

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-68-76>

Подкожный ксенографт меланомы человека MelCher5k/*BRAF*⁺ с экспрессией CD20

И. Н. Михайлова^{1,2}, Е. М. Трещалина¹, С. Ш. Каршиева¹, Д. А. Хоченков¹, Н. В. Андропова¹, И. Ж. Шубина¹, М. В. Киселевский¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России; Россия, 660022 Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

Контакты: Ирина Николаевна Михайлова irmikhaylova@gmail.com

Введение. Метастатическая меланома кожи (ММК) характеризуется крайне неблагоприятным прогнозом. Значимая ремиссия ММК связана с применением вемурафениба, блокирующего пролиферацию клеток с мутацией в гене *BRAF*. Однако после отмены этого препарата быстро развивается рецидив, вызывающий необходимость продолжения лечения. Поиски другой терапевтической мишени в первичной ММК привели к малочисленной субпопуляции стволовоподобных клеток, экспрессирующих антиген CD20. Пилотные клинические испытания ритуксимаба, блокирующего CD20, не дали ожидаемых результатов. Мы расценили это как отсутствие контроля над экспрессией CD20 в рецидивных клетках, что доступно только *in vivo* в адекватной модели рецидивирующей ММК/*BRAF*⁺ человека с высокой экспрессией CD20.

Цель исследования – создание модели *in vivo* рецидивирующей ММК/*BRAF*⁺ человека и оценка представленности субпопуляции клеток с экспрессией CD20.

Материалы и методы. В исследовании использованы вемурафениб (Roche, Швейцария), культура клеток меланомы человека MelCher5k/*BRAF*⁺ и иммунодефицитные мыши-самцы Balb/c nude массой тела 20–23 г, разведенные и содержащиеся в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н. Н. Блохина. Животных с трансплантированной опухолью (*n* = 12) распределяли по 2 группам: с применением вемурафениба (экспериментальная группа) и без него (группа контроля). Сравнительную оценку динамики роста опухолевых узлов в группах проводили по соотношению объемов с помощью стандартного критерия Т/С (treatment/control), выраженному в процентах. Динамику экспрессии маркеров S100, CD20 и CD45 определяли методом проточной цитофлуориметрии до начала введения вемурафениба и в конце наблюдения.

Результаты. У мышей с MelCher5k/*BRAF*⁺, получавших вемурафениб с 7-х по 21-е сутки, с 10-х суток наблюдалась редукция опухоли с полной ремиссией к 20-м суткам. Рецидивы с развитием опухолевого узла в месте имплантации (возобновленный рост клеток меланомы) возникали на 28-е сутки (через неделю после отмены препарата), а затем в течение 34–41-х суток опухоль быстро прогрессировала. У мышей, получавших вемурафениб, доля CD20⁺-клеток в новом очаге составила 35 %, что в 1,82 раза превысило долю CD20⁺-клеток в опухоли мышей, не получавших этот препарат (19 %). При этом клетки вновь возникшей опухоли экспрессировали маркер меланомы S100 и не экспрессировали CD45.

Заключение. *In vivo* на модели MelCher5k/*BRAF*⁺ показано, что в рецидивном опухолевом узле, развивающемся после применения вемурафениба, значительно увеличивается доля стволовоподобных клеток, экспрессирующих CD20. Эти данные свидетельствуют о целесообразности использования разработанной модели для оценки клинической перспективности направленных на CD20 агентов, способных продлить ремиссию после отмены вемурафениба при рецидивирующей меланоме.

Ключевые слова: ксенографт меланомы человека *BRAF*⁺, вемурафениб, ремиссия, CD20

Для цитирования: Михайлова И. Н., Трещалина Е. М., Каршиева С. Ш. и др. Подкожный ксенографт меланомы человека MelCher5k/*BRAF*⁺ с экспрессией CD20. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(2):68–76.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-68-76>

MelCher5k/*BRAF*⁺ subcutaneous human melanoma xenograft with CD20 expression

I. N. Mikhaylova^{1,2}, H. M. Treshalina¹, S. Sh. Karshieva¹, D. A. Khochenkov¹, N. V. Andronova¹, I. Zh. Shubina¹, M. V. Kiselevskiy¹

¹N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²V. F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Partizana Zheleznyaka St., Krasnoyarsk 660022, Russia

Contacts: Irina Nikolaevna Mikhailova irmikhaylova@gmail.com

Introduction. Metastatic melanoma of the skin (mMC) is characterized by an extremely unfavorable prognosis of survival. Significant remission of mMC is associated with the use of vemurafenib, which blocks the proliferation of cells with a mutation in the *BRAF* gene. However, after its cancellation, relapse develops rapidly, determining the need for continued treatment. The search for another therapeutic target in the primary mMC led to a small subpopulation of stem-like CD20 antigen-expressing cells. Pilot clinical trials of CD20-blocking rituximab did not yield the desired result, which we interpreted as a lack of control of CD20 expression in recurrent cells, which is available only *in vivo* in an adequate human model of recurrent mMC/*BRAF*⁺ with high CD20 expression.

Aim. To create an *in vivo* model of recurrent human mMC/*BRAF*⁺ with control of the representation of a subpopulation of cells with CD20 expression.

