продуцируют GAPDS. Интенсивность гликолиза в клетках оценивали по скорости накопления лактата в клеточных экстрактах, нормированных по концентрации общего белка. Клетки меланом линий *mel P*, *mel Kis*, *mel Si* и *mel 226* разрушали ультразвуком.

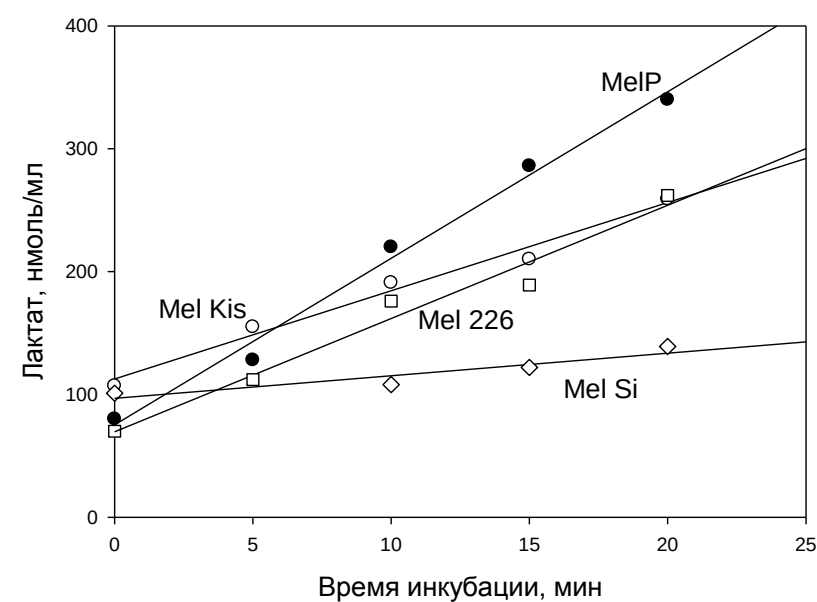


Рис. 9.7. Скорость накопления лактата в клеточных экстрактах меланом *melP*, *mel226*, *melKis* и *melSi*

Таблица. 9.2.

Скорость накопления лактата в разных линиях меланомы

Образец	Накопление лактата в 1 мл экстракта (нмоль / мин)	Наличие GAPDS в клетках	Наличие мРНК GAPDS в клетках
<i>melP</i>	13,5	+	+
<i>melKis</i>	7,18	—	—
<i>melSi</i>	1,84	—	—
<i>mel226</i>	9,22	+	+

В пробы с клеточными экстрактами, нормированными по концентрации белка, добавляли кофакторы и субстрат гликолиза, а затем определяли концентрации лактата. Результаты исследования представлены на рис. 9.7 и в табл. 9.2.

Из данных, представленных на рис. 9.7 и в табл. 9.2, видно, что нет однозначной зависимости между продукцией GAPDS и скоростью гликолиза, хотя самая низкая скорость гликолиза наблюдалась в клетках *mel Si*, в которых не было обнаружено GAPDS, а самая высокая – в клетках *mel P*, в которых наблюдается максимальная продукция GAPDS.

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования нам удалось показать, что экстракты некоторых меланомных клеток содержат белок, взаимодействующий с антителами к GAPDS. Молекулярная масса обнаруженного белка составляла около 37 кДа. Поскольку мРНК полноразмерного белка GAPDS не обнаруживалась ни в одной из исследованных линий меланомы, был сделан вывод, что в клетках меланомы экспрессируется ген GAPDS без N-концевого домена. Продукция GAPDS в линиях меланом была подтверждена экспериментами по иммунопреципитации с последующим анализом методами SDS-электрофореза и MALDI. Иммунохимическое окрашивание клеток линий *MelP* и *MelKor* с использованием кроличьих поликлональных антител против нативной GAPDS показало, что GAPDS находится в цитоплазме клеток. Были проанализированы меланомные линии, соответствующие разным стадиям дифференцировки опухоли. Все случаи обнаружения мРНК GAPDS или белка GAPDS относятся к умеренно дифференцированным линиям. В случае высокодифференцированных клеточных линий (*mel Si* и *mel Me*) не обнаружено ни мРНК, ни белка GAPDS. Определение скорости гликолиза в экстрактах разных линий меланомы показало, что клетки, продуцирующие GAPDS, отличаются более высокой скоростью гликолиза по сравнению с клетками, в которых продукция GAPDS не обнаружена.

Известно, что среднегодовой темп прироста заболеваемости меланомой кожи является одним из самых высоких среди всех злокачественных опухолей [66, 67]. Эффективность существующих методов лечения меланомы напрямую зависит от стадии диагностики за-

болевания. К сожалению, несмотря на возможность визуальной локализации, меланома детектируется на начальных (I–II) стадиях лишь у 62–65% пациентов, в то время как в остальных случаях пациенты имеют запущенную форму заболевания [68]. В результате выживаемость больных меланомой достаточно низка. Очевидно, что обнаруженное нами появление белка GAPDS по крайней мере в некоторых клеточных линиях меланомы позволяет надеяться на использование этого белка в качестве нового, причем достаточно специфического онкомаркера. Следует отметить, что GAPDS не появляется в других типах злокачественных клеток, а его продукция характерна только для определенной стадии прогрессии меланомы. Безусловно, для разработки диагностического метода, основанного как на выявлении белка GAPDS, так и антител на него в крови пациентов, требуется проведение большого объема исследований в клинических условиях. Недавно наши результаты были подтверждены группой Йохана Ханссона (Каролинский институт, Стокгольм, Швеция), показавшей, что экспрессия GAPDS ассоциирована с плохим прогнозом на III стадии прогрессии меланомы [69].

Участие GAPD и GAPDS в регуляции метаболизма и индукции апоптоза в нормальных и злокачественных клетках создает предпосылки для создания противоопухолевых препаратов. Разработка способов противоопухолевой терапии требует детального понимания молекулярных и биохимических процессов, лежащих в основе прогрессии меланом. Активное протекание гликолиза, скорость которого не замедляется в присутствии кислорода, как основного пути для генерации энергии в опухолевых и раковых клетках, известно как эффект Варбурга. Переход на бескислородный способ энергетики, согласно Варбургу, приводит к автономному бесконтрольному существованию клетки: она начинает вести себя как самостоятельный организм, стремящийся к воспроизведению [31, 32]. Возможно, в реализации такого отклонения от регуляции энергетического обмена соматических клеток могут принимать участие и отдельные изоформы некоторых гликолитических ферментов, в частности GAPDS. Продукция GAPDS в раковых клетках может также приводить к изменению индукции апоптоза, в которую вовлечена соматическая форма фермента. GAPDS не может участвовать в сложных внутриклеточных перемещениях, характерных для GAPD, из-за отсутствия специальных мотивов в структуре белка и большей ста-

бильности. Кроме того, GAPDS предотвращает участие соматической формы фермента в индукции апоптоза, взаимодействуя с ее субъединицами и образуя прочные гетерологические тетрамеры. Если предположить, что GAPDS действительно вовлечена в указанные выше особенности энергетического метаболизма и апоптоза злокачественных клеток (по крайней мере, меланомных), то специфические лиганды, взаимодействующие только с этой формой фермента, могут быть рассмотрены в качестве противоопухолевых препаратов.

Работа была поддержана грантами РФФИ №11-08-00663-а и №13-04-00823-а.

Список литературы

1. Glaser P. E., Gross R. W. Rapid plasmenylethanolamine-selective fusion of membrane bilayers catalyzed by an isoform of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: discrimination between glycolytic and fusogenic roles of individual isoforms // *Biochemistry*. 1995. Vol. 34(38). P. 12193–12203.
2. Robbins A. R., Ward R. D., Oliver C. A mutation in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase alters endocytosis in CHO cells // *The Journal of cell biology*. 1995. Vol. 130(5). P. 1093–1104.
3. Raje C. I., Kumar S., Harle A., Nanda J. S., Raje M. The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a novel transferrin receptor // *The Journal of biological chemistry*. 2007. Vol. 282(5). P. 3252–3261.
4. Hessler R. J., Blackwood R. A., Brock T. G., Francis J. W., Harsh D. M., Smolen J. E. Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a Ca^{2+} -dependent fusogen in human neutrophil cytosol // *Journal of leukocyte biology*. 1998. Vol. 63(3). P. 331–336.
5. Muronetz V. I., Wang Z. X., Keith T. J., Knull H. R., Srivastava D. K. Binding constants and stoichiometries of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-tubulin complexes // *Archives of biochemistry and biophysics*. 1994. Vol. 313(2). P. 253–260.
6. Volker K. W., Reinitz C. A., Knull H. R. Glycolytic enzymes and assembly of microtubule networks // *Comparative biochemistry and physiology. Part B. Biochemistry & molecular biology*. 1995. Vol. 112(3). P. 503–514.
7. Cueille N., Blanc C. T., Riederer I. M., Riederer B. M. Microtubule-associated protein 1B binds glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase // Journal of proteome research. 2007. Vol. 6(7). P. 2640–2647.

8. Bryksin A. V. Laktionov P. P. Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in vesicular transport from golgi apparatus to endoplasmic reticulum // Biochemistry. Biokhimiia. 2008. Vol. 73(6). P. 619–625.

9. Tisdale E. J., Azizi F., Artalejo C. R. Rab2 utilizes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and protein kinase C{iota} to associate with microtubules and to recruit dynein // The Journal of biological chemistry. 2009. Vol. 284(9). P. 5876–5884.

10. Engel M., Seifert M., Theisinger B., Seyfert U., Welter C. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and Nm23-H1/nucleoside diphosphate kinase A. Two old enzymes combine for the novel Nm23 protein phosphotransferase function // The Journal of biological chemistry. 1998. Vol. 273(32). P. 20058–20065.

11. Duclos-Vallée J. C., Capel F., Mabit H., Petit M. A. Phosphorylation of the hepatitis B virus core protein by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein kinase activity // The Journal of general virology. 1998. Vol. 79(Pt 7). P. 1665–1670.

12. Dai R. P., Yu F. X., Goh S. R., Chng H. W., Tan Y. L., Fu J. L., Zheng L., Luo Y. Histone 2B (H2B) expression is confined to a proper NAD⁺/NADH redox status // The Journal of biological chemistry. 2008. Vol. 283(40). P. 26894–26901.

13. Li Y., Huang T., Zhang X., Wan T., Hu J., Huang A., Tang H. Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase binding to hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in regulating expression of HBV surface antigen // Archives of virology. 2009. Vol. 154(3). P. 519–524.

14. Kondo S., Kubota S., Mukudai Y., Nishida T., Yoshihama Y., Shirota T., Shintani S., Takigawa M. Binding of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to the cis-acting element of structure-anchored repression in ccn2 mRNA // Biochemical and biophysical research communications. 2011. Vol. 405(3). P. 382–387.

15. Sundararaj K. P., Wood R.E., Ponnusamy S., Salas A.M., Szulc Z., Bielawska A., Obeid L.M., Hannun Y.A., Ogretmen B. Rapid shortening of telomere length in response to ceramide involves the inhibition of telomere binding activity of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // The Journal of biological chemistry. 2004. Vol. 279(7). P. 6152–6162.

16. Demarse N. A., Ponnusamy S., Spicer E. K., Apohan E., Baatz J. E., Ogretmen B., Davies C. Direct binding of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase to telomeric DNA protects telomeres against chemotherapy-induced rapid degradation // *Journal of molecular biology*. 2009. Vol. 394(4). P. 789–803.

17. Nakagawa T., Hirano Y., Inomata A., Yokota S., Miyachi K., Kaneda M., Umeda M., Furukawa K., Omata S., Horigome T. Participation of a fusogenic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in nuclear membrane assembly // *The Journal of biological chemistry*. 2003. Vol. 278(22). P. 20395–20404.

18. Singh R., Green M. R. Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // *Science (New York, N.Y.)*. 1993. Vol. 259(5093). P. 365–368.

19. Meyer-Siegler K., Mauro D. J., Seal G., Wurzer J., deRiel J. K., Sirover M. A. A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991. Vol. 88(19). P. 8460–8464.

20. Azam S., Juvet N., Jilani A., Vongsamphanh R., Yang X., Yang S., Ramotar D. Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase plays a direct role in reactivating oxidized forms of the DNA repair enzyme APE1 // *The Journal of biological chemistry*. 2008. Vol. 283(45). P. 30632–30641.

21. Arutyunova E. I., Danshina P. V., Domnina L. V., Pleten A. P., Muronetz V. I. Oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances its binding to nucleic acids // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003. Vol. 307(3). P. 547–552.

22. Hara M. R., Cascio M. B., Sawa A. GAPDH as a sensor of NO stress // *Biochimica et biophysica acta*. 2006. Vol. 1762(5). P. 502–509.

23. Hara M. R., Snyder S. H. Nitric oxide-GAPDH-Siah: a novel cell death cascade // *Cellular and molecular neurobiology*. 2006. Vol. 26(4-6). P. 527–538.

24. Sen N., Hara M. R., Kornberg M. D., Cascio M. B., Bae B. I., Shahani N., Thomas B., Dawson T. M., Dawson V. L., Snyder S. H., Sawa A. Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis // *Nature cell biology*. 2008. Vol. 10(7). P. 866–873.

25. Hwang N. R., Yim S. H., Kim Y. M., Jeong J., Song E. J., Lee Y., Lee J. H., Choi S., Lee K. J. Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular

functions // The Biochemical journal. 2009. Vol.423(2). P. 253–264.

26.Mazzola J. L., Sirover M. A. Reduction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's disease and in Huntington's disease fibroblasts // Journal of neurochemistry. 2001. Vol. 76(2). P. 442–449.

27.Naletova I., Schmalhausen E., Kharitonov A., Katrukha A., Saso L., Caprioli A., Muronetz V. Non-native glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase can be an intrinsic component of amyloid structures // Biochimica et biophysica acta. 2008. Vol. 1784(12). P. 2052–2058.

28.Butterfield D. A., Hardas S. S., Lange M. L. B. Oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Alzheimer's disease: many pathways to neurodegeneration // Journal of Alzheimer's disease: JAD. 2010. Vol. 20(2). P. 369–393.

29.Mazzola J. L., Sirover M. A. Alteration of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase structure in Huntington's disease fibroblasts // Brain research. Molecular brain research. 2002. Vol. 100(1–2). P. 95–101.

30.Bae B. I., Hara M. R., Cascio M. B., Wellington C. L., Hayden M. R., Ross C. A., Ha H. C., Li X. J., Snyder S. H., Sawa A. Mutant huntingtin: nuclear translocation and cytotoxicity mediated by GAPDH // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006. Vol. 103(9). P. 3405–3409.

31.Warburg O., Posener K., Negelein E. Ueber den stoffwechsel der tumoren // Biochem Zeitschrift. 1924. Vol. 152. P. 319–344.

32.Warburg O. On the origin of cancer cells // Science (New York, N.Y.). 1956. Vol. 123(3191). P. 309–314.

33.Schmalhausen E. V., Muronetz V. I. An uncoupling of the processes of oxidation and phosphorylation in glycolysis // Bioscience reports. 1997. Vol. 17(6). P. 521–527.

34.Schmalhausen E. V., Nagradova N. K., Boschi-Muller S., Branlant G., Muronetz V. I. Mildly oxidized GAPDH: the coupling of the dehydrogenase and acyl phosphatase activities // FEBS letters. 1999. Vol. 452(3). P. 219–222.

35.Weber J. P., Bernhard S. A. Transfer of 1,3-diphosphoglycerate between glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase via an enzyme-substrate-enzyme complex // Biochemistry. 1982. Vol. 21(17). P. 4189–4194.

36.Sukhodolets M. V., Muronetz V. I., Tsuprun V. L.,

Kaftanova A. S., Nagradova N. K. Association of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase // The biochemical and electron-microscopic evidence. FEBS letters. 1988. Vol. 238(1). P. 161–166.

37. Tompa P., Batke J. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase preferentially associates to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a mixture of cytosolic proteins as revealed by fluorescence energy transfer measurements // Biochemistry international. 1990. Vol. 20(3). P. 487–494.

38. Fokina K. V., Dainyak M. B., Nagradova N. K., Muronetz V. I. A study on the complexes between human erythrocyte enzymes participating in the conversions of 1,3-diphosphoglycerate // Archives of biochemistry and biophysics. 1997. Vol. 345(2). P. 185–192.