Materials and methods. Vemurafenib (Roche, Switzerland), human melanoma cell culture MelCher5k/*BRAF*⁺, male Balb/c nude immunodeficient mice weighing 20–23 g breeding and maintenance at the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology were used. Mice with a transplanted tumor ($n = 12$) were divided into 2 groups: without the drug (control) and with the drug (vemurafenib). A comparative assessment of the growth dynamics of tumor nodes in the groups was carried out according to the volume ratio using the standard T/C (treatment/control) criterion, expressed as a percentage. The dynamics of the expression of S100, CD20, and CD45 markers was evaluated by flow cytometry before the start of vemurafenib administration and at the end of follow-up.

Results. According to the data obtained, in mice with MelCher5k/*BRAF*⁺ treated with vemurafenib from days 7 to 21, tumor reduction was observed from day 10 with complete remission by day 20. Relapses with the development of a tumor node at the implantation site (renewed growth of melanoma cells) occurred on day 28 (a week after drug withdrawal), and then the tumor progressed rapidly over the course of 34–41 days. In mice treated with vemurafenib, the proportion of CD20⁺ cells in the new focus was 35 %, which was 1.82 times higher than the proportion of CD20⁺ cells in the tumor of mice not treated with this drug (19 %). At the same time, the cells of the newly emerged tumor expressed the melanoma marker S100⁺ and did not express CD45.

Conclusion. Thus, *in vivo*, using the MelCher5k/*BRAF*⁺ model, it was shown that in a recurrent tumor node developing after the use of vemurafenib, the proportion of stem-like cells expressing CD20 significantly increases. These data suggest that it is advisable to use the model to evaluate the clinical prospects of CD20-targeted agents capable of prolonging remission after vemurafenib withdrawal in patients with recurrent melanoma.

Keywords: *BRAF*⁺ human melanoma xenograft, vemurafenib, remission, CD20

For citation: Mikhaylova I.N., Treshalina H.M., Karshieva S.Sh. et al. MelCher5k/*BRAF*⁺ subcutaneous human melanoma xenograft with CD20 expression. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(2):68–76. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-68-76>

ВВЕДЕНИЕ

В 2023 г. в России зарегистрированы 11 605 новых случаев меланомы кожи [1]. Прогрессирование заболевания в виде метастазирования характеризуется крайне неблагоприятным прогнозом и высокой смертностью в течение 1-го года с момента появления отдаленных метастазов. Лечение метастатической меланомы кожи (мМК) по-прежнему остается сложной задачей, несмотря на появление ряда новых многообещающих подходов с использованием иммунотерапевтических и таргетных препаратов. В связи с этим необходим поиск новых вариантов терапии данной патологии для улучшения долгосрочного контроля над опухолью.

Медиана общей выживаемости пациентов с мМК, получавших стандартную химиотерапию, как правило, не превышает 9 мес [2]. В ходе генетических исследований мМК выявлена доминирующая мутация в гене *BRAF*⁺, которая встречается примерно в 50 % случаев [3, 4]. С учетом данной мутации созданы таргетные препараты, использование которых улучшило показатели выживаемости пациентов с *BRAF*⁺-мМК [5]. Однако в большинстве случаев на фоне терапии инги-

биторами *BRAF* происходит прогрессирование заболевания.

Известно, что мМК содержит различные клеточные субпопуляции, наличие которых ассоциировано с прогрессированием заболевания. Одна из таких субпопуляций, обладающая характеристиками стволовых клеток, экспрессирует CD20 [6, 7]. По данным ряда исследований при иммунофенотипировании опухоли до начала лечения мМК обнаруживают до 2 % CD20⁺-клеток [8, 9]. Этот белок является В-клеточным маркером лимфопролиферативных заболеваний, для лечения которых успешно применяют ритуксимаб — препарат анти-CD20. Результаты ограниченных клинических испытаний показали, что у пациентов с мМК IV стадии без признаков заболевания после хирургического лечения, лучевой или химиотерапии наблюдается удлинение стадии ремиссии при адъювантном применении этого лекарственного средства [10]. При этом у таких больных, получавших адъювантную терапию ритуксимабом, медианы безрецидивной и общей выживаемости не были достигнуты в течение 42 мес после прекращения лечения; спустя 2 года 6 из 9 пациентов были живы, причем 5 из них — без

рецидива [10]. По данным пилотного клинического исследования эффективности ритуксимаба у 7 больных мМК медиана выживаемости без прогрессирования составила 6,3 мес, общей выживаемости — 14,7 мес, при этом наблюдалась хорошая переносимость препарата [11]. В ходе эксперимента *in vitro* с использованием сфероидов, полученных из клеток мМК/*BRAF*⁺, продемонстрирована перспективность применения комбинации нацеленных на мутантный ген *BRAF* таргетных препаратов с ритуксимабом [7]. Результаты клинических исследований и экспериментов *in vivo*, посвященных оценке эффективности комбинированной терапии *BRAF*⁺-мМК вемурафенибом и ритуксимабом, до настоящего времени опубликованы не были, что мы связываем, прежде всего, с отсутствием описанных моделей *in vivo*, в которых проанализирована представленность субпопуляции клеток с экспрессией CD20.

Таким образом, остается открытым вопрос о перспективности применения ритуксимаба в терапии *BRAF*⁺-мМК с целью продления ремиссии после лечения вемурафенибом, что послужило основанием для создания модели *in vivo* рецидивирующей *BRAF*⁺-меланомы с оценкой уровня экспрессии CD20.

Цель исследования — создание модели *in vivo* рецидивирующей *BRAF*⁺-мМК человека и определение представленности субпопуляции клеток с экспрессией CD20.

Задачи исследования: 1) получение ксенографтов на иммунодефицитных мышах-самцах Balb/c nude с использованием культуры клеток меланомы человека MelCher5k/*BRAF*⁺; 2) характеристика терапевтического эффекта вемурафениба — оценка размера ксенографта с определением продолжительности ремиссии после отмены препарата до появления рецидива опухоли; 3) характеристика клеточного состава ксенографта MelCher5k/*BRAF*⁺ на основе определения экспрессии маркеров меланоцитов (S100), стволовоподобных клеток (CD20) и В-лимфоцитов (CD45) в подкожных ксенографтах с помощью проточной цитофлуориметрии на стадиях формирования первичной опухоли и ее рецидива у животных, получавших вемурафениб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты и реактивы

В работе использован вемурафениб (Roche, Швейцария). В качестве растворителя применяли физиологический раствор («ПанЭко», Россия). Для анализа экспрессии маркеров использованы моноклональные антитела к S100 (Cat.# MA5–12969, Thermo Fisher Scientific, США), CD20-PE (anti-human antibody, Cat.# IM14351, Beckman Coulter, США), CD45 с PerCP (anti-human CD45 antibody anti-CD45-H130; Cat.# 304026, Biolegend, США).

Клетки

В работе использовали культуру клеток меланомы человека MelCher5k/*BRAF*⁺, полученную и охарактеризованную в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина [12–15]. Клетки MelCher5k/*BRAF*⁺ культивировали в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), содержащей 2 mM L-глутамина («ПанЭко», Россия), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HiMedia, Индия), при 37 °C и 5 % CO₂. Клетки пассировали 2 раза в неделю, рассаживая их в соотношении 1:5 при достижении 80–90 % конfluence. Для приготовления клеточной суспензии клетки MelCher5k/*BRAF*⁺ снимали 0,25 % раствором трипсина и этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), промывали 2 раза в растворе фосфатно-солевого буфера (PBS) («ПанЭко», Россия), подсчитывали с помощью инвертированного микроскопа NIB610 (Nexcore, Китай) и ресуспендировали в среде 199 («ПанЭко», Россия) до концентрации 10 × 10⁶ клеток в мл.

Экспрессию сигнальных маркеров меланоцитов (S100), стволовоподобных клеток (CD20), а также В-клеток (CD45) в клетках подкожного ксенографта меланомы человека MelCher/5k/*BRAF*⁺ оценивали методом проточной цитофлуориметрии.

Эксперименты на животных

Животные. В опытах использовали 8-недельных иммунодефицитных мышей-самцов Balb/c nude массой тела 20–23 г из разведения Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Животных содержали в индивидуальных клетках со свободным доступом к стерильному брикетированному корму и воде, размещенных в стерильном боксовом помещении с естественным освещением. В кондиционированном помещении поддерживали температуру 26 ± 2 °C и влажность воздуха 55 ± 15 %.

Получение ксенографтов. Для получения подкожных ксенографтов суспензию клеток MelCher5k/*BRAF*⁺ имплантировали билатерально под кожу правого и левого бока каждой мыши по 10,0 × 10⁶ клеток в 0,2 мл среды 199 (0-е сутки). При достижении среднего объема опухолей 52 мм³ (7-е сутки) мышей рандомизированно распределяли по 2 группам (контроля и вемурафениба) и начинали введение препарата.

Обработка животных вемурафенибом и оценка его эффективности. Обработка животных препаратом выполнена по методике, предложенной ранее [13, 12]. Мыши получали вемурафениб перорально в разовой дозе 75 мг/кг ежедневно в течение 14 сут; суммарная доза составила 1050 мг/кг. Животные группы контроля получали физиологический раствор в эквивалентных объемах и режиме. Опухолевые узлы измеряли во вре-

мя и после окончания применения вемурафениба 2 раза в неделю в течение 40 сут. Объем опухолевого узла определяли по стандартной формуле.

В качестве критерия эффективности воздействия использовали стандартный показатель Т/С (treatment/control), который выражали в процентах, принимая за 100 % величину объема опухоли в группе контроля на каждый срок наблюдения. Пороговое значение Т/С — ≤ 42 % [15]. Показатель вычисляли по формуле:

$$\frac{T}{C} = \frac{V_b}{V_k} \times 100,$$

где V_b — средний объем опухоли (мм³) в группе вемурафениба, V_k — средний объем опухоли (мм³) в группе контроля. V_k принимался за 100 %.

Эвтаназия животных. На 41-е сутки после последнего измерения опухолевых узлов мышей выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации шейных позвонков.

Анализ экспрессии маркеров

Динамику экспрессии маркеров S100, CD20 и CD45 в подкожных ксенографтах MelCher5k/*BRAF*⁺ оценивали с помощью метода проточной цитофлуориметрии в 2 временных точках: до начала терапии вемурафенибом и в конце наблюдения. Для этого проводили эвтаназию мышей, опухоли выделяли, дезагрегировали с помощью 0,25 % раствора трипсин-ЭДТА до получения суспензии единичных клеток, затем отмывали центрифугированием в полной ростовой среде и дважды в PBS и фиксировали в формалине.