39. Clarke F. M., Masters C. J. On the association of glycolytic enzymes with structural proteins of skeletal muscle // Biochimica et biophysica acta. 1975. Vol. 381(1). P. 37–46.

40. Ryazanov A. G., Ashmarina L. I., Muronetz V. I. Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with mono- and polyribosomes of rabbit reticulocytes // European journal of biochemistry / FEBS. 1988. Vol. 171(1–2). P. 301–305.

41. Walsh J. L., Keith T. J., Knull H. R. Glycolytic enzyme interactions with tubulin and microtubules // Biochimica et biophysica acta. 1989. Vol. 999(1). P. 64–70.

42. Sirover M. A. Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology // Journal of Cellular Biochemistry. 1997. Vol. 66. P. 133–140.

43. Tatton W. G., Chalmers-Redman R. M., Elstner M., Leesch W., Jagodzinski F. B., Stupak D. P., Sugrue M. M., Tatton N. A. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in neurodegeneration and apoptosis signaling // Journal of neural transmission. Supplementum. 2000. Vol. (60). P. 77–100.

44. Lee S. Y., Kim J. H., Jung H., Chi S. W., Chung S. J., Lee C. K., Park B. C., Bae K. H., Park S. G. Glyceraldehyde-3-phosphate, a glycolytic intermediate, prevents cells from apoptosis by lowering S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // Journal of microbiology and biotechnology. 2012. Vol. 22(4). P. 571–573.

45. Арутюнова Е. И., Домнина Л. В., Чудинова А. А., Макшакова О. Н., Арутюнов Д. Ю., Муронец В. И. Локализация ненативных форм D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в

клетках HeLa в ходе нормального роста и апоптоза // Биохимия. 2013. Т. 78, вып. 1. С. 118–123.

46. Welch J. E., Schatte E. C., O'Brien D. A., Eddy E. M. Expression of a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene specific to mouse spermatogenic cells // *Biology of reproduction*. 1992. Vol. 46(5). P. 869–878.

47. Welch J. E., Brown P. L., O'Brien D. A., Magyar P. L., Bunch D. O., Mori C., Eddy E. M. Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-2 gene is expressed specifically in spermatogenic cells // *Journal of andrology*. 2000. Vol. 21(2). P. 328–338.

48. Li Y., Nowotny P., Holmans P., Smemo S., Kauwe J. S., Hinrichs A. L., Tacey K., Doil L., van Luchene R., Garcia V., Rowland C., Schrodi S., Leong D., Gogic G., Chan J., Cravchik A., Ross D., Lau K., Kwok S., Chang S. Y., Catanese J., Sninsky J., White T. J., Hardy J., Powell J., Lovestone S., Morris J. C., Thal L., Owen M., Williams J., Goate A., Grupe A. Association of late-onset Alzheimer's disease with genetic variation in multiple members of the GAPD gene family // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004. Vol. 101(44). P. 15688–15693.

49. Bunch D. O., Welch J. E., Magyar P. L., Eddy E. M., O'Brien D. A. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S protein distribution during mouse spermatogenesis // *Biology of reproduction*. 1998. Vol. 58(3). P. 834–841.

50. Куравский М. Л., Муронец В. И. Соматическая и сперматозоидная глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа: сравнительный анализ первичных структур и функциональных особенностей // *Биохимия*. 2007. Т. 72, вып. 7. С. 915–922.

51. Patra S., Ghosh S., Bera S., Roy A., Ray S., Ray M. Molecular characterization of tumor associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // *Biochemistry. Biokhimiĭa*. 2009. Vol. 74(7). P. 717–727.

52. Kuravsky M. L., Kuravskya M. L., Schmalhausen E. V., Pozdnyakova N. V., Muronetz V. I. Isolation of antibodies against different protein conformations using immunoaffinity chromatography // *Analytical biochemistry*. 2012. Vol. 426(1). P. 47–53.

53. Михайлова И. Н., Лукашина М. И., Барышников А. Ю., Морозова Л. Ф., Бурова О. С., Панкина Т. Н., Козлов А. М., Голубева В. А., Черемушкин Е. А., Дорошенко М. Б., Демидов Л. В., Киселев С. Л., Ларин С. С., Георгиев Г. П. Клеточные линии

меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин // Вестник Российской академии медицинских наук. 2005. № 7. С. 37-40.

54. Mikhaylova I. N., Kovalevsky D. A., Morozova L. F., Golubeva V. A., Cheremushkin E. A., Lukashina M. I., Voronina E. S., Burova O. S., Utyashev I. A., Kiselev S. L., Demidov L. V., Beabealashvili R. Sh., Baryshnikov A. Y. Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines // *Melanoma research*. 2008. Vol. 18(5). P. 303–313.

55. Kuravsky M. L., Aleshin V. V., Frishman D., Muronetz V. I. Testis-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: origin and evolution // *BMC evolutionary biology*. 2011. Vol. 11. P. 160.

56. Sevostyanova I. A., Kulikova K. V., Kuravsky M. L., Schmalhausen E. V., Muronetz V. I. Sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is expressed in melanoma cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012. Vol. 427. P. 649–653.

57. Frayne J., Taylor A., Cameron G., Hadfield A. T. Structure of insoluble rat sperm glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) via heterotetramer formation with *Escherichia coli* GAPDH reveals target for contraceptive design // *The Journal of biological chemistry*. 2009. Vol. 284(34). P. 22703–22712.

58. Tsao H., Atkins M. B., Sober A. J. Management of cutaneous melanoma // *The New England journal of medicine*. 2004. Vol. 351(10). P. 998–1012.

59. Hsu M., Andl T., Li G., Meinkoth J. L., Herlyn M. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression // *Journal of cell science*. 2000. Vol. 113(Pt 9). P. 1535–1542.

60. Li G., Satyamoorthy K., Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells // *Cancer research*. 2001. Vol. 61(9). P. 3819–3825.

61. Lekmine F., Chang C. K., Sethakorn N., Das Gupta T.K., Salti G. I. Role of microphthalmia transcription factor (Mitf) in melanoma differentiation // *Biochemical and biophysical research communications*. 2007. Vol. 354(3). P. 830–835.

62. Maeldandsmo G. M., Hovig E., Skrede M., Engebraaten O., Flørenes V. A., Myklebost O., Grigorian M., Lukanidin E., Scanlon K. J., Fodstad O. Reversal of the in vivo metastatic phenotype of human tumor cells by an anti-CAPL (mts1) ribozyme // *Cancer research*. 1996.

Vol. 56(23). P. 5490–5498.

63. Hoek K. S., Schlegel N. C., Eichhoff O. M., Widmer D. S., Praetorius C., Einarsson S. O., Valgeirsdottir S., Bergsteinsdottir K., Schepsky A., Dummer R., Steingrímsson E. Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy // *Pigment cell & melanoma research*. 2008. Vol. 21(6). P. 665–676.

64. Garraway L. A., Widlund H. R., Rubin M. A., Getz G., Berger A. J., Ramaswamy S., Beroukhi R., Milner D. A., Granter S. R., Du J., Lee C., Wagner S. N., Li C., Golub T. R., Rimm D. L., Meyerson M. L., Fisher D. E., Sellers W. R. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma // *Nature*. 2005. Vol. 436(7047). P. 117–122.

65. Elkina Y. L., Kuravsky M. L., El'darov M. A., Stogov S. V., Muronetz V. I., Schmalhausen E. V. Recombinant human sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structural basis for enhanced stability // *Biochimica et biophysica acta*. 2010. Vol. 1804(12). P. 2207–2212.

66. Лемехов В. Г. Эпидемиология, факторы риска, скрининг меланомы кожи // *Практическая онкология*. 2001. Т. 2, вып. 4. С. 3–11.

67. Ferlay J., Shin H. R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 // *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 2010. Vol. 127(12). P. 2893–2917.

68. Двойрин В. В., Трапезников Н. Н., Михайловский А. В. Статистика меланомы кожи в России. // *Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН*. 1997. Т. 8, вып. 4. С. 3–12.

69. Falkenius J., Lundeberg J., Johansson H., Tuominen R., Frostvik-Stolt M., Hansson J., Egyhazi Brage S. High expression of glycolytic and pigment proteins is associated with worse clinical outcome in stage III melanoma // *Melanoma Research*. 2013. Vol. 23(6). P. 452–460.

Глава 10.

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СОВРЕМЕННЫХ ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ*

Яркие достижения современной иммунотерапии опухолей с использованием модуляторов иммунного синапса в очередной раз демонстрирует, что иммунная система – важнейший элемент стратегии противоопухолевого лечения. Исторически противоопухолевые лекарства в доклинических исследованиях изучались на сингенных мышинных моделях, которые не имеют иммунной системы человека или у иммунодефицитных мышей, которые позволяют приживлять ксенотрансплантаты опухолей человека. Ксенотрансплантаты человека широко используются для непосредственного тестирования цитотоксических препаратов. Химиотерапия и более современные противоопухолевые препараты, которые нацелены на мутированные или сверхэкспрессированные опухолевые белки, являются подходящими веществами для тестирования на ксенотрансплантатах человека. Легкость, с которой можно провести генетическую манипуляцию с клетками *ex vivo* до ксенотрансплантации делает человеческие ксенотрансплантаты великолепной доклинической моделью для скрининга цитотоксических препаратов. Однако необходимость работать с, по меньшей мере, частично иммунодефицитными мышами ограничивает исследование с помощью блокаторов контрольных точек.

Недостатками же сингенных мышинных моделей в дополнение к отсутствию человеческих мишеней является быстрый рост опухолей мыши, что препятствует развитию хронической воспалительной среды, характерной для опухолей человека. В канцерогенезе у человека иммунологические ингибирующие пути, связанные с воспалением, такие как ось PD-1 / PD-L1, вносят существенный вклад в ремоделирование микросреды опухоли. Кроме того, опухоли мыши

* Авторы: Давыдов М. М., Самойленко И. В.

обычно не отражают генетическую сложность опухолей человека и имеют более низкую мутационную нагрузку [1].

Модели животных с функционирующей иммунной системой человека необходимы, чтобы более точно повторить сложность микроокружения опухоли человека. Такие модели являются неотъемлемой частью лучшего прогнозирования реакции опухоли как на иммуномодулирующие средства, так и непосредственно на противоопухолевую терапию. В этой связи разработка гуманизированных моделей является многообещающей новой стратегией, которая предлагает возможность тестирования способности блокаторов контрольных точек и их комбинации с другими противоопухолевыми препаратами [1].

Генетически конструируемые мышинные модели (GEMM)

Современные технологии позволяют создавать мышей с необходимыми свойствами с большой точностью. Можно направить экспрессию интересующего гена во всей ткани (например, через клеточно-специфическую трансгенную экспрессию) или весь организм (например, целенаправленные мутации зародышевой линии). Кроме того, имеется возможность контролировать время, продолжительность и тканевое отделение экспрессии генов или их инактивацию [1].

Несколько исследовательских групп могут точно модифицировать онкогены и гены супрессоры опухолей непосредственно в соматических клетках взрослых мышей, что значительно улучшает свойства этой модели [2, 3]. Такие модели также лучше имитируют рак человека по сравнению с стандартными GEMM, поскольку опухоли обычно возникают из-за меньшего количества клеток в контексте нормальной стромы. Одним из важных недостатков этих моделей является низкая мутационная нагрузка, поскольку опухоли развиваются из 1–2 мутированных онкогенных трансгенов, хотя в них могут быть сконструированы суррогатные опухолевые антигены [4]. Трансгенная экспрессия обычно приводит к сверхфизиологическим уровням, так что экспрессия белка часто превышает частоту встречаемости у пациентов [5]. Кроме того, случайная интеграция трансгена может приводить к неожиданным фенотипам и повышенной изменчивости в представлении и количестве опухоли. Кроме того, GEMM занимает много времени и имеет высокую стоимость.

Примечательно, что появление технологии CRISPR / Cas9 [6], а вместе с ней и способность выполнять комплексное редактирование генов с относительной легкостью и скоростью, ожидается, что они улучшат большинство этих недостатков и значительно повысят ценность GEMM.

В целом, GEMM предоставляет единственную возможность оценить доставку блокаторов контрольных точек, терапевтический ответ и экспрессию биомаркера в присутствии компетентной иммунной системы.

Вставка человеческих генов мышам (Human knock in mice, KI)

Одним из преимуществ моделей GEMM является возможность введения более чем одного трансгена или гена KI для молекул контрольных точек человека в мышиную систему. Таким образом, модели KI позволяют исследователям изучать лекарства, которые распознают исключительно человеческую версию молекулы контрольной точки. Когда молекула контрольной точки человека не реагирует перекрестно с ее соответствующим мышинным аналогом, тогда и рецептор должен быть геном KI. В связи с этим, KI-мыши дают возможность изучения блокаторов контрольных точек, ориентированных на клиническое применение у людей в контексте полностью функциональной иммунной системы. Возможно, самым важным преимуществом этой модели является возможность оценивать аутоиммунные или провоспалительные побочные эффекты, связанные с потенциальными терапевтическими человеческими антителами. Одним из наглядных примеров этого является человеческий ген CTLA-4 гена KI, разработанный Lute KD et al [7]. В этой модели после лечения мышей CTLA-4 KI с mAb против hCTLA-4 у мышей развились аутоиммунные эффекты, наблюдаемые у пациентов, получавших mAb против CTLA-4.

Гуманизированные мыши. Новые модели животных для изучения блокаторов контрольных точек

Традиционные исследования *in vivo* в области противоопухолевой терапии были сфокусированы на опухолевых мишенях и определенных характеристиках организма-носителя опухоли. Изучение блокаторов контрольных точек иммунитета требует совершенно другой задачи – изучить взаимодействие организма-хозяина с опу-

холью, в частности, отношения «опухоль – иммунная система». Конечно, мышинные модели могут использоваться для изучения противоопухолевого иммунитета, потому что иммунная система мыши остается неповрежденной. Однако присущие различия между иммунной системой человека и мыши и отсутствие человеческих мишеней в мыши ограничивают исследования противоопухолевых эффектов иммунотерапии.

Поэтому были предприняты усилия по «гуманизации» иммунной системы мыши.

На протяжении многих лет самым большим ограничением для гуманизации иммунной системы мышей было отсутствие мышинных моделей, которые позволяют приживлять неопухолевые ткани. В 1983 году Босма и др. сообщили о спонтанной аутосомно-рецессивной мутации в гене протеинкиназы, активируемого ДНК каталитического полипептида (prkdc), которая серьезно ухудшает лимфопозз, имитируя клинический фенотип тяжелого общего иммунодефицита человека (SCID), что в последствии привело к появлению названия мыши SCID [8]. Отсутствие как Т, так и В клеток у prkdc-мутированных мышей позволило успешно трансплантировать им человеческие гемопоэтические стволовые клетки (HSCs) [8], мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) [9] и ткани плода [10]. В 1980 году Makino et al описал не страдающих ожирением диабетических мышей (NOD), которые характеризуются нарушением врожденного иммунитета. Скрещивание SCID и NOD линий приводило к появлению мышей с дефектами как врожденного, так и адаптивного иммунитета [11]. Мышь NOD / SCID служила моделью выбора для приживления функциональных человеческих клеток в течение последних двух десятилетий. Позднее были разработаны другие линии с использованием генной инженерии, чтобы индуцировать мутации у рекомбинационно-активирующего гена 1 (Rag1) и локуса Rag2, которые препятствуют развитию зрелых Т- и В-клеток [12, 13]. Вероятно, самым значительным улучшением иммунодефицитных мышей в эпоху генетического инженера было развитие гомозиготных мышей для целенаправленной мутации в гене γ -цепи рецептора интерлейкина-2 (IL-2 γ). Отсутствие IL-2 γ полностью предотвращает развитие НК-клеток; НК-клетки являются первичной врожденной клеточной популяцией, опосредующей приживание и отторжение тканей. Комбинируя ген IL-2 γ null с мышами, несущими Rag 1 или 2null (Rag 1 или 2null IL-2 γ null, названные BRG-

мышами) [14] или мутацией *prkdc* (NOD / SCID IL-2 γ null, названные NSG-мышами) [15], приводит к еще более глубоким иммунологическим дефектам, улучшающим приживление опухолевых и неопухолевых тканей.

PBMC, HSC или экспланты опухолей человека могут быть привиты иммунодефицитным мышам последнего поколения для создания гуманизированных моделей животных, где может быть изучена взаимосвязь между опухолью человека и иммунными клетками человека.

Одним из простых и экономичных методов для создания гуманизированных мышей является прививание человеческих PBMC тяжело иммунодефицитным мышам. Прививание человеческих PBMC позволяет изучать человеческие опухолевые ксенотрансплантаты из клеточных линий или эксплантаты опухолей в условиях аутологичного или гетерологичного иммунологического окружения [16–19]. Использование PBMC позволяет избежать необходимости использования сложных методов выделения клеток и приводит к стабильному переносу популяций активированных Т-клеток.

Ранние работы с такими моделями (так называемые иммунные аватары) продемонстрировали осуществимость и применимость этого подхода. Иммунные аватары использовались для скрининга и идентификации анти-человеческих клонов CTLA-4 mAbs с способностью активировать человеческие PBMC у ксенотрансплантативных мышей SCID [20]. Кроме того, Fisher et al. тестировали противоопухолевую эффективность PF-05082566 (полностью человеческого антитела против 4-1BB IgG2) у мышей NSG, несущих ксенотрансплантат клеточной линии рака предстательной железы человека (PC3), которым выполняли переносили трансплантацию PBMC человека внутривентриально [17]. PF-05082566 испытывает не обладает кросс-реактивности с 4-1BB грызунов, что делает невозможным тестирование в сингенных мышинных моделях. В модели иммунного аватара было показано замедление опухолевого роста у мышей, получавших анти-4-1BB mAb [17]. M.F. Sanmamed и др. также показали контроль на опухолевых моделях иммунных аватаров с использованием мышей BRG: рост ксенотрансплантата рака толстой кишки у человека был значительно медленнее, чем у мышей, которым выполнили трансплантацию человеческих PBMC и обработали урелюмабом (полностью человеческий анти-4-1BB mAb) или ниволумабом (полностью человеческий анти-PD-1 IgG4 mAb). Более

того, те же результаты были получены с использованием эксплантата рака желудка человека и аутологичных PBMC [18].

Основным недостатком модели иммунного аватара является реакция «ксено-трансплантат против хозяина (xGvHD)», которая развивается через несколько недель после приживления hPBMC. Предполагается, что xGvHD обусловлен МНС-рассогласованием между Т-клетками человека и клетками мыши [21, 22]. Чтобы избежать этой ксенореакции, некоторые группы предложили использовать нокаутных мышей, лишенных генов, кодирующих молекулы МНС класса I или II. В качестве альтернативы возможно удаление пула CD4-положительных клеток из PBMC до приживления, что также резко снижает частоту xGvHD, а мыши остаются бессимптомными после трех месяцев наблюдения [18]. Этот вывод свидетельствует о том, что xGvHD в моделях иммунных аватаров является зависимым от человеческих CD4+ Т-клеток. Кроме того, в этих моделях культуры Т-клеток, полученных из опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, могут быть использованы для усиления противоопухолевой реактивности и потенциально смягчения ксенореактивности.

Более сложным методом для ксенотрансплантации человеческих иммунных клеток у иммунодефицитной мыши является трансплантация CD34+ кроветворных стволовых клеток и клеток-предшественников (HSPCs). Гемато-лимфоидные гуманизированные мыши представляют собой одну из самых привлекательных моделей животных для изучения блокаторов контрольных точек и других методов лечения, нацеленных на иммунные клетки. Потенциал повторения человеческих опухоле-иммунных взаимодействий в полной, развитой человеком системе отличает их от других моделей [1].

Еще одним направлением являются ксенотрансплантация опухоли, полученной от пациента (*patient-derived xenotransplants, PDX*). Модели PDX представляют собой наилучшие доступные модели для точного воспроизведения архитектуры и сложности человеческого опухолевого микроокружения. Однако эти модели не могут повторить динамику инфильтрации иммунной популяции, поскольку человеческие опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL) не выдерживают пассажей между различными организмами мыши. Одним из вариантов традиционной модели PDX является иммуно-PDX (iPDX), которая отличается прежде всего тем, что эксперименты проводят на первом пассаже до замены опухолевой стромы человека

на мышиную строму. В этой модели человеческие ТП все еще активный элемент опухолевого микроокружения и могут быть мишенями для mAb, которые системно вводятся мышам [1].

Гуманизированные модели животных – единственная модель, которая позволяет нам изучать *in vivo* взаимодействия между иммунной системой человека и опухолями. Однако уникальные особенности взаимодействия между человеческой опухолью и иммунной системой человека могут ограничивать значимость и трансляционную ценность этих моделей. В этом контексте инновационные уникальные системы *ex vivo* предоставляют еще одну привлекательную альтернативу. Прежде всего в этом классе моделей представляют собой 3D-органоиды и 3D-культуры эксплантатов опухолей человека. Эти системы предлагают "более чистые" экспериментальные условия, свободные от мышиных клеток, и обладают сопоставимой архитектурой и сложностью для человеческого опухолевого микроокружения. Органоиды представляют собой трехмерные организованные кластеры эпителиальных и мезенхимальных клеток, растущих в культуре из эмбриональной или плюрипотентной стволовой клетки. Эти системы сочетают точную многоуровневую дифференциацию и физиологию *in vivo*-систем с легкой манипуляцией *in vitro* с трансформированными клеточными линиями [23]. С другой стороны, человеческие экспланты могут быть получены непосредственно при хирургических вмешательствах или биопсии у больных злокачественными опухолями и выращены *in vitro* в течение короткого периода времени. В краткосрочных условиях кусочки опухолевой ткани могут поддерживать многие свойства *in vivo*, включая трехмерный рост, поддержание организации тканей и ее структуры и взаимодействия опухолевых иммунных клеток [24].

В сочетании с точными и чувствительными методами анализа эти системы могли бы облегчить наше понимание механизма действия и биологии блокаторов контрольных точек иммунитета. Новые технологические платформы, которые обеспечивают анализ единичных клеток, такие как drop-seq или CyTOF [25], могут быть полезными инструментами для изучения эффектов воздействия на контрольные точки иммунитета, а также множество сигнальных молекул на опухолевых, эндотелиальных или других стромальных клетках.

Список литературы

1. Sanmamed M. F., Chester C., Melero I., Kohrt H. Defining the optimal murine models to investigate immune checkpoint blockers and their combination with other immunotherapies // *Annals of Oncology*. 2016. Vol. 27(7). P. 1190–1198.
2. Dow L. E., Fisher J., O'Rourke K. P., Muley A., Kastenhuber E. R., Livshits G., Tschaharganeh D. F., Socci N. D., Lowe S. W. Inducible in vivo genome editing with CRISPR-Cas9 // *Nature biotechnology*. 2015. Vol. 33(4). P. 390–394.
3. Chen S., Sanjana N. E., Zheng K., Shalem O., Lee K., Shi X., Scott D. A., Song J., Pan J. Q., Weissleder R., Lee H., Zhang F., Sharp P. A. Genome-wide CRISPR Screen in a Mouse Model of Tumor Growth and Metastasis // *Cell*. 2015. Vol. 160(6). P. 1246–1260.
4. DuPage M., Mazumdar C., Schmidt L. M., Cheung A. F., Jacks T. Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting // *Nature*. 2012. Vol. 482(7385). P. 405–409.
5. Lin J. H. Applications and limitations of genetically modified mouse models in drug discovery and development // *Curr. Drug Metab*. 2008. Vol. 9(5). P. 419–438.
6. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science*. 2012. Vol. 337(6096). P. 816–821.
7. Lute K. D., May K. F., Lu P., Zhang H., Kocak E., Mosinger B., Wolford C., Phillips G., Caligiuri M. A., Zheng P., Liu Y. Human CTLA4 knock-in mice unravel the quantitative link between tumor immunity and autoimmunity induced by anti-CTLA-4 antibodies // *Blood*. 2005. Vol. 106(9). P. 3127–3133.
8. Bosma G. C., Custer R. P., Bosma M. J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse // *Nature*. 1983. Vol. 301(5900). P. 527–530.
9. Lapidot T., Pflumio F., Doedens M., Murdoch B., Williams D. E., Dick J. E. Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice // *Science*. 1992. Vol. 255(5048). P. 137–141.
10. Mosier D. E., Gulizia R. J., Baird S. M., Wilson D. B. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency // *Nature*. 1988. Vol. 335(6187). P. 256–259.
11. McCune J. M., Namikawa R., Kaneshima H., Shultz L. D.,

Lieberman M., Weissman I. L. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function // Science. 1988. Vol. 241(4873). P. 1632–1639.

12.Shultz L. D., Schweitzer P. A., Christianson S. W., Gott B., Schweitzer I. B., Tennent B., McKenna S., Mobraaten L., Rajan T. V., Greiner D. L. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice // The Journal of immunology. 1995. Vol. 154(1). P. 180–191.

13.Shinkai Y., Rathbun G., Lam K. P., Oltz E. M., Stewart V., Mendelsohn M., Charron J., Datta M., Young F., Stall A. M. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement // Cell. 1992. Vol. 68(5). P. 855–867.

14.Mombaerts P., Iacomini J., Johnson R. S., Herrup K., Tonegawa S., Papaioannou V. E. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes // Cell. 1992. Vol. 68(5). P. 869–877.

15.Goldman J. P., Blundell M. P., Lopes L., Kinnon C., Di Santo J. P., Thrasher A. J. Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain // Br. J. Haematol. 1998. Vol. 103(2). P. 335–342.

16.Ito M., Hiramatsu H., Kobayashi K., Suzue K., Kawahata M., Hiroki K., Ueyama Y., Koyanagi Y., Sugamura K., Tsuji K., Heike T., Nakahata T. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells // Blood. 2002. Vol. 100(9). P. 3175–3182.

17.Fisher T. S., Kamperschroer C., Oliphant T., Love V. A., Lira P. D., Doyonnas R., Bergqvist S., Baxi S. M., Rohner A., Shen A. C., Huang C., Sokolowski S. A., Sharp L. L. Targeting of 4-1BB by monoclonal antibody PF-05082566 enhances T-cell function and promotes anti-tumor activity // Cancer Immunol. Immunother. 2012. Vol. 61(10). P. 1721–1733.

18.Sanmamed M. F., Rodriguez I., Schalper K. A., Oñate C., Azpilikueta A., Rodriguez-Ruiz M. E., Morales-Kastresana A., Labiano S., Pérez-Gracia J. L., Martín-Algarra S., Alfaro C., Mazzolini G., Sarno F., Hidalgo M., Korman A. J., Jure-Kunkel M., Melero I. Nivolumab and urelumab enhance antitumor activity of human T lymphocytes engrafted in Rag2^{-/-}IL2R null immunodeficient mice // Cancer Res. 2015. Vol. 75(17). P. 3466–3478.

19.McCormack E., Adams K. J., Hassan N. J., Kotian A., Lissin N. M., Sami M., Mujić M., Osdal T., Gjertsen B. T., Baker D.,

Powlesland A. S., Aleksic M., Vuidepot A., Morteau O., Sutton D. H., June C. H., Kalos M., Ashfield R., Jakobsen B. K. Bi-specific TCR-anti CD3 redirected T-cell targeting of NY-ESO-1- and LAGE-1-positive tumors // *Cancer Immunol. Immunother.* 2013. Vol. 62(4). P. 773–785.

20. May K. F. Jr, Roychowdhury S., Bhatt D., Kocak E., Bai X. F., Liu J. Q., Ferketich A. K., Martin E. W. Jr, Caligiuri M. A., Zheng P., Liu Y. Anti-human CTLA-4 monoclonal antibody promotes T-cell expansion and immunity in a hu-PBL-SCID model: a new method for pre-clinical screening of costimulatory monoclonal antibodies // *Blood*. 2015. Vol. 105(3). P. 1114–1121.

21. King M. A., Covassin L., Brehm M. A., Racki W., Pearson T., Leif J., Laning J., Fodor W., Foreman O., Burzenski L., Chase T. H., Gott B., Rossini A. A., Bortell R., Shultz L. D., Greiner D. L. Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex // *Clin. Exp. Immunol.* 2009. Vol. 157(1). P. 104–118.

22. Nervi B., Rettig M. P., Ritchey J. K., Wang H. L., Bauer G., Walker J., Bonyhadi M. L., Berenson R. J., Prior J. L., Piwnicka-Worms D., Nolta J. A., DiPersio J. F. Factors affecting human T cell engraftment, trafficking, and associated xenogeneic graft-vs-host disease in NOD/SCID beta2m^{null} mice // *Exp. Hematol.* 2007. Vol. 35(12). P. 1823–1838.

23. Lancaster M. A., Knoblich J. A. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies // *Science*. 2014. Vol. 345(6194).

24. Freeman A. E., Hoffman R. M. In vivo-like growth of human tumors in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1986. Vol. 83(8). P. 2694–2698.

25. Burel J. G., Apte S. H., Doolan D. L. Systems Approaches towards Molecular Profiling of Human Immunity // *Trends in immunology*. 2016. Vol. 37(1). P. 53–67.

Приложение 1.

КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Клеточная линия меланомы человека *mel P*

Родословная

Линия клеток получена из опухолевого образца метастаза меланомы кожи. Материал получен путем удаления у пациентки Т.А.А. двух подкожных метастатических узлов. До забора материала больной проведено хирургическое, химиотерапевтическое лечение.

Получение

Опухолевая ткань получена хирургическим путем при удалении метастазов кожи. Полученную суспензию клеток засеивали во флаконы и культивировали в течение длительного времени. Стабильно растущая клеточная линия была получена на 15 пассаже.

Морфологические признаки

Клеточная линия *mel P* характеризуется наличием полиморфных меланомных клеток преимущественно веретенообразной и вытянутой удлинённой формы с четкими границами базофильной цитоплазмы и гипер- и нормохромными ядрами с одиночными нуклеолами. Отмечаются почкование и фрагментация в отдельных крупных ядрах. Присутствуют гигантские многоядерные клетки с 3–5 ядрами и многочисленные фигуры клеточного деления.

Кариологическая характеристика

Проанализировано 45 метафаз. Число хромосом колеблется от 75 до 85. Модальное число хромосом соответствует гипотетраплоидному набору (4n-).

Нарушения кариотипа включают транслокацию части длинного плеча хромосомы 21 дистальнее 21q21 на короткое плечо хромосомы 4 в районе 4p12, делецию хромосомы 6 в районе 6q22, дополнительный хромосомный материал на коротком плече хромосомы 9 в районе 9p21 и на длинном плече хромосомы 20. Обнаружена дериватная хромосома 9, образованная транслокацией части длинного плеча хромосомы 1 (1q22-qter) на короткое плечо хромосомы 9 в районе 9p21. Все аномальные хромосомы в одной метафазе представлены двумя копиями.

Кариотип:

75~85<4n>,XXYY,der(4)t(4;21)(p12;q21)x2,del(6)(p22)x2,der(9)t(1;9)(q22;p21)x2,add(9)(p21)x2,add(20)(q13)x2,inc

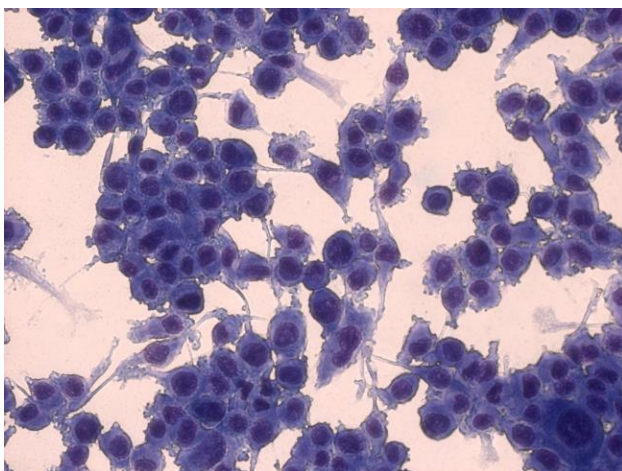
Экспрессия антигенов, мутации B-Raf+

Экспрессия меланомных (дифференцировочных) маркеров: CD63, HMB45, и HMW; раковотестикулярных генов класса MAGE; антиген гистосовместимости первого класса.