Перед окрашиванием антителами клетки отмывали от формалина центрифугированием в PBS. Далее к клеточной суспензии добавляли антитела для выявления клеточных популяций, экспрессирующих S100, CD20 и CD45. Антитела к S100 использовали в разведении 1:50, клетки инкубировали на льду в течение 30 мин, затем промывали буфером FACS (PBS — по массовому объему (weigh/volume), 0,2 % теллячьего сывороточного альбумина (veal serum albumin, VSA), 10 mM NaN₃). Далее вносили по 5 мкл вторичных козьих антимышиных иммуноглобулинов (goat anti-mouse IgG), конъюгированных с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (FITC, Thermo, 31569), и инкубировали на льду в течение 30 мин. После клетки промывали буфером FACS, вносили по 20 мкл антител к CD20, конъюгированных с флуорохромом — R-фикоэритрином (PE), или 5 мкл антител к CD45, конъюгированных со специфической меткой PerCP, и инкубировали на льду в течение 30 мин. Клетки промывали буфером FACS и определяли количество окрашенных клеток с помощью цитофлуориметра Novocyt 2000R (Agilent Technologies, США) и программного обеспечения ACEA Novoflow 1.3 (ACEA Bioscience, Бельгия).

Статистическая обработка полученных данных

Статистический анализ полученных в опытах *in vivo* данных проводили с использованием программного обеспечения Statistical Package for the Social Sciences версии 25.0 (IBM, США). Различия между контрольной и экспериментальной группами определяли с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика роста ксенографтов MelCher5k/*BRAF*⁺

Для оценки динамики роста подкожных ксенографтов использовали прививочную дозу 10×10^6 клеток, которая в 100 % случаев вызывала у иммунодефицитных мышей Balb/c nude развитие опухолей в течение недели после имплантации. Динамику роста опухоли у животных как группы вемурафениба, так и контрольной группы оценивали путем измерения объема опухолевых узлов и обсчета полученных данных с использованием стандартной формулы [15].

Динамика роста подкожных ксенографтов MelCher5k/*BRAF*⁺ в контрольной группе описывалась двухфазной кривой, состоящей из фазы медленного роста, которая длится до 14 сут, и фазой быстрого роста (экспоненциальной фазой), которая продолжается с 14-х по 34-е сутки. При этом латентный период роста опухоли короткий — пальпируемые опухолевые узлы визуализируются у всех животных уже на 3-и сутки после имплантации клеток. На 7-е сутки объем опухолей в среднем составил 54 мм³. На 41-е сутки после имплантации опухолевых клеток объем опухолей в контрольной группе оказался равным 2165 мм³ (рис. 1).

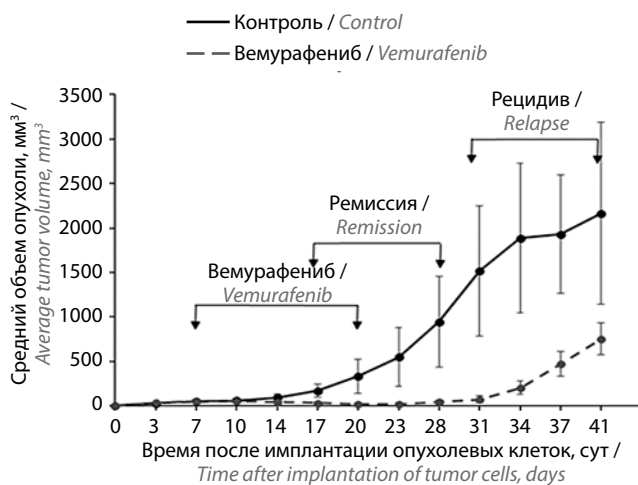


Рис. 1. Влияние вемурафениба на динамику роста подкожных ксенографтов меланомы человека MelCher5k/*BRAF*⁺ ($n = 12$). На рисунке приведены средние значения с указанием погрешностей в виде стандартной ошибки среднего. Различия статистически значимы при $p < 0,05$

Fig. 1. Vemurafenib impact on the growth of subcutaneous xenografts of human melanoma MelCher5k/*BRAF*⁺ ($n = 12$). The figure shows the mean values with errors as standard error of the mean. Differences are statistically significant at $p < 0.05$

Таблица 1. Объем ксенографтов MelCher5k/BRAF⁺ в сравниваемых группах мышей nude после отмены вемурафенибаTable 1. The volume of MelCher5k/BRAF⁺ xenografts in the groups being compared of the nude mice after cancellations of vemurafenib

День опыта Day of the experiment	Объем опухоли (среднее значение ± стандартное отклонение), мм ³ Tumor volume (average value ± standard deviation), mm ³		T/C, %
	Группа контроля Control group	Группа вемурафениба* Vemurafenib group*	
23	548,9 ± 334,7	21,2 ± 13,1	4
28	944,4 ± 509,3	41,6 ± 21,7	4
31	1516,8 ± 732,7	71,4 ± 39,1	5
34	1887,1 ± 842,9	202,2 ± 72,6	11
37	1930,2 ± 669,0	471,3 ± 139,1	24
41	2165,1 ± 1025,6	753,8 ± 179,4	35

*Различия между группами статистически значимы ($p \leq 0,05$).*Differences between the groups ($p \leq 0.05$).

На 7-е сутки после подкожной имплантации опухолевых клеток, когда средний объем опухолей достиг 52 мм³, мышам группы вемурафениба начинали перорально вводить препарат в дозе 75 мг/кг и продолжали это делать по 20-е сутки от начала эксперимента. На фоне применения вемурафениба (7–20-е сутки) наступала ремиссия: опухолевый рост прекращался, наблюдалось уменьшение размеров опухолей, вплоть до практически непальпируемых. Через 3 нед после введения препарата (с 23-х суток) рост опухолей возобновился, и к концу наблюдения (к 41-й неделе эксперимента) их объем достиг 753,8 мм³, что было интерпретировано как развитие рецидива (см. рис. 1).

Следует отметить, что в группе вемурафениба объем вновь возникшей опухоли по сравнению с размером опухоли у мышей контрольной группы вплоть до 31-х суток эксперимента составил не более 5 %, а затем с 34-х суток эксперимента начинался ее более активный рост (табл. 1).

Таким образом, наша модельная система адекватно воспроизвела закономерности регрессии опухоли под действием вемурафениба и развития рецидива после его отмены.

Анализ экспрессии маркеров меланоцитов (S100), стволовоподобных клеток (CD20) и В-клеток (CD45)

На 7-е сутки после имплантации клеток MelCher5k/BRAF⁺, когда размер опухоли составлял 54 мм³, полученная из дезагрегированных ксенографтов суспензия меланомных клеток на 65,4 % была представлена клетками MelCher5k/BRAF⁺, экспрессирующими S100. При этом только 0,4 % клеток опухоли экспрессировали одновременно S100 и CD20. Остальная часть общей популяции опухолевых клеток, вероятно, должна быть отнесена к мышинным стромальным клеткам (рис. 2).

На 41-е сутки роста ксенографта популяция клеток меланомы у мышей контрольной группы была на 98,45 % представлена клетками, экспрессирующими S100, из которых 79,16 % клеток экспрессировали лишь S100. Доля клеток, в которых выявлена экспрессия и S100, и CD20, возросла до 19,3 %. При этом доля клеток, экспрессирующих CD20, но не экспрессирующих S100, т.е., возможно, соответствующих инфильтрации опухоли В-лимфоцитами, не превышала 0,05 %.

У мышей группы вемурафениба на 41-е сутки эксперимента 95,88 % опухолевых клеток экспрессировали S100, при этом 35,16 % клеток экспрессировали также CD20, а доля клеток, экспрессирующих только S100, составила 60,72 % (рис. 3). Это означает, что доля клеток мМК, коэкспрессирующих CD20 и S100, возросла в 1,82 раза по сравнению с животными контрольной группы, которые не получали вемурафениба.

CD20 представляет собой В-лимфоцитарный антиген, регулирующий пролиферацию. Хотя и наблюдалась коэкспрессия CD20 и S100, которая свидетельствует о том, что эти клетки должны принадлежать кластеру клеток меланомы, мы решили дополнительно провести анализ экспрессии CD45 — маркера В-лимфоцитов. По результатам нашего исследования экспрессия CD45 отмечена лишь в 0,68 % клеток в контрольной группе и в 1,76 % клеток в группе вемурафениба в кластере опухолевых клеток (рис. 4).

Таким образом, в созданной нами модели выявлено увеличение субпопуляции клеток меланомы, коэкспрессирующих S100 и CD20.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования продемонстрировали, что разработанная нами модельная система мМК, представленная ксенографтом меланомы человека MelCher5k/BRAF⁺, позволяет адекватно воспроизвести развитие рецидива опухоли. Как и следовало ожидать,

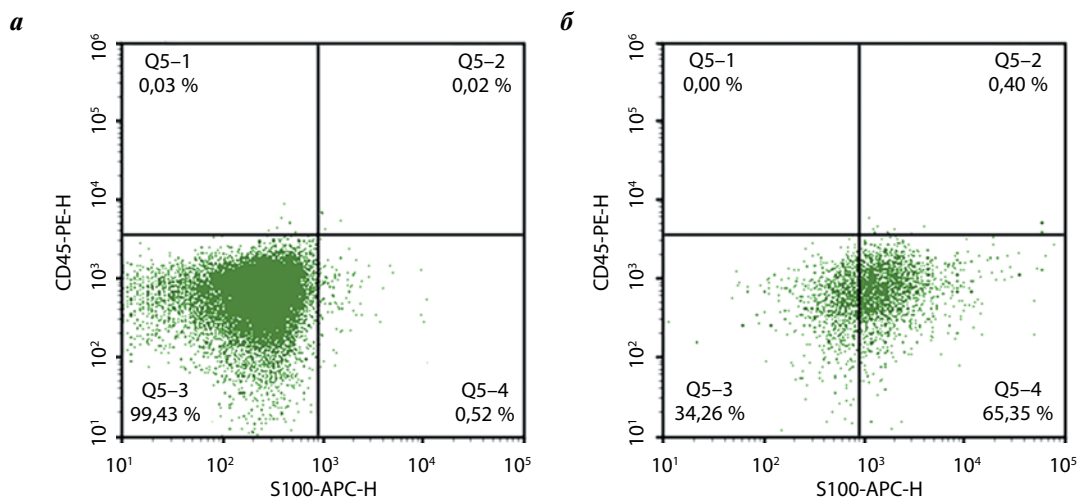


Рис. 2. Экспрессия *S100* и *CD20* в клетках *MelCher5k/BRAF⁺* на 7-е сутки после имплантации в группе контроля: а — изотипический контроль; б — экспрессия *S100* и *CD20*