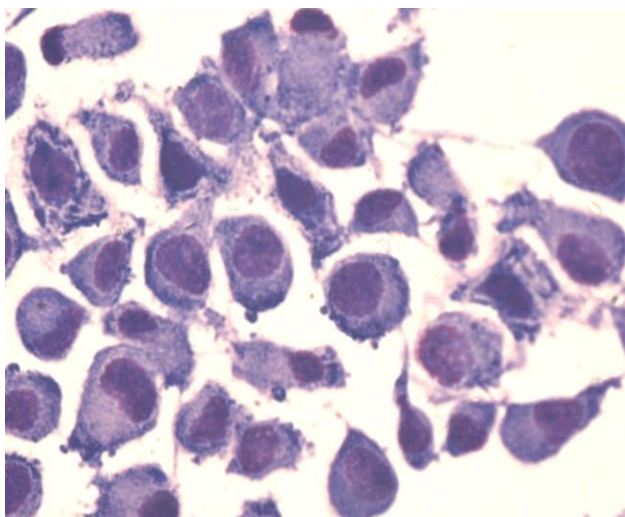
Клеточная линия меланомы человека *mel P* хранится в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур под номером РККК (П) 688Д.

Патент на изобретение № 2287575.

Фотографии клеточной линии меланомы человека *mel P*



Клеточная линия меланомы человека *mel P*,
увеличенная в 40 раз



Клеточная линия меланомы человека *mel P*,
увеличенная в 100 раз

Клеточная линия *mel P*

Дифференцировочные антигены		Раково-тестикулярные антигены		Антигены гистосовместимости		Мутации	
CD63	+	MAGE-3	+	HLA (I класс)	+	BRAF 15-й экзон (кодон 600 и 597)	NRAS 3-й экзон (кодон 61)
	HLA-DR (II класс)				-	V600E	Wt
				+			
				-			
				+			

Клеточная линия меланомы человека *mel Kor*

Родословная

Линия клеток получена из опухолевого образца пациентки К.Г.А. с диагнозом диссеминированная меланома кожи голени. До забора материала больной проведено хирургическое, химиоиммунотерапевтическое лечение.

Получение

Опухолевая ткань получена хирургическим путем при удалении метастазов кожи. Полученную суспензию клеток засевали во флаконы и культивировали в течение длительного времени. Стабильно растущая клеточная линия была получена на 15 пассаже.

Морфологические признаки

Клеточная линия характеризуется наличием множественных плотных центров роста опухолевых клеток; полиморфных меланомных клеток вытянутой, округлой и неправильной формы. В клетках обнаруживаются нормо- и гиперхромные ядра округлой и овальной формы, содержащие одиночные нуклеолы; базофильная неомогенная иногда вакуолизированная цитоплазма. Имеются гигантские многоядерные клетки, митозы.

Кариология

Проанализировано 26 метафаз. Число хромосом колеблется от 64 до 84. Модальное число хромосом соответствует триплоидному набору ($3n$).

Хорошо идентифицируемые хромосомы групп А, В, D – без признаков транслокаций. Перестройки хромосом других групп идентифицировать не удалось. Нестабильных хромосомных aberrаций не обнаружено.

Кариотип:

$64\sim 84 <3n>$

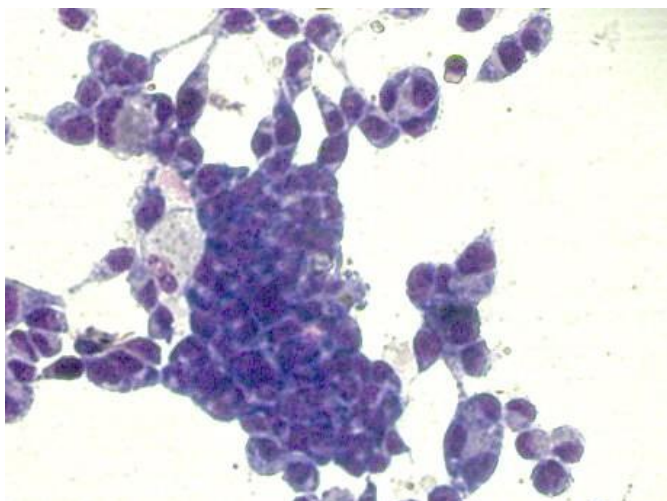
Экспрессия антигенов, мутации N-Ras +

Клеточная линия характеризуется экспрессией меланомных (дифференцировочных) маркеров: CD63, HMB45, и HMW, MelanA, Tyrosinase. Положительная экспрессия раковотестикулярных маркеров (на уровне мРНК) класса MAGE. Отсутствие антигенов гистосовместимости первого и второго класса редко встречающаяся особенность меланомных клеток.

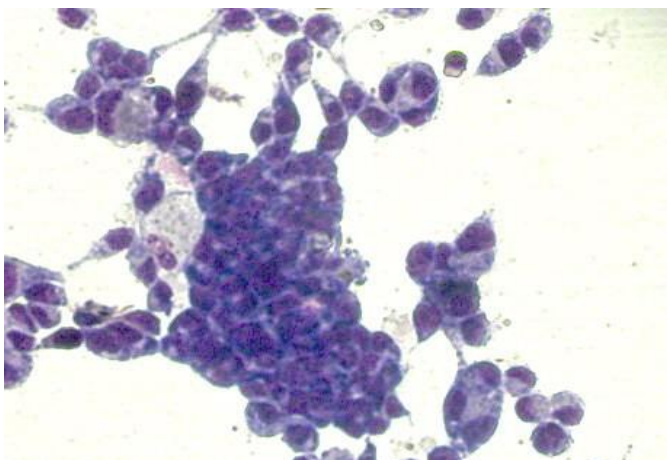
Клеточная линия меланомы человека *mel Kor* хранится в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур под номером РККК (П) 687Д.

Патент на изобретение № 2287578.

Фотографии клеточной линии меланомы человека *mel Kor*



Клеточная линия меланомы человека *mel Kor*,
увеличенная в 40 раз



Клеточная линия меланомы человека *mel Kor*,
увеличенная в 100 раз

Клеточная линия *mel Kor*

Дифференцировочные антигены		Раково-тестикулярные антигены		Антигены гистосовместимости		Мутации	
CD63	+	MAGE-3	+	HLA (I класс)	–	BRAF 15-й экзон	NRAS 3-й экзон
HMB45	+					Wt	Q61K
Melan A	+			HLA-DR (II класс)	–		

Клеточная линия меланомы человека *mel II*

Родословная

Линия клеток получена из опухолевого образца пациента И.А.И., с диагнозом диссеминированная меланома кожи передней брюшной стенки; образец представлен метастазом в мягкие ткани грудной клетки. До забора материала проведено хирургическое, химиотерапевтическое лечение.

Получение

Опухолевая ткань получена хирургическим путем. Суспензию клеток засевали во флаконы и культивировали. Стабильно растущая клеточная линия была получена на 15 пассаже.

Морфологические признаки

Полиморфные меланомные клетки округлой и веретенообразной формы и множественные мультицентрично образованные зоны роста округлых клеток с гиперхромными ядрами, содержащими 1–2 нуклеолы. Цитоплазма относительно обильная с окраской от базофильной до светло-голубой с заметным просветлением вокруг ядер. Немногочисленные 2-х и гигантские многоядерные, многочисленные митозы.

Кариологическая характеристика

Проанализировано 30 метафаз. Число хромосом колеблется от 56 до 61. Модальное число хромосом соответствует гипотриплоидному набору (3n-). Структурные нарушения кариотипа включают делецию хромосомы 1 в районе 1q21, дополнительный материал неизвестного происхождения на хромосоме 2, транслокацию длинных плеч хромосом 9 и 14, а также хромосом 15 и 22 (в обоих случаях наблюдается по 2 дериватные хромосомы в одной метафазной пластинке), дополнительный материал неизвестного происхождения на хромосоме 17, транслокацию длинного плеча хромосомы 7 (7q11-qter) на хромосому 20 в районе 20p12 (в трех экземплярах). Встречаются 1–2 маленькие маркерные хромосомы. Анеуплоидия по некоторым хромосомам, в том числе нулисомия по Y-хромосоме.

Кариотип:

56~61<3n>,XX,Y,+1,+del(1)(q21),+add(2)(q37.3),
der(9;14)(q10;q10)×2,+15,der(15;22)(q10;q10)×2,+add(17)(q25),
+20,der(20)t(7;20)(q11;p12)×3,+22,+1~2mar,inc

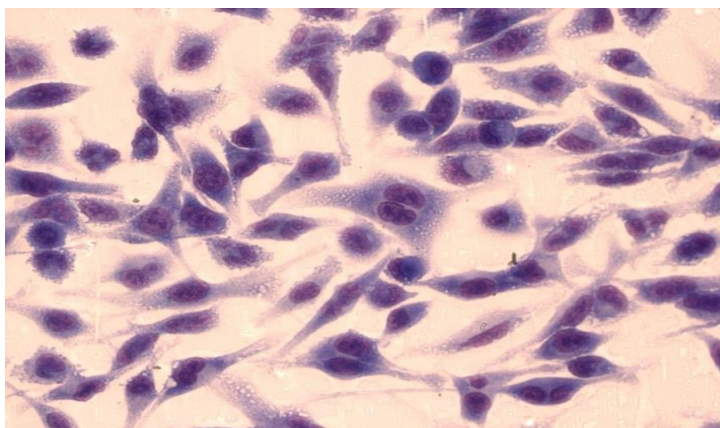
Экспрессия антигенов, мутации B-Raf +

Экспрессия меланомных маркеров: CD63, HMB45, HMW, MelanA, Tyrosinase; РТА маркера (на уровне мРНК) MAGE; антиген гистосовместимости первого класса.

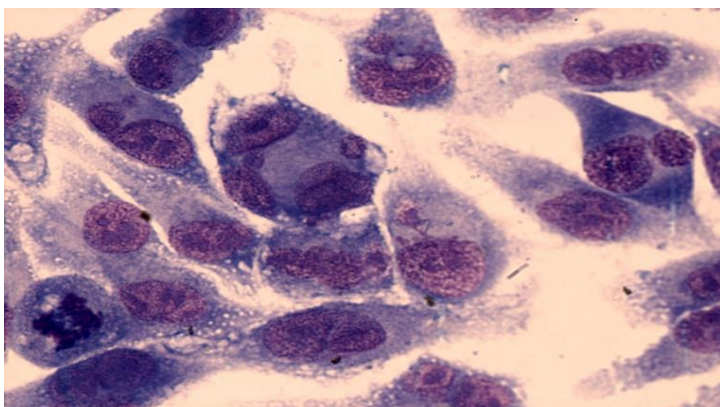
Клеточная линия меланомы человека *mel II* хранится в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур под номером РККК (П) 686Д.

Патент на изобретение №2287577.

Фотографии клеточной линии меланомы человека *mel II*



Клеточная линия меланомы человека *mel II*,
увеличенная в 40 раз



Клеточная линия меланомы человека *mel II*,
увеличенная в 100 раз

Клеточная линия *mel II*

Дифференцировочные антигены		Раково-тестикулярные антигены		Антигены гистосовместимости	Мутации	
CD63	+	MAGE-3	+	HLA (Iкласс)	BRAF 15-й экзон	NRAS 3-й экзон
HMB45	+				V600K	Wt
Melan A	+			HLA-DR (II класс)		

Клеточная линия меланомы человека *mel Ibr*

Родословная

Линия клеток получена из опухолевого образца пациентки И.А.У., с диагнозом диссеминированная меланома кожи. Материал получен путем удаления подкожного метастатического узла. До забора материала больной проведены хирургические, химиотерапевтические, иммунотерапевтические виды лечения.

Получение

Опухолевая ткань получена хирургическим путем при удалении метастазов кожи. Полученную суспензию клеток засевали во флаконы и культивировали в течение длительного времени. Стабильно растущая клеточная линия была получена на 15 пассаже.

Морфологические признаки

Клеточная линия характеризуется низкодифференцированными меланомными клетками в основном неправильно округлой формы с полиморфными, различной формы ядрами и обильной светло-голубой вакуолизированной, без четких контуров цитоплазмой. Наблюдаются крупные 2-х ядерные и гигантские многоядерные клетки, митозы.

Кариологическая характеристика

Проанализировано 15 метафаз. Число хромосом колеблется от 71 до 84. Модальное число хромосом соответствует гипертриплоидному набору ($3n+$). Культура характеризуется увеличенным количеством хромосом 7, их число в клетках колеблется от 4 до 7.

Кариотип не соответствует стандартному набору не только по числу хромосом, но и по их структуре. Во всех клетках обнаружен дополнительный хромосомный материал неизвестного происхождения на длинном плече X-хромосомы. Наблюдаются две различные делетированные хромосомы 1: в одном случае произошла делеция практически всего короткого плеча ($p21\text{pter}$), а в другом длинного – ($q12\text{-qter}$). Наблюдается изохромосома, образованная двумя длинными плечами хромосом 21.

Кариотип:

$71\sim84<3n>, XX, add(X)(q28), del(1)(p21), del(1)(q12), +7, +7, +7, i(21)(q10), inc$

Экспрессия антигенов, мутации B-Raf +

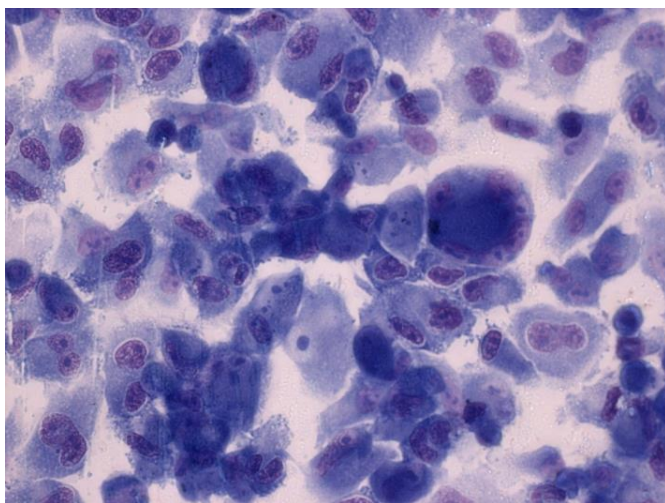
Экспрессия меланомных (дифференцировочных) маркеров: CD63 и HMW; раковотестикулярных маркеров (на уровне мРНК)

класса MAGE; антигены гистосовместимости первого и второго класса.

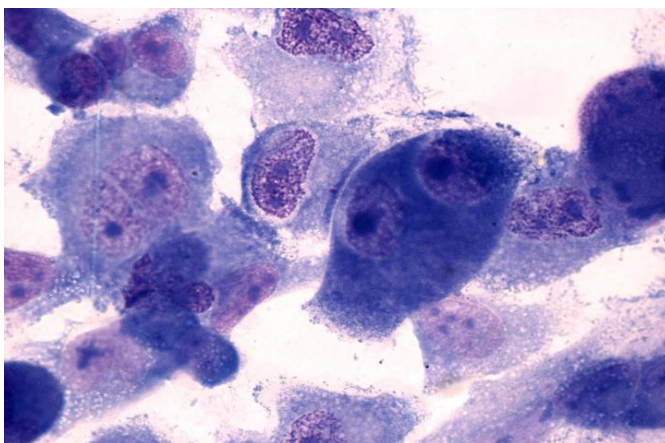
Клеточная линия меланомы человека *mel Ibr* хранится в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур под номером РККК (П) 689Д.

Патент на изобретение № 2287576.

Фотографии клеточной линии меланомы человека *mel Ibr*



Клеточная линия меланомы человека *mel Ibr*,
увеличенная в 40 раз



Клеточная линия меланомы человека *mel Ibr*,
увеличенная в 100 раз

Клеточная линия *mel 1br*

Дифференцировочные антигены		Раково-тестикулярные антигены		Антигены гистосовместимости		Мутации	
CD63	+	MAGE-3	+	HLA (I класс)	+	BRAF 15-й экзон	NRAS 3-й экзон
HMB45	–			HLA-DR (II класс)	+	V600E	Wt
Melan A	–						
Tyrosinase	–						
HMW	+						

Клеточная линия меланомы человека *mel Mtp*

Родословная

Линия клеток получена из опухолевого образца пациентки М.Т.Б., и/б 01/19253, находившейся на лечении в 2002 г. с диагнозом диссеминированная меланома кожи левого бедра. Предыдущее лечение: хирургическое, химио- и иммунотерапия.

Получение

Опухолевый материал получен путем удаления подкожного метастатического узла правой подмышечной области. Полученную суспензию клеток засевали во флаконы и культивировали в течение длительного времени. Стабильно растущая клеточная линия была получена на 15 пассаже.

Морфологические признаки

Клеточная линия *mel Mtp* характеризуется преимущественно клетками веретенообразной, вытянутой удлинённой и отросчатой округлой формы. Цитоплазма клеток окрашена в базофильные тона различной степени интенсивности, ядра овальные, вытянутой, округлой и неправильной формы с грубозернистым строением хроматина, содержат одно или несколько ядрышек. Имеются 2-х ядерные и гигантские многоядерные клетки, содержащие до 4-х ядер. Встречаются митозы.

Кариологическая характеристика

Проанализирована 41 метафаза. Число хромосом колеблется от 61 до 71, т. е. модальное число хромосом соответствует триплоидному набору ($3n$).

Кариотип не соответствует стандартному набору не только по числу хромосом, но и по их структуре. Во всех клетках обнаружен дополнительный хромосомный материал на коротких плечах двух хромосом 1 различной длины, на длинном плече хромосомы из группы В (4 или 5 хромосомы), а также на коротком плече 14 хромосомы. Происхождение дополнительного хромосомного материала можно установить только с помощью молекулярно-цитогенетических методов.

Кариотип:

61~71< $3n$ >,XXX,add(1)(p36),add(1)(p36),add(B)(q3435),
add(14)(p11),inc

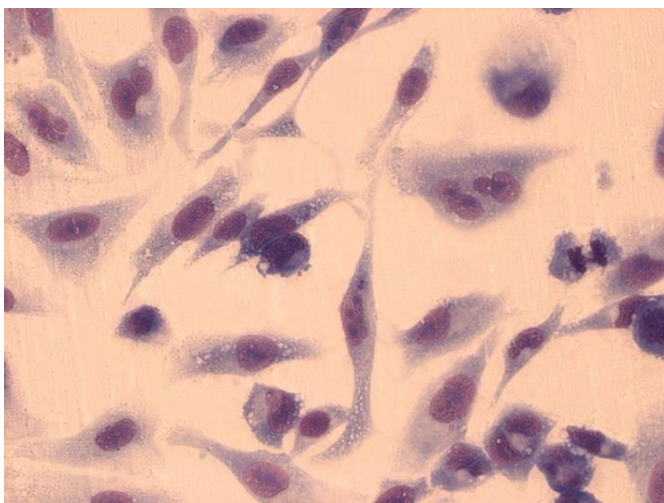
Экспрессия антигенов, мутации N-RAS+

Клеточная линия, характеризуется экспрессией меланомных (дифференцировочных) маркеров: CD63 и HMW. Положительная экспрессия раковотестикулярных генов класса MAGE. Особенностью данной линии является наличие антигенов гистосовместимости первого и второго класса.

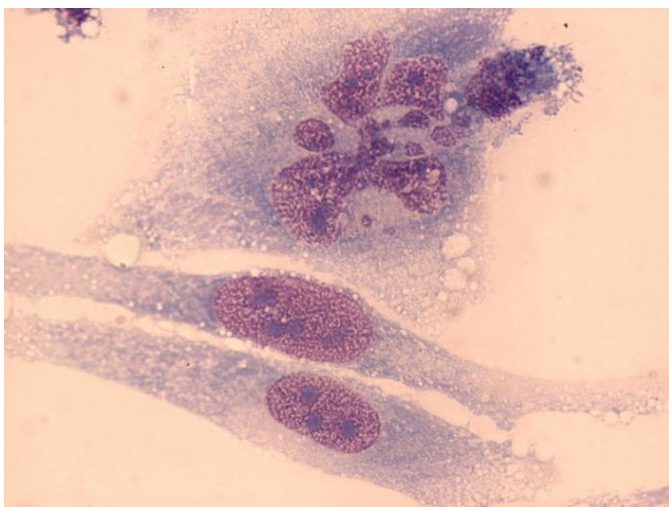
Клеточная линия меланомы человека *mel Mtp* хранится в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур под номером РККК(П) 705 Д.

Патент на изобретение № 2360963.

Фотографии клеточной линии меланомы человека *mel Mtp*



Клеточная линия меланомы человека *mel Mtp*,
увеличенная в 40 раз



Клеточная линия меланомы человека *mel Mtp*,
увеличенная в 100 раз

Клеточная линия *mel Mip*

Дифференцировочные антигены		Раково-тестикулярные антигены		Антигены гистосовместимости		Мутации	
CD63	+	MAGE-3	+	HLA (I класс)	+	BRAF 15-й экзон	NRAS 3-ий экзон
HMB45	—					HLA-DR (II класс)	+
Melan A	—						
Tyrosinase	—						
HMW	+						

Клеточная линия меланомы человека *mel Is*

Родословная

Линия клеток получена из опухолевого образца пациента И.Л.В., и/б 98/6440, с диагнозом меланома кожи левого бедра. Материал получен путем удаления подкожного метастат. узла правой подм. обл. Лечение пациента: хирургическое, химио и иммунотерапия.

Получение

Суспензию клеток засеивали во флаконы и культивировали. Стабильно растущая клеточная линия была получена на 15 пассаже.

Морфологические признаки

Цитограмма линии *mel Is* характеризуется смешанным клеточным составом; клетки округлой, веретенообразной, неправильной и вытянутой, удлинённой формы с тонкими отростками цитоплазмы. Цитоплазма клеток относительно обильная, неомогенная, окрашена в базофильные тона различной степени интенсивности, нередко с розоватым оттенком без четких контуров или с фестончатыми краями. Ядра расположены эксцентрично и центрально, округлой, овальной и неправильной формы с грубоглыбчатым строением хроматина, содержат гипертрофированные одно или несколько ядерышек. Присутствуют многочисленные 2-х и гигантские многоядерные клетки с центральным и периферическим расположением ядер с почкованием и их фрагментацией. Выявляются митозы.

Кариологическая характеристика

Проанализировано 33 метафазы. Число хромосом колеблется от 58 до 74. Модальное число хромосом соответствует триплоидному набору (3n). Наблюдается транслокация двух длинных плеч хромосомы 1 с образованием изохромосомы, транслокация двух длинных плеч хромосомы 7 с образованием изохромосомы, делеция хромосомы 11 (q22-qter), дополнительный хромосомный материал неизвестного происхождения на коротком плече хромосомы 12 в районе 12p12, транслокация сегмента хромосомы 2 дистальнее 2q12 на короткое плечо хромосомы 21 в районе 21p11.2, а также дериватная хромосома, состоящая из длинного плеча хромосомы 5 и хромосомного материала неизвестного происхождения.

Кариотип:

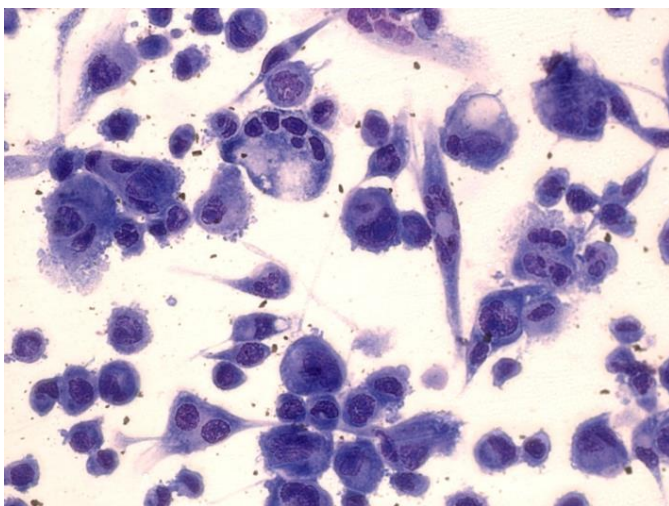
58~74<3n>,XXY,i(1)(q10),i(7)(q10),del(11)(q22),add(12)(p12),der(21)t(2;21)(q12;p11.2),der(?;5)(?;q10),inc

Экспрессия антигенов, мутации B-Raf +

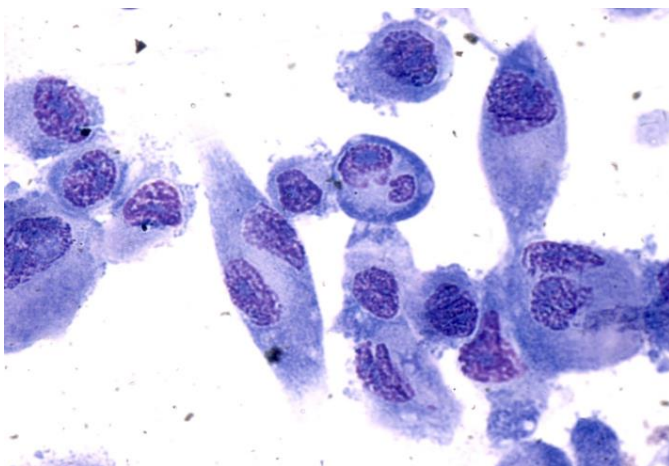
Экспрессия недифференцированных маркеров; РТА маркера (на уровне мРНК) класса MAGE; антигены гистосовместимости первого и второго класса.

Клеточная линия меланомы человека *mel Is* хранится в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур под номером РККК(П) 709Д.

Фотографии клеточной линии меланомы человека *mel Is*



Клеточная линия меланомы человека *mel Is*,
увеличенная в 40 раз



Клеточная линия меланомы человека *mel Is*,
увеличенная в 100 раз

Клеточная линия *mel Is*

Дифференцировочные антигены		Раково-тестикулярные антигены		Антигены гистосовместимости		Мутации	
CD63	+	MAGE-3	+	HLA (I класс)	+	BRAF 15-й экзон	NRAS 3-й экзон
HMB45	+					HLA-DR(II класс)	+
MelanA	+						
Tyrosinaza	+						

Клеточная линия меланомы человека *mel Si*

Родословная

Линия клеток получена из опухолевого образца пациентки С.И.А., и/б 03/8114, находившейся на лечении в 2003 г. с диагнозом диссеминированная меланома кожи спины. Материал получен путем удаления подкожного метастатического узла меланомы кожи спины.

Получение

Опухолевая ткань получена хирургическим путем при удалении метастазов меланомы кожи. Полученную суспензию клеток засевали во флаконы и культивировали в течение длительного времени. Стабильно растущая клеточная линия была получена на 15 пассаже.

Морфологические признаки

Цитограмма представлена высокодифференцированными эпителиоподобными клетками. Клеточная линия характеризуется округлыми клетками мелкого, среднего и крупного размеров с фестончатыми или четкими границами цитоплазмы. Цитоплазма клеток относительно обильная, негомогенная окрашена в базофильные тона различной степени интенсивности с просветлением вокруг ядер. Ядра полиморфные округлой, овальной и неправильной формы расположены эксцентрично или центрально с грубоглыбчатым гиперхромным хроматином и чаще с одиночными ядрышками. Присутствуют немногочисленные гигантские одноядерные и многоядерные клетки. Выявляются в небольшом числе митозы.

Кариологическая характеристика

Проанализировано 20 метафаз. Число хромосом колеблется от 46 до 49. Модальное число хромосом соответствует диплоидному набору (2n). Наблюдается трисомия по хромосоме 2, дупликация длинного плеча хромосомы 15. Во всех клетках наблюдаются маркерные хромосомы (1–3, чаще – 2 шт.).

Кариотип:

46~49<2n>,XX,+2,dup(15)(q21q26.2),+2mar,inc

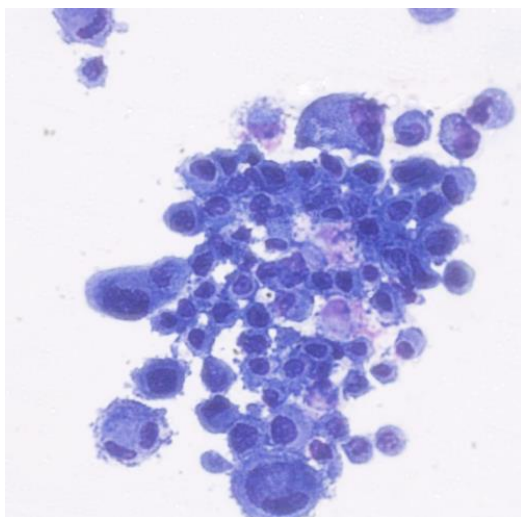
Экспрессия антигенов, мутация B-Raf +

Клеточная линия, характеризуется экспрессией меланомных (дифференцировочных) маркеров: CD63, HMB45, Tyrosinase; экспрессией раковотестикулярных генов класса MAGE-3; наличием антигенов гистосовместимости первого и второго класса.

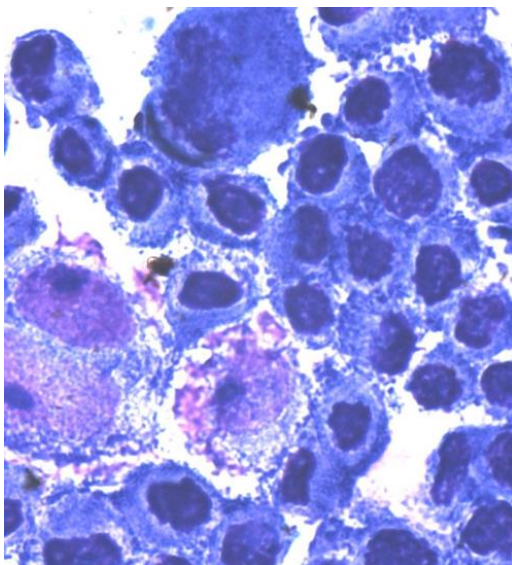
Клеточная линия меланомы человека *mel Si* хранится в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур под номером РККК(П) 708Д.

Патент на изобретение № №2363734.

Фотографии клеточной линии меланомы человека *mel Si*



Клеточная линия меланомы человека *mel Si*,
увеличенная в 40 раз



Клеточная линия меланомы человека *mel Si*,
увеличенная в 100 раз

Клеточная линия *mel Si*

Дифференцировочные антигены	Раково- тестикулярные антигены		Антигены гистосовместимости	Мутации	
CD63	+	MAGE-3 +	HLA (I класс)	BRAF 15-й экзон	NRAS 3-й экзон
HMB45	+				
Melan A	–		HLA-DR (II класс)	L597Q	Wt
Tyrosinase	+				

Клеточная линия меланомы человека *mel Gus*

Родословная

Линия клеток получена из опухолевого образца Г.М.К., и/б 98/14374, находившегося на лечении в 2004 г. с диагнозом диссеминированная меланома кожи правой пяточной области. Материал получен путем удаления метастатического узла из мягких тканей правого бедра. Лечение: хирургическое, х/т, иммунотерапия.

Получение

Суспензию клеток засеивали во флаконы и культивировали. Стабильно растущая линия получена на 15 пассаже.

Морфологические признаки

Клеточная линия *mel Gus* представлена однообразными по форме округлыми клетками среднего и крупного размеров с фестончатыми или четкими границами цитоплазмы. Цитоплазма клеток относительно обильная, негомогенная, окрашена в базофильные тона различной степени интенсивности. Ядра клеток полиморфные, округлой, овальной или неправильной формы с утолщенными неровными контурами расположены эксцентрично или центрально, имеют грубодольчатое строение хроматина, окрашенного нормо- или гиперхромно. В части ядер определяются центральные, не увеличенные одиночные ядрышки. Редко встречаются 2-х ядерные, гигантские одноядерные и многоядерные клетки, митозы. Выявляются единичные клетки вытянутой, удлинённой и веретенообразной формы.

Кариологическая характеристика

Проанализировано 18 метафаз. Число хромосом колеблется от 48 до 52. Модальное число хромосом соответствует диплоидному набору (2n). Хромосомный набор во всех культурах измененный, но стабильный. Наблюдается трисомия по хромосомам 1, 2, 3, 7, 22 и хромосоме из группы F (19 или 20). Во всех клетках обнаружена дупликация участка длинного плеча хромосомы 4, делеция участка длинного плеча хромосомы 11 (q22-qter), транслокация короткого плеча хромосомы 6 с участком неидентифицируемого хромосомного материала, транслокация короткого плеча хромосомы 7 и длинного плеча хромосомы 9, а также дополнительный материал на длинном плече хромосомы 17, скорее всего дупликация участка q22q24.