Fig. 2. Expression of *S100* and *CD20* in the cells of *MelCher5k/BRAF⁺* on day 7 after tumor implantation in the control group: а — isotypic control; б — expression of *S100* and *CD20*

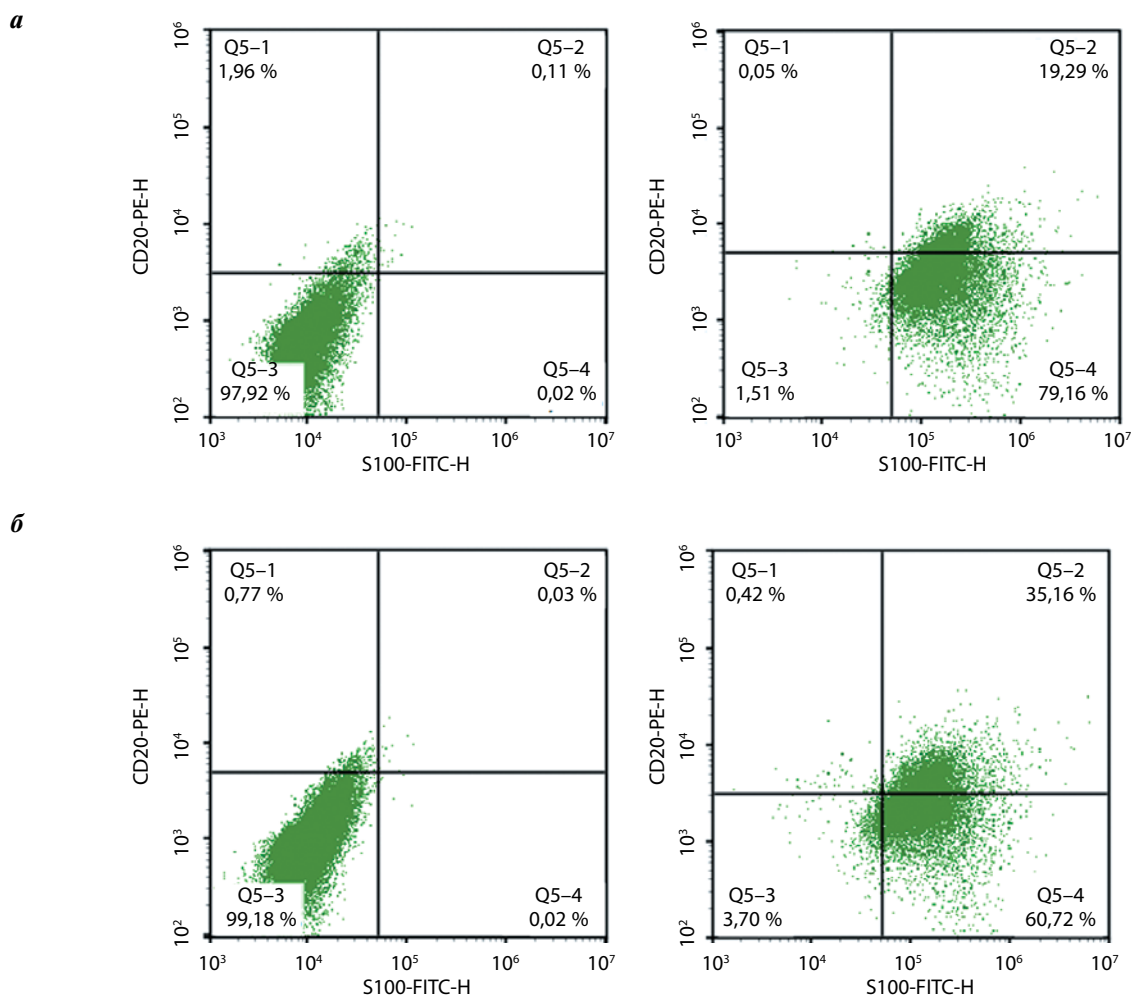


Рис. 3. Уровни экспрессии *S100* и коэкспрессии *S100* и *CD20* в клетках первичной *MelCher5k/BRAF⁺* в группе контроля без вемурафениба (а) и в группе рецидива меланомы после применения вемурафениба (б): слева — изотипический контроль; справа — экспрессия *S100* и *CD20*

Fig. 3. Levels of *S100* expression and co-expression of *S100* and *CD20* in the primary melanoma *MelCher5k/BRAF⁺* cells of control group (а) and relapse in the group of melanoma recurrence after the use of vemurafenib (б): left — isotypic control; right — *S100* and *CD20* expression