Кариотип:

48~52<2n>,XX,+1,+2,+3,dup(4)(q31.2q35),der(6)t(6;?)(p10;?),+7,der(7;9)(p10;q10),del(11)(q22),?dup(17)(q22q24),+F,+22,inc

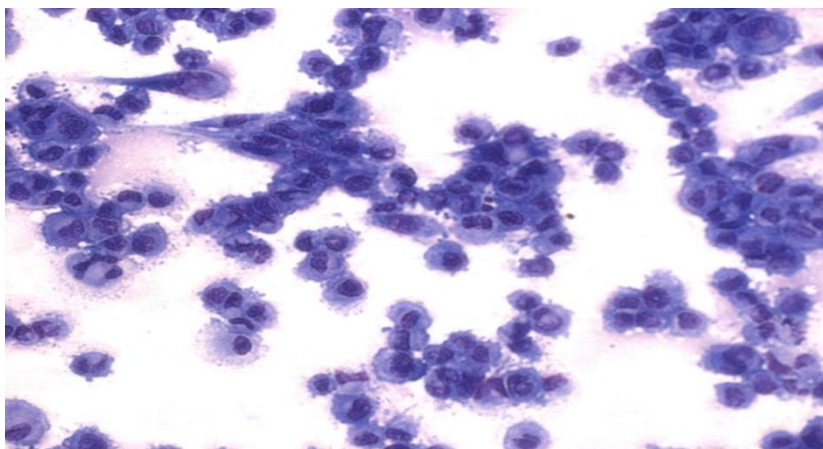
Экспрессия антигенов, мутации N-RAS+

Дифференцировочные антигены CD63, Melan A, HMB45; раковотестикулярные маркер (на уровне МРНК) класса MAGE; антигены гистосовместимости первого и второго класса.

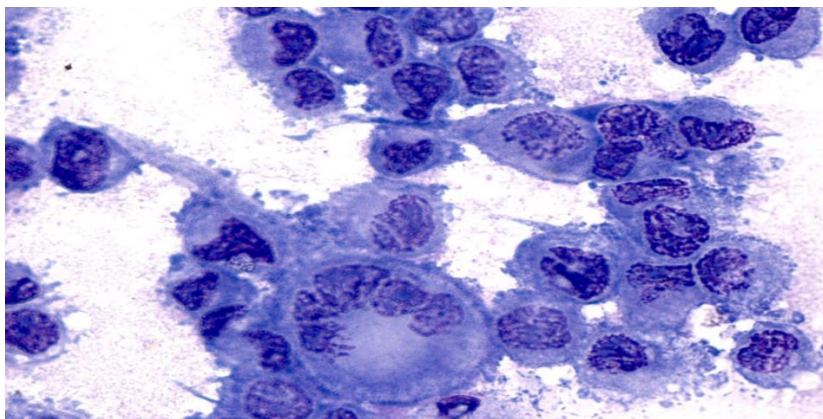
Клеточная линия меланомы человека *mel Gus* хранится в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур под номером РККК(П) 707Д.

Патент на изобретение №2373280.

Фотографии клеточной линии меланомы человека *mel Gus*



Клеточная линия меланомы человека *mel Gus*,
увеличенная в 40 раз



Клеточная линия меланомы человека *mel Gus*,
увеличенная в 100 раз

Клеточная линия *mel Gus*

Дифференцировочные антигены		Раково-тестикулярные антигены		Антигены гистосовместимости	Мутации	
CD63	+	MAGE-3	+	HLA (I класс)	BRAF 15-й экзон	NRAS 3-й экзон
HMB45	+				Wt	Q61K
Melan A	+			HLA-DR (II класс)		
Tyrosinase	–			+		

Клеточная линия меланомы человека *mel Cher*

Родословная

Линия клеток получена из опухолевого образца пациентки Ч.Н.О., и/б 98/10437, находившейся на лечении в 2003 г. с диагнозом диссеминированная меланома кожи спины. Материал получен из метастатического лимфатического узла. Предыдущее лечение: хирургическое, химиотерапия, иммунотерапия.

Получение

Опухолевая ткань получена хирургическим путем при удалении метастазов меланомы кожи. Полученную суспензию клеток засевали во флаконы и культивировали в течение длительного времени. Стабильно растущая клеточная линия была получена на 15 пассаже.

Морфологические признаки

Культура меланомы *mel Cher* имеет полиморфный клеточный состав и представлена клетками разных размеров и формы: вытянутой, удлинённой, отросчатой, веретенообразной с тонкими длинными отростками разной длины, округлой, овальной и неправильной формы. Цитоплазма клеток относительно обильная, негомогенная, окрашена в базофильные тона различной степени интенсивности, иногда с розоватым оттенком и часто содержит значительное количество мелкозернистого пигмента меланина. Ядра опухолевых клеток полиморфные, нормо- и гиперхромные с 1–3 ядрышками. Встречаются также гигантские одноядерные и 2-х ядерные клетки. Часто выявляются митозы.

Кариологическая характеристика

Культура характеризуется различающимися диаметрами ядер при одних и тех же плотности окраски и состоянии хроматина, характерного для интерфазных ядер.

Проанализировано 25 метафаз. Число хромосом колеблется от 85 до 92. Модальное число хромосом соответствует тетраплоидному набору (4n).

Наблюдается делеция короткого плеча хромосомы 4 (p12-pter), транслокация двух длинных плеч хромосомы 7 с образованием изохромосомы, дополнительный хромосомный материал неизвестного происхождения на коротком плече хромосомы 9 в районе 9p21.

Кариотип:

85~92<4n>,XXYY,del(4)(p12),i(7)(q10),add(9)(p21)x2,inc

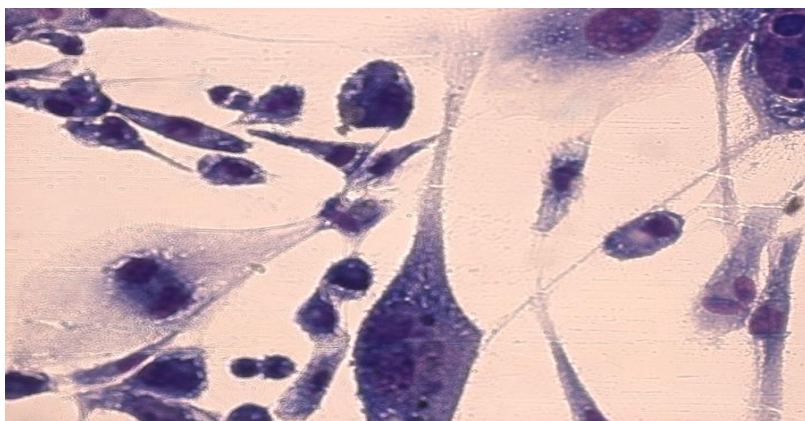
Экспрессия антигенов, мутации B-Raf +

Клеточная линия, характеризуется экспрессией меланомных (дифференцировочных) антигенов: CD63, HMB45, Tyrosinase. HMW, MelanA—отрицательные. Положительная экспрессия раково-тестикулярных маркеров (на уровне МРНК) класса MAGE. Особенностью данной линии является наличие антигенов гистосовместимости первого и второго класса.

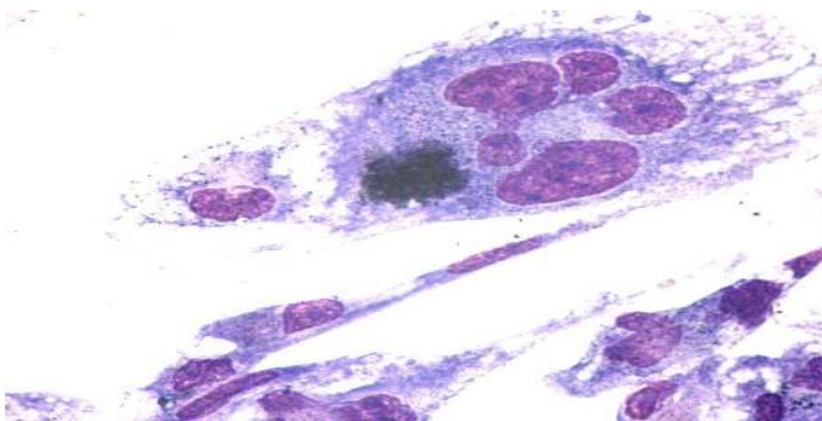
Клеточная линия меланомы человека *mel Cher* хранится в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур под номером РККК(П) 704Д.

Патент на изобретение № 2364624.

Фотографии клеточной линии меланомы человека *mel Cher*



Клеточная линия меланомы человека *mel Cher*,
увеличенная в 40 раз



Клеточная линия меланомы человека *mel Cher*,
увеличенная в 100 раз

Клеточная линия *mel Cher*

Дифференцировочные антигены		Раково-тестикулярные антигены	Антигены гистосовместимости	Мутации	
				BRAF 15-й экзон	NRAS 3-й экзон
CD63	+	MAGE-3 +	HLA (I класс)	+	V600E
HMB45	+				
Melan A	—		HLA-DR (II класс)	+	

Клеточная линия меланомы человека *mel Ch*

Родословная

Линия клеток получена из опухолевого образца пациентки Ч.Н.Т., и/б 00/10144, находившейся на лечении в 2002 г. с диагнозом диссеминированная меланома кожи левого бедра. Материал получен путем удаления подкожного метастатического узла правой подмышечной области. Лечение: хирургическое, химиотерапия, иммунотерапия.

Получение

Суспензию клеток засевали во флаконы, культивировали. Растущая линия получена на 15 пассаже.

Морфологические признаки

Культура *mel Ch* представлена эпителиоподобными и в небольшом количестве веретеноподобными клетками мелкого и среднего размеров с четкими границами цитоплазмы. Эпителиоподобные клетки имеют узкий ободок базофильной неомогенной цитоплазмы и нормо- и гиперхромные ядра с грубодольчатым строением хроматина. Имеются гигантские 2-х и многоядерные клетки с центральным и периферическим расположением ядер. Встречаются митозы.

Кариологическая характеристика

Проанализировано 17 метафаз. Число хромосом колеблется от 81 до 85. Модальное число хромосом соответствует тетраплоидному набору (4n). В культуре наблюдается увеличение количество копий хромосомы 7 – пентасомия. Структурные нарушения кариотипа включают: две различные делеции длинных плеч хромосомы 1 – почти всего длинного плеча от q11~12 до qter и части длинного плеча от q32 до qter; транслокацию двух длинных плеч хромосомы 1 с образованием изохромосомы. Таким образом, наблюдается выраженный дисбаланс по хромосомному материалу хромосомы 1. Кроме того, обнаружена транслокация двух коротких плеч хромосомы 6 с образованием изохромосомы, дополнительный хромосомный материал неизвестного происхождения на длинном плече хромосомы 20 в районе 20q13. Наблюдается также маленькая маркерная хромосома.

Кариотип:

81~85<4n>,XXXX,del(1)(q11~12),del(1)(q32)x2,i(1)(q10)x3,i(6)(p10)x3,+7,add(20)(q13),+mar,inc

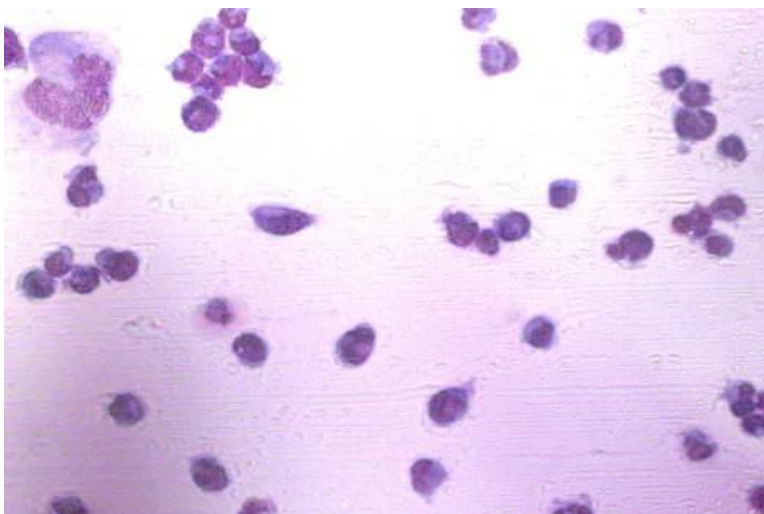
Экспрессия антигенов, мутации B-Raf +

Экспрессия дифференцировочных антигенов CD63 и HMW; раковотестикулярных маркеров (на уровне МРНК) класса MAGE; антигенов гистосовместимости первого и второго класса.

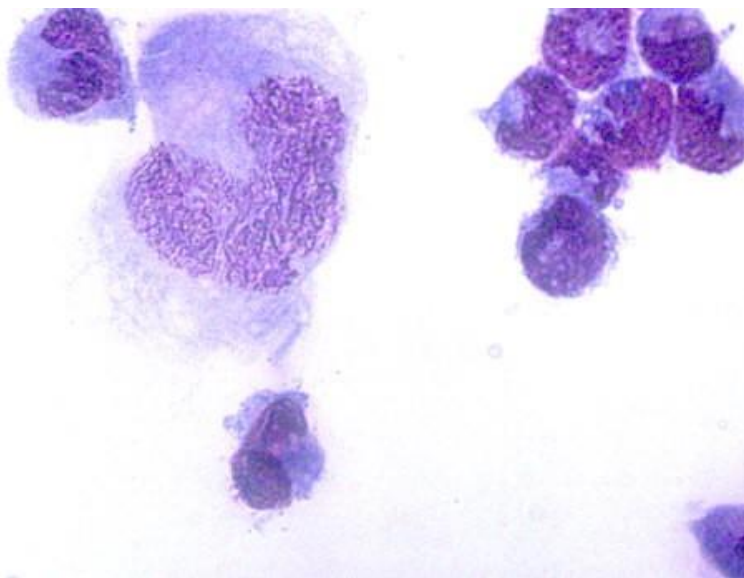
Клеточная линия меланомы человека *mel Ch* хранится в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур под номером РККК(П) 706Д.

Патент на изобретение №2373279.

Фотографии клеточной линии меланомы человека *mel Ch*



Клеточная линия меланомы человека *mel Ch*,
увеличенная в 40 раз



Клеточная линия меланомы человека *mel Ch*,
увеличенная в 100 раз

Клеточная линия *mel Ch*

Дифференцировочные антигены		Раково-тестикулярные антигены		Антигены гистосовместимости		Мутации	
CD63	+		MAGE-3	+	HLA (I класс)	+	BRF 15-й экзон NRAS 3-й экзон
						V600E	Wt

Клеточная линия меланомы человека *mel Me*

Родословная

Линия клеток получена из опухолевого образца М.Е.А, и/б 02/19050, находившегося на лечении в 2002 г. с диагнозом диссеминированная меланома кожи спины. Материал получен путем удаления метастатического узла кожи спины. Предыдущее лечение: хирургическое.

Получение

Опухолевая ткань получена хирургическим путем при удалении метастазов кожи. Полученную суспензию клеток засевали во флаконы и культивировали в течение длительного времени. Стабильно растущая клеточная линия была получена на 20 пассаже.

Морфологические признаки

Цитограмма культуры *mel Me* состоит преимущественно из эпителиоподобных клеток мелкого, среднего и крупного размеров. Клетки располагаются группами, небольшими плотными скоплениями и разрозненно. Имеются немногочисленные клетки веретенообразной, отросчатой и вытянутой удлинённой формы. Ядра клеток полиморфные, округлой, овальной, перстневидно подобной и неправильной формы. Имеют различный размер, утолщенные края, грубоглыбчатое и зернистое строение хроматина, увеличенные одно или несколько ядрышек. Цитоплазма клеток негомогенная, окрашена в базофильные тона различной степени интенсивности. Часто выявляются митозы (0 – 6 в поле зрения). Встречаются двух ядерные клетки и единичные гигантские многоядерные клетки.

Кариологическая характеристика

Проанализировано 88 метафаз. Число хромосом в 60 клетках колеблется от 47 до 50. Модальное число хромосом в этих клетках соответствует диплоидному набору (2n). В 28 клетках обнаружен тетраплоидный (4n) набор (около 100 хромосом). Принимая во внимание дублированность маркерных структур (кольцевая хромосома), можно утверждать, что речь идет не о двух различных линиях клеток, а о повышенной полиплоидизации в этой культуре. Наблюдается трисомия по хромосомам 2 и 7, кольцевая хромосома 15. Обнаружен дополнительный хромосомный материал неизвестного происхождения на обоих плечах хромосомы 1.