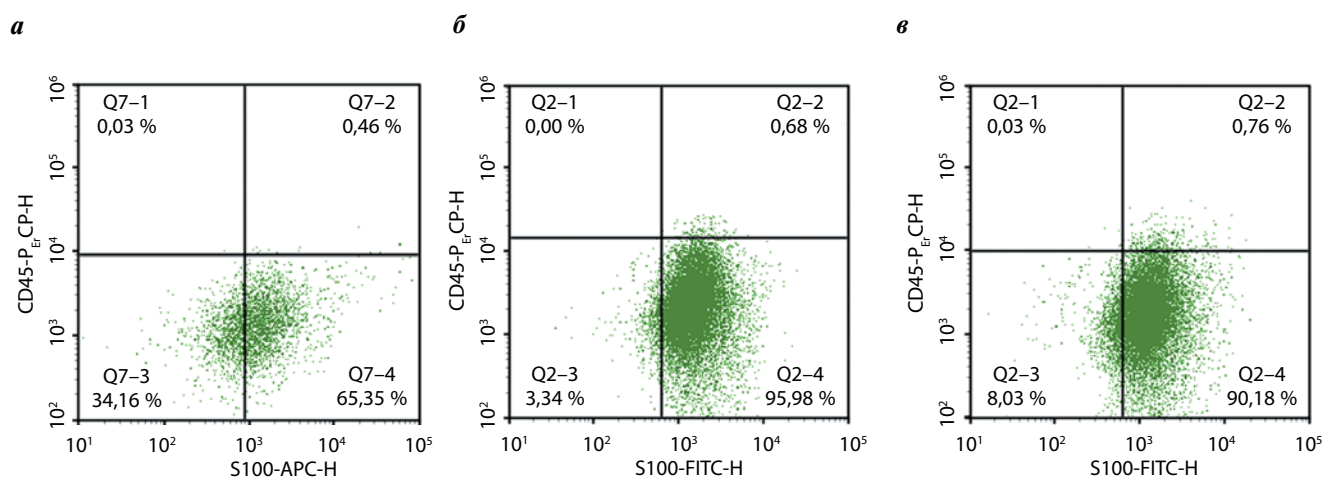


Рис. 4. Экспрессия CD45 в клетках подкожных ксенографтов MelCher5k/*BRAF*⁺: а — на 41-е сутки роста исходной опухоли; б — в группе контроля; в — в группе рецидива меланомы после терапии вемурафенибом

Fig. 4. CD45 expression in the cells of subcutaneous xenografts MelCher5k/*BRAF*⁺: а — on day 41 of growth of the initial tumor; б — in the control group; в — in the group of melanoma recurrence after vemurafenib therapy

ксенографт, сформированный клетками MelCher5k/*BRAF*⁺, высокочувствителен к действию вемурафениба, который ингибирует активную форму киназы B-Raf, селективно подавляя пролиферацию клеток с мутантной формой фермента. Так, в результате двухнедельного лечения вемурафенибом через неделю после его окончания объем опухоли значительно уменьшился и составил 4 % ее объема до терапии, и подавление ее роста наблюдалось до 34-х суток эксперимента. Однако отмена препарата приводит к постепенному накоплению мутантной формы киназы B-Raf в оставшихся жизнеспособных клетках опухоли и возникновению рецидива. Мы продемонстрировали, что эта ситуация, наблюдаемая у пациентов с мМК при лечении вемурафенибом, воспроизводится в нашей модельной системе.

Таким образом, мы разработали адекватную модель для анализа возможности дальнейшего лечения рецидивов мМК, возникших после эффективного применения вемурафениба.

Анализ наличия субклона клеток меланомы, экспрессирующей CD20, хорошо согласуется с современными данными молекулярно-генетических исследований о поликлональности мМК [6]. В частности, ключевые генетические факторы меланомы часто распределены гетерогенно внутри опухолей, что приводит к генетическому разнообразию сосуществующих в опухоли многочисленных субклонов с разными скоростями роста, метастатическим потенциалом и ответами на лечение. Наличие стволовых клеток меланомы является одной из потенциальных причин инвазии и метастазирования [4, 16–18]. Следует отметить, что субпопуляция опухолевых меланоцитов, экспрессирующих CD20, играет большую роль в патогенезе мМК, несмотря на их относительно низкое содержание (≤ 2 %). Так, в экспериментах с ксенографтами мела-

номы человека, полученными путем подкожной имплантации клеток биопсийного опухолевого образца, элиминация CD20⁺-клеток с помощью химерного рецептора антигена Т-клеток (chimeric antigen receptor of T-cells, CAR-T) приводила к регрессии опухоли [8, 19].

Результаты нашего исследования продемонстрировали увеличение доли клеток, экспрессирующих CD20⁺, после применения вемурафениба, что согласуется с данными, полученными Н. Tsao и соавт. в ходе эксперимента *in vitro* по увеличению доли субклона клеток, экспрессирующих CD20, среди опухолевых меланоцитов, оказавшихся резистентными к обработке ингибитором B-Raf [7]. По мнению авторов, эти данные позволяют использовать ритуксимаб — антитело к CD20 — в комбинированной терапии мМК для продления ремиссии. Следует отметить, что повышение доли опухолевых меланоцитов, экспрессирующих CD20, наблюдалось после эффективной терапии не только вемурафенибом, но и другими антимеланомными препаратами, в частности дабрафенибом, и даже после использования экзосом с адриамицином или вариантов генетически модифицированной Т-клеточной терапии [20, 21].