Кариотип:

47~50<2n>,XY,der(1)add(1)(p36)add(1)(q43),+2,+7,r(15),inc

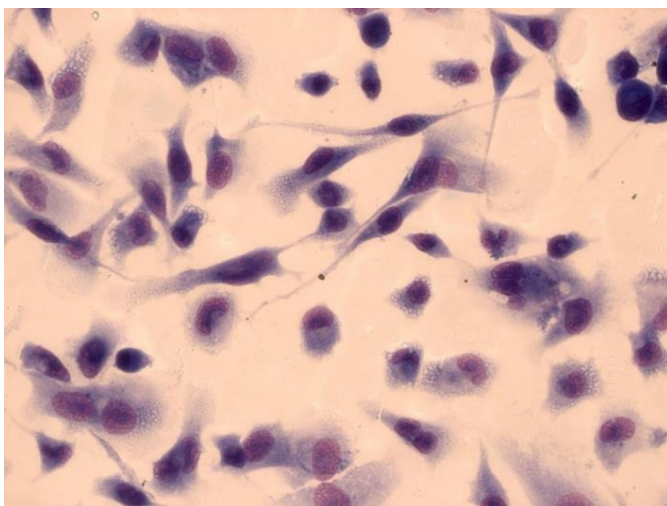
Экспрессия антигенов, мутации N-RAS+

Экспрессия меланомных (дифференцировочных) антигенов: CD63, MelanA, HMB45, HMW; антигены гистосовместимости первого и второго класса.

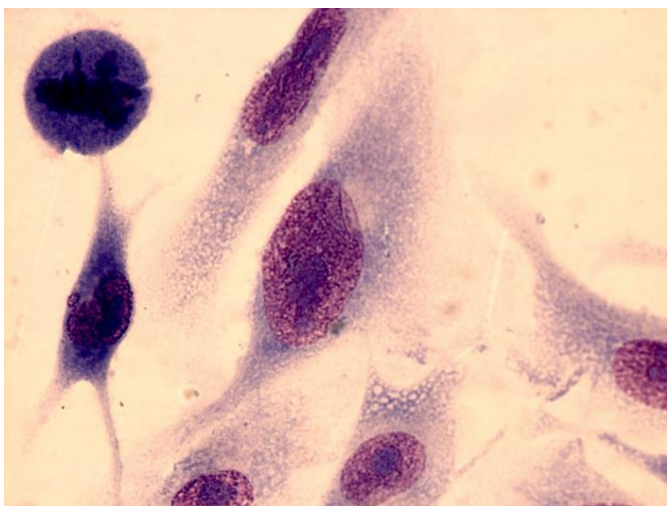
Клеточная линия меланомы человека *mel Me*, хранится в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур под номером РККК(П) 712Д.

Патент на изобретение № 2402603.

Фотографии клеточной линии меланомы человека *mel Me*



Клеточная линия меланомы человека *mel Me*,
увеличенная в 40 раз



Клеточная линия меланомы человека *mel Me*,
увеличенная в 100 раз

Клеточная линия *mel Me*

Дифференцировочные антигены		Раково-тестикулярные антигены		Антигены гистосовместимости		Мутации	
CD63	+	MAGE-3		HLA (I класс)	+	BRAF 15-й экзон	NRAS 3-й экзон
HMB45	+				HLA-DR (II класс)	+	Wt
Melan A	+						
Tyrosinase	—						
HMW	+						

Клеточная линия меланомы человека *mel Z*

Родословная

Линия клеток получена из опухолевого образца пациентки 3.3.С., 55 лет, и/б 03/12300, находившейся на лечении в 2003 г. с диагнозом диссеминированная меланома кожи спины. Материал получен путем удаления метастатического узла из мягких тканей межлопаточной области. Предыдущее лечение: хирургическое, химиотерапия, иммунотерапия.

Получение

Опухолевая ткань получена хирургическим путем при удалении метастазов кожи. Полученную суспензию клеток засевали во флаконы и культивировали в течение длительного времени. Стабильно растущая клеточная линия была получена на 20 пассаже.

Морфологические признаки

Цитограмма культуры *mel Z* состоит из клеток веретенообразной, вытянутой удлинённой, отросчатой формы и немногочисленных клеток округлой формы. Ядра клеток овальной, округлой и неправильной формы, нормо- и гиперхромные с зернистым и грубоглыбчатым строением хроматина. Ядра содержат одно или несколько мелких ядрышек. Цитоплазма клеток негомогенная, умеренно базофильная с розоватым оттенком. Имеются двух ядерные клетки и небольшое количество гигантских многоядерных клеток с 4–6 ядрами. Часто выявляются фигуры деления клеток.

Кариологическая характеристика

Проанализировано 43 метафазы. Число хромосом колеблется от 44 до 46. Модальное число хромосом соответствует диплоидному набору (2n). Наблюдается трисомия по хромосоме 7; моносомия по хромосоме 11; дериватная хромосома, состоящая из короткого плеча хромосомы 1, длинного плеча хромосомы 9 и сегмента хромосомы 1 проксимальнее 1p31, транслоцированного на конец короткого плеча хромосомы 1; транслокация двух длинных плеч хромосомы 1 с образованием изохромосомы; транслокация короткого плеча 6 и длинного плеча 9 хромосом; транслокация части длинного плеча 6 хромосомы на конец длинного плеча 17 хромосомы (сегмент хромосомы 6 дистальнее 6q22 транслоцировался на хромосому 17 в участке 17q24).

Кариотип:

44~46<2n>,XX,der(1;1;9)(1pter→1p31::1p36→1p10::9q10→9qter),
i(1)(qter→q10::q10→qter),der(6;9)(6pter→6p10::9q10→9qter),t(6;17)
(6pter→6q22::17q24→17qter;17pter→17q24::6q22→6qter),+7,-11,inc

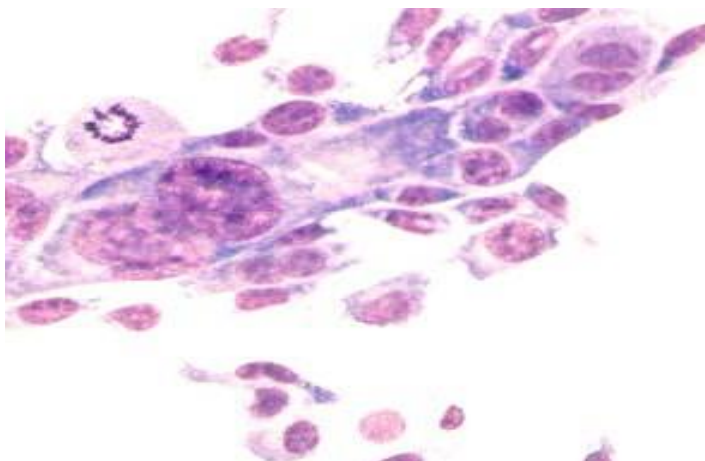
Экспрессия антигенов, мутации B-Raf +

Экспрессия меланомного дифференцировочного антигена CD63 и антигена первого класса гистосовместимости.

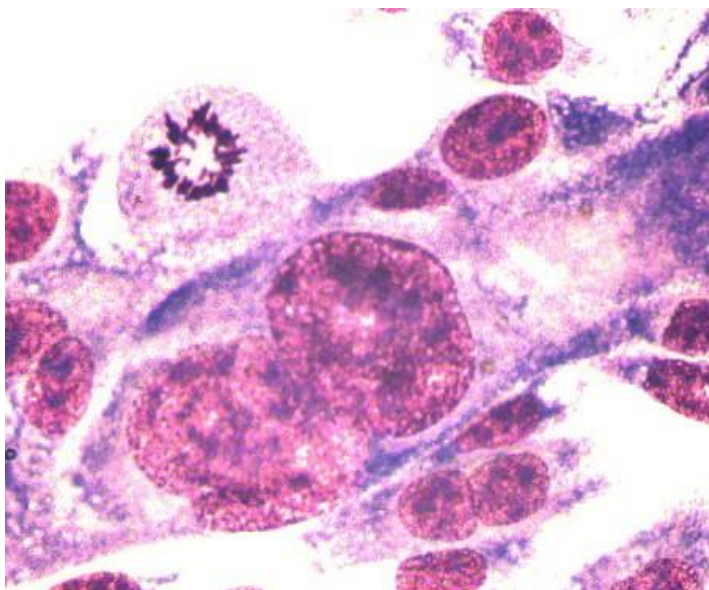
Клеточная линия меланомы человека *mel Z* хранится в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур под номером РККК(П) 711Д.

Патент на изобретение № 2390556.

Фотографии клеточной линии меланомы человека *mel Z*



Клеточная линия меланомы человека *mel Z*,
увеличенная в 40 раз



Клеточная линия меланомы человека *mel Z*,
увеличенная в 100 раз

Клеточная линия *mel Z*

Дифференцировочные антигены		Антигены гистосовместимости		Мутации	
CD63	+	HLA (I класс)	+	BRAF 15-й экзон	NRAS 3-й экзон
		HLA-DR (II класс)	–	V600E	Wt

Клеточная линия меланомы человека *mel Rac*

Родословная

Линия клеток получена из опухолевого образца Р.Д.М., и/б 95/5520, находившегося на лечении в 2002 г. с диагнозом диссеминированная меланома кожи правой голени. Материал получен путем удаления метастатического узла из мягких тканей правого бедра. Предыдущее лечение: хирургическое.

Получение

Опухолевая ткань получена хирургическим путем при удалении метастазов кожи. Полученную суспензию клеток засевали во флаконы и культивировали в течение длительного времени. Стабильно растущая клеточная линия была получена на 20 пассаже.

Морфологические признаки

Цитограмма представлена полиморфным клеточным составом. Присутствуют клетки округлой, веретенообразной, вытянутой удлиненной, многоотростчатой и неправильной формы. Ядра клеток резко гиперхромные с зернистым и грубоглыбчатым строением хроматина, часто содержат гипертрофированные ядрышки. Наблюдается фрагментация и почкование ядер. Цитоплазма клеток негомогенная, интенсивно базофильная.

Кариологическая характеристика

Выделено два клона клеток с различными хромосомными нарушениями. Всего проанализировано 33 метафазы, из них 22 относились к одному клону, а 11 – к другому. Число хромосом в обоих клонах колеблется от 70 до 84 хромосом. Модальное число хромосом соответствует гипертриплоидному набору ($3n+$). Обнаружено также 12 клеток с гексаплоидным ($6n$) набором (около 150 хромосом), что говорит о повышенной полиплоидизации в этой культуре. В клетках первого клона выявлена нулисомия по Y-хромосоме. В каждой из метафазных пластинок этого клона обнаружено две нормальные хромосомы 1, две хромосомы 1 с дополнительными хромосомными материалами неизвестного происхождения (от разных хромосом) на их коротких плечах, и, кроме того, часть длинных плеч двух хромосом 1 ($1q12\ qter$) участвует в транслокации с хромосомой, идентифицировать которую не удалось. Обнаружена также делеция части длинного плеча хромосомы 6 в районе $6q21$ (в двух экземплярах), транслокация двух длинных плеч хромосомы 7 с образованием изохромосомы (в двух экземплярах) и транслокация длинных плеч хромосом 9 и 14. Встречается 2–3 маленькие маркерные хромосомы. В

клетках второго клона выявлена дисомия по Y-хромосоме и нулисомия по X-хромосоме. В каждой из метафазных пластинок этого клона наблюдалось по 4 нормальные хромосомы 3. Обнаружен дополнительный хромосомный материал неизвестного происхождения на длинном плече хромосомы 5 и на коротком плече хромосомы 9.

Кариотип:

70~84<3n>XX,-Y,add(1)(p36),+add(1)(p36),del(6)(q21)×2,
i(7)(q10)×2,der(9;14)(q10;q10),+der(?)t(?;1)(?;q12)×2,+2~3mar,
inc[22]

70~84<3n>,YY, X,+3,add(5)(q35),add(9)(p21),inc[11]

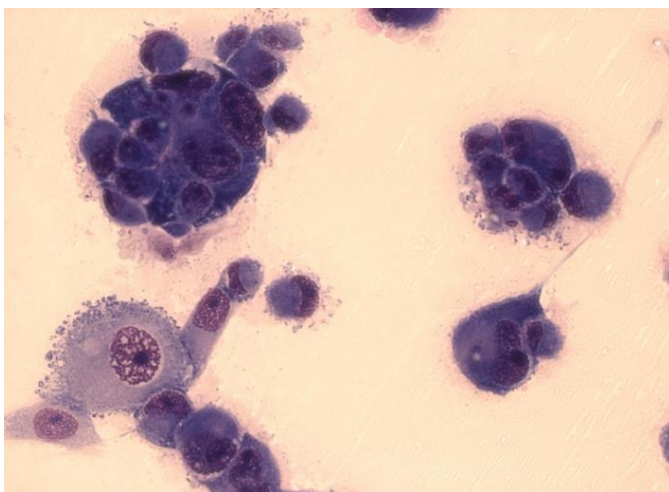
Экспрессия антигенов, мутации N-RAS+

Клеточная линия, характеризуется экспрессией меланомно-дифференцировочных антигенов CD63, HMW и отрицательных MelanA, HMB45, Tyrosinase. Положительная экспрессия раковотестиккулярных маркеров (на уровне МРНК) класса MAGE. Особенностью данной линии является наличие антигенов гистосовместимости первого и второго класса.

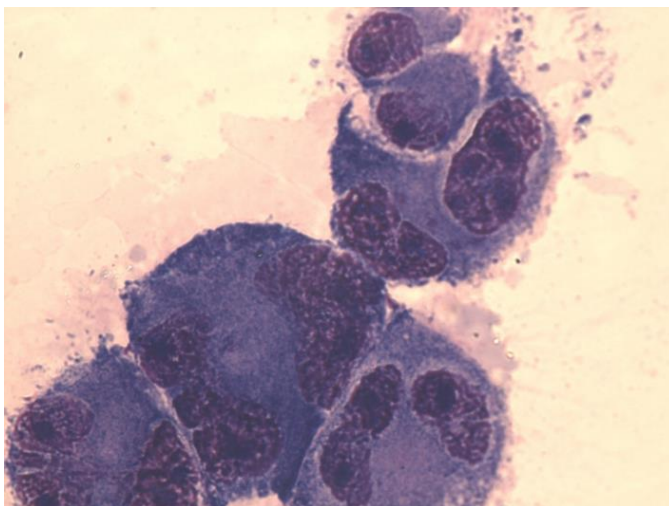
Клеточная линия меланомы человека *mel Rac* хранится в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур под номером РККК(П) 710Д.

Патент на изобретение № 2402602.

Фотографии клеточной линии меланомы человека *mel Rac*



Клеточная линия меланомы человека *mel Rac*,
увеличенная в 40 раз



Клеточная линия меланомы человека *mel Rac*,
увеличенная в 100 раз

Клеточная линия *mel Rac*

Дифференцировочные антигены	Раково- тестикулярные антигены	Антигены гистосовместимости		Мутации	
		HLA (I класс)	+	BRAF 15-й экзон	NRAS 3-й экзон
CD63	+				
HMB45	—				
Melan A	—				
Tyrosinase	—				
HMW	+	MAGE-3	+	Wt	Q61K

Клеточная линия меланомы человека *mel H*

Родословная

Линия клеток получена из опухолевого образца пациента Х.Н.С., и/б 00/9865, находившегося на лечении в 2001 г. с диагнозом диссеминированная меланома кожи левой стопы. Лечение: хирургическое, иммуно- и химиотерапевтическое.

Получение

Материал получен путем удаления метастатического пахового л/узла. Суспензию клеток засевали во флаконы и культивировали. Стабильно растущая клеточная линия была получена на 31 пассаже.

Морфологические признаки

Клеточная линия состоит из мономорфных клеток мелкого и среднего размеров, округлой, овальной и удлинённой формы без четких цитоплазматических контуров. Цитоплазма обильная негомогенная, окрашена в базофильные тона с розоватым оттенком. Ядра клеток гипо- и нормохромные с зернистым строением хроматина, иногда содержат ядрышки. Редко встречаются 2-х ядерные и гигантские одноядерные и многоядерные клетки. Встречаются митозы.

Кариологическая характеристика

Проанализировано 88 метафаз. Число хромосом в 69 клетках колеблется от 54 до 65 хромосом, что отражает триплоидный набор (3n). В 19 клетках обнаружен гексаплоидный (6n) набор (около 120 хромосом). Вероятно, это клетки с реплицированными хромосомными наборами, в которых не произошло разделение цитоплазмы, т.е. речь идет не о двух различных линиях клеток, а о повышенной полиплоидизации в этой культуре. Обнаружена нулисомия по хромосоме Y, дополнительный хромосомный материал неизвестного происхождения на длинных плечах двух хромосом 19 и на длинных плечах хромосомы из группы D, перичентрическая инверсия участка хромосомы 16 (p11q12), транслокация хромосом 13 и 15. В 32 клетках отмечаются хромосомные aberrации, представленные дицентрическими (47), трицентрическими (1) и кольцевыми (3) хромосомами. Следовательно, данная культура и характеризуется высокой хромосомной изменчивостью.

Кариотип:

54~65<3n>, XX, -Y, der(13;15)(q10;q10), add(Dq),
inv(16)(p11q12), add(19)(q13.4), inc.

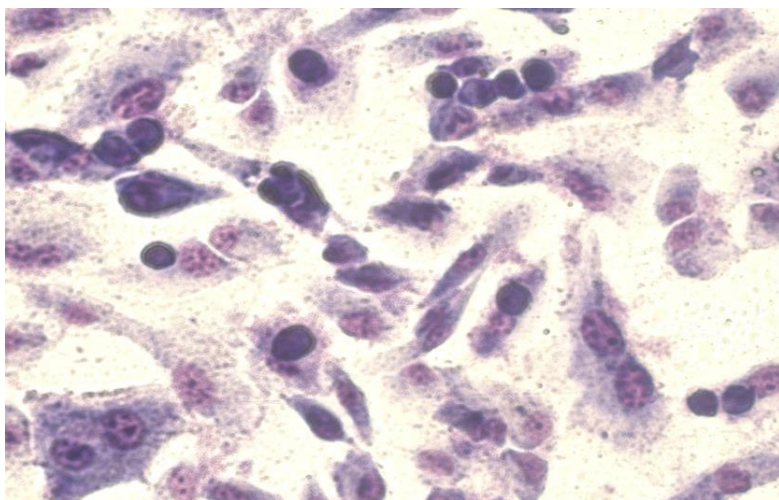
Экспрессия антигенов, мутации B-Raf +

Экспрессия дифференцировочного антигена HMW, CD63; антигена гистосовместимости первого класса; РТА (на уровне МРНК) MAGE.

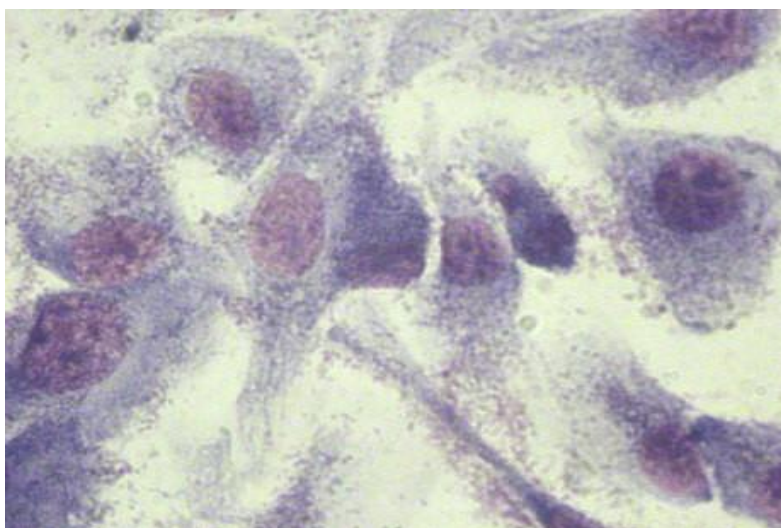
Клеточная линия меланомы человека *mel H* хранится в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур под номером РККК(П) 715Д.

Патент на изобретение № 2402604.

Фотографии клеточной линии меланомы человека *mel H*



Клеточная линия меланомы человека *mel H*,
увеличенная в 40 раз



Клеточная линия меланомы человека *mel H*,
увеличенная в 100 раз

Клеточная линия *mel H*

Дифференцировочные антигены		Раково-тестикулярные антигены		Антигены гистосовместимости		Мутации	
CD63	+	MAGE-3	+	HLA (I класс)	+	BRAF 15-й экзон	NRAS 3-й экзон
HMB45	–			HLA-DR (II класс)	–	V600E	Wt
Melan A	–						
Tyrosinase	–						
HMW	+						

Клеточная линия меланомы человека *mel Bgf*

Родословная

Линия клеток получена из опухолевого образца пациента Б.Г.Ф., 57 лет, и/б 03/9000, с диагнозом диссеминированная меланома кожи плеча. Материал получен из метастат. узла из мягких тканей правого бедра. Лечение: хирургическое

Получение

Суспензию клеток засеивали во флаконы и культивировали. Стабильно растущая клеточная линия получена на 32 пассаже.

Морфологические признаки

Цитограмма состоит из клеток вытянутой и веретенообразной формы с двумя и более длинными или короткими отростками цитоплазмы, переплетающиеся с другими отростками (волоконцами цитоплазмы). Ядра клеток овальной и удлинённой формы, нормо- и гиперхромные с 1–3 нуклеолами и грубоглыбчатым строением хроматина. Цитоплазма клеток негомогенная, слабо базофильная. Редко обнаруживаются двух ядерные и гигантские одноядерные и многоядерные клетки с 3–5 ядрами и фигуры митоза (0–2 в поле зрения).

Кариология

В большинстве клеток модальное число хромосом соответствует триплоидному набору (3n). Число хромосом колеблется от 64 до 78. Встречаются тетраплоидные клетки. Всего проанализировано 20 метафаз.

Нарушения кариотипа включают несколько дериватных хромосом. Дериватная хромосома 1 образована транслокацией участка неизвестной хромосомы на 1q11 и транслокацией на этот неизвестный участок части короткого плеча гомологичной хромосомы 1 (1p21-pter). Дериватная хромосома 5 образована транслокацией участка хромосомы 1 дистальнее 1p13 на длинное плечо хромосомы 5 в районе 5q11. Длинное плечо хромосомы 1 участвует в образовании дериватной хромосомы 19: часть хромосомы 1 дистальнее 1q12 транслоцирована на хромосому 19 в районе 19p12. Обнаружен также дополнительный хромосомный материал неизвестного происхождения на коротком плече хромосомы 9 в районе 9p21 и на коротком плече хромосомы 22 в районе 22p11.2. Транслокация двух коротких плеч хромосомы 7 с образованием изохромосомы и делеция хромосомы 3 в участке 3p12. Все аномальные хромосомы в одной метафазе представлены двумя копиями.

Кариотип:

64~78<3n>,XXX,der(1)t(1;?)(q11;?)t(?;1)(?;p21)x2,del(3)(p12)x2,der(5)t(1;5)(p13;q11)x2,i(7)(p10)x2,add(9)(p21)x2,der(19)t(1;19)(q12;p12)x2,add(22)(p11.2)x2,inc.

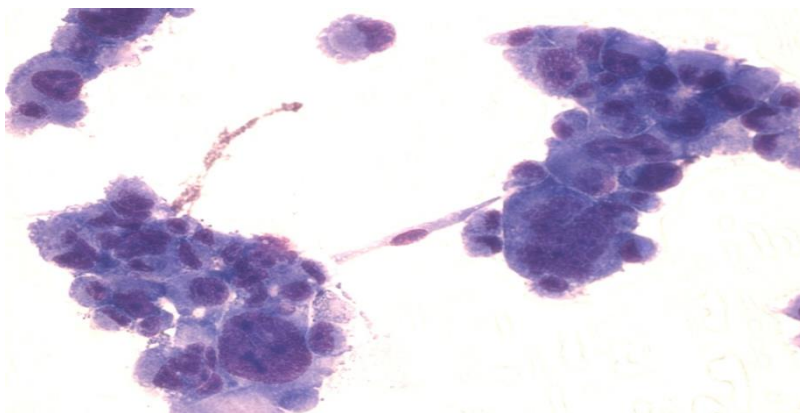
Экспрессия антигенов, мутации B-Raf +

Экспрессия дифференцировочных маркеров: CD63, HMW; антигена гистосовместимости первого класса. MAGE слабо положительный

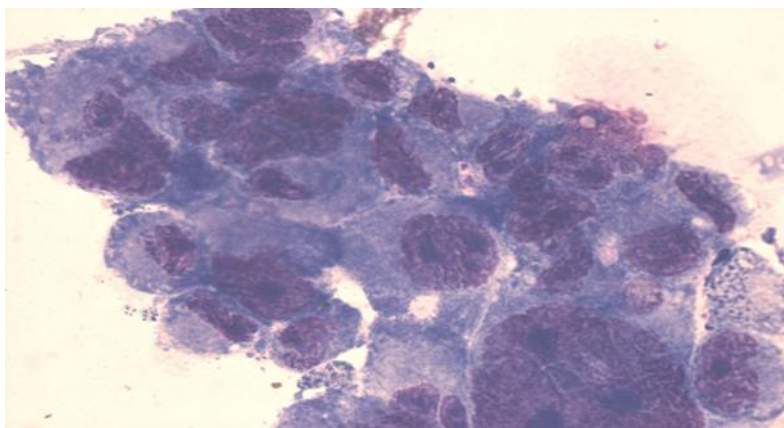
Клеточная линия меланомы человека *mel Bgf* хранится в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур под номером РККК(П) 714Д.

Патент на изобретение № 2390557.

Фотографии клеточной линии меланомы человека *mel Bgf*



Клеточная линия меланомы человека *mel Bgf*,
увеличенная в 40 раз



Клеточная линия меланомы человека *mel Bgf*,
увеличенная в 100 раз

Клеточная линия *mel BgJ*

Дифференцировочные антигены	Раково-тестикулярные антигены		Антигены гистосовместимости	Мутации		
				BRAF 15-й экзон	NRAS 3-й экзон	
CD63	+	MAGE-3	HLA (I класс)	+	V600E	Wt
HMB45	—					
Melan A	—					
Tyrosinase	—					
HMW	+					

Клеточная линия меланомы человека *mel Ksen*

Родословная

Линия клеток получена из опухолевого образца больной К.Н.С., 60 лет, и/б 00/10951 диссеминированной меланомой кожи передней брюшной стенки. Предыдущее лечение: хирургическое.

Получение

Опухолевая ткань получена хирургическим путем при удалении метастатического лимфоузла. Полученную суспензию клеток засеивали во флаконы и культивировали в течение длительного времени. Стабильно растущая клеточная линия была получена на 15 пассаже

Морфологические признаки

Цитограмма культуры *mel Ksen* характеризуется присутствием клеток округлой формы мелкого, среднего и крупного размеров с четкими или фестончатыми границами негомогенной цитоплазмы, окрашенной в базофильные тона, и немногочисленных клеток веретенообразной и вытянутой удлинённой формы. Ядра клеток нормо- и гиперхромные с грубоглыбчатым строением хроматина, содержат центрально расположенные нуклеолы. Имеются двух ядерные, гигантские одноядерные и многоядерные клетки. Редко выявляются митозы.

Кариологическая характеристика

Проанализировано 20 метафаз. Число хромосом колеблется от 45 до 48. Модальное число хромосом соответствует диплоидному набору (2n). Наблюдается транслокация части длинного плеча хромосомы 5 на короткое плечо дополнительной хромосомы 1 (в участке 1p32); делеция части длинного плеча хромосомы 5 (в некоторых метафазных пластинках таких делетированных хромосом встречается по 2 шт.); транслокация двух коротких плеч хромосомы 6 с образованием изохромосомы; транслокация короткого плеча хромосомы 7 и хромосомного материала неизвестного происхождения; моносомия по хромосоме 10; робертсоновская транслокация хромосом 15 и 21; маркерная хромосома.

Кариотип:

45~48<2n>,X,-X,+der(1)t(1;5)(p32;q21),del(5)(q12)□2,
i(6)(p10),+der(7)t(7;?)(p10;?),-10,der(15;21)(q10;q10),+mar,inc

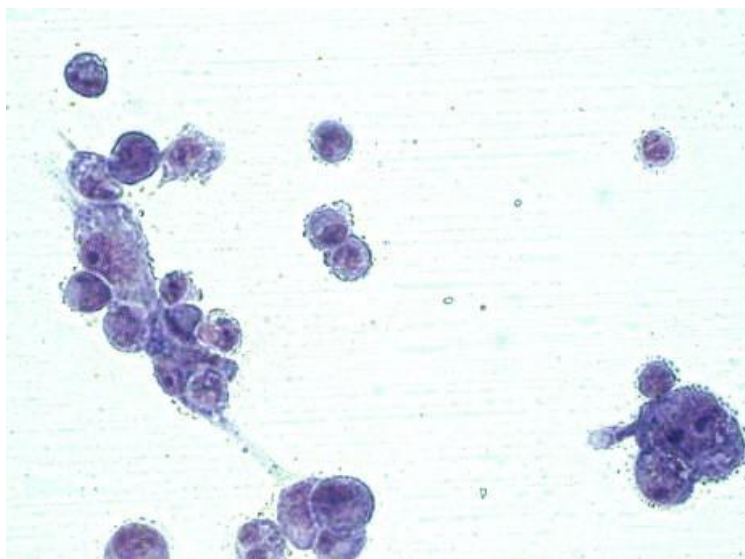
Экспрессия антигенов, мутации

Клеточная линия, характеризуется экспрессией меланомного (дифференцировочного) маркера: CD63.

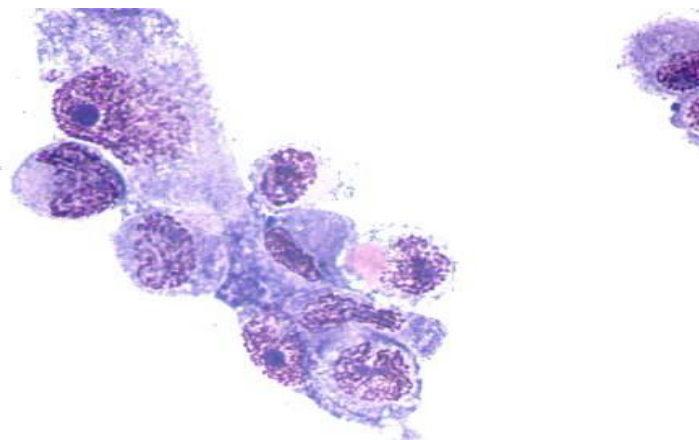
Клеточная линия меланомы человека *mel Ksen*, хранится в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур под номером РККК(П) 713Д.

Патент на изобретение №2392316.

Фотографии клеточной линии меланомы человека *mel Ksen*



Клеточная линия меланомы человека *mel Ksen*,
увеличенная в 40 раз



Клеточная линия меланомы человека *mel Ksen*,
увеличенная в 100 раз

Клеточная линия *mel Ksen*

Дифференцировочные антигены	Мутации	
	BRAF	NRAS
	15-й экзон	3-й экзон
CD63	+	
	V600E	Wt

Научное издание

Авторы:

Барышников А. Ю., Бурова О. С., Воронина Е. С., **Голубева В. А.**,
Давыдов М. М., Демидов Л. В., Григорьева И. Н., Жердева В. В.,
Ковалевский Д. А., Куликова К. В., Куравский М. Л., Лушникова А. А.,
Мазуренко Н. Н., Меерович И. Г., Михайлова И. Н., Морозова Л. Ф.,
Муронец В. И., Самойленко И. В., Синельников И. Е., Трещалина Е. М.,
Савицкий А. П., Севостьянова И. А., Цыганова И. В., Шмальгаузен Е. В.

Клеточные линии меланомы человека

Коллективная монография

Под общей редакцией
Ирины Николаевны Михайловой,
Михаила Михайловича Давыдова

Издательство «Наукоемкие технологии»
ООО «Корпорация «Интел Групп»
<http://publishing.intelgr.com>
E-mail: publishing@intelgr.com
Тел.: (812) 945-50-63

ISBN 978-5-9909412-3-6



Подписано в печать 28.10.2017.
Формат 60×84/16.
Бумага офсетная. Печать офсетная.
Объем 10,875 печ.л. Тираж 500 экз.