В ходе пилотного клинического исследования эффективности ритуксимаба, применявшегося в терапии 7 пациентов с мМК после хирургического, лучевого и химиотерапевтического лечения, получены предварительные данные, свидетельствующие о перспективности такой терапии. При этом авторы особо подчеркивают хорошую переносимость данного препарата больными мМК. Эффективное применение ритуксимаба продемонстрировано и в описании клинического случая терапии мМК, в котором представлены данные о регрессии большинства метастазов в ходе лечения. При этом наблюдались исчезновение меланомных клеток, экспрессирующих CD20, и снижение

уровня маркера меланоцитов S100 в плазме крови до почти физиологического уровня [6].

Таким образом, мы разработали адекватную модельную систему для изучения возможности использования ингибиторов В-Raf, таких как вемурафениб или дабрафениб, в комбинации с адьювантом ритуксимабом. Данные предклинических экспериментальных и пилотных клинических исследований также свидетельствуют о перспективности применения такого подхода к терапии мМК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном исследовании разработана модель *ex vivo* мМК с мутацией в гене *BRAF*, охарактеризована динамика роста опухоли при терапии вемурафенибом и без нее и оценена представленность опухолевого субклона клеток, экспрессирующих антиген CD20. Полученные данные свидетельствуют о возможности применения данной модели для определения перспектив использования комбинированной терапии мМК таргетными препаратами вемурафенибом и ритуксимабом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Marti J.L.G., Hyder T., Nasrazadani A. et al. The evolving landscape of HER2-directed breast cancer therapy. *Curr Treat Options Oncol* 2020;21(10):82. DOI: 10.1007/s11864-020-00780-6
- Tarantino P., Viale G., Press M.F. et al. ESMO expert consensus statements (ECS) on the definition, diagnosis, and management of HER2-low breast cancer. *Ann Oncol* 2023;34(8):645–59. DOI: 10.1016/j.annonc.2023.05.008
- Ferguson K.M. Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annu Rev Biophys* 2008;37:353–73. DOI: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125829
- Li X., Zhao L., Chen C. et al. Can EGFR be a therapeutic target in breast cancer? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2022;1877(5):188789. DOI: 10.1016/j.bbcan.2022.188789
- Raghav K.P.S., Moasser M.M. Molecular pathways and mechanisms of HER2 in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2023;29(13):2351–61. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-0283
- Lyu H., Han A., Polsdof E. et al. Understanding the biology of HER3 receptor as a therapeutic target in human cancer. *Acta Pharm Sin B* 2018;8(4):503–10. DOI: 10.1016/j.apsb.2018.05.010
- Kilroy M.K., Park S., Feroz W. et al. HER3 alterations in cancer and potential clinical implications. *Cancers (Basel)* 2022;14(24):6174. DOI: 10.3390/cancers14246174
- Papa F., Grinda T., Rassy E. et al. Long road towards effective HER3 targeting in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2024;129:102786. DOI: 10.1016/j.ctrv.2024.102786
- Uliano J., Corvaja C., Curigliano G., Tarantino P. Targeting HER3 for cancer treatment: a new horizon for old target. *ESMO Open* 2023;8(1):100790. DOI: 10.1016/j.esmoop.2023.100790
- Hoxhaj G., Manning B.D. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 2020;20(2):74–88. DOI: 10.1038/s41568-019-0216-7
- Mishra R., Alanazi S., Yuan L. et al. Activating HER3 mutations in breast cancer. *Oncotarget* 2018;9(45):27773–88. DOI: 10.18632/oncotarget.25576
- Murugan A.K., Grieco M., Tsuchida N. RAS mutations in human cancers: roles in precision medicine. *Semin Cancer Biol* 2019;59:23–35. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.06.007
- Kamian S., Ashoori H., Vahidian F., Davoudi S. The relevance of common *K-RAS* gene mutations and *K-RAS* mRNA expression with clinicopathological findings and survival in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2023;24(3):909–14. DOI: 10.31557/APJCP.2023.24.3.909
- Banys-Paluchowski M., Milde-Langosch K., Fehm T. et al. Clinical relevance of H-RAS, K-RAS, and N-RAS mRNA expression in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2020;179(2):403–14. DOI: 10.1007/s10549-019-05474-8
- Hossain M.A. Targeting the RAS upstream and downstream signaling pathway for cancer treatment. *Eur J Pharmacol* 2024;979:176727. DOI: 10.1016/j.ejphar.2024.176727
- Wang L., Lu Q., Jiang K. et al. BRAF V600E mutation in triple-negative breast cancer: a case report and literature review. *Oncol Res Treat* 2022;45(1–2):54–61. DOI: 10.1159/000520453
- Khojasteh Poor F., Keivan M., Ramazii M. et al. Mini review: the FDA-approved prescription drugs that target the MAPK signaling pathway in women with breast cancer. *Breast Dis* 2021;40(2):51–62. DOI: 10.3233/BD-201063
- Miricescu D., Totan A., Stancescu-Spinu I.I. et al. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: from molecular landscape to clinical aspects. *Int J Mol Sci* 2020;22(1):173. DOI: 10.3390/ijms22010173
- Hinz N., Jücker M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review. *Cell Commun Signal* 2019;17(1):154. DOI: 10.1186/s12964-019-0450-3
- Nunnery S.E., Mayer I.A. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in hormone-positive breast cancer. *Drugs* 2020;80(16):1685–97. DOI: 10.1007/s40265-020-01394-w
- Shen L.S., Jin X.Y., Wang X.M. et al. Advances in endocrine and targeted therapy for hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer. *Chin Med J* 2020;133:1099–108. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000745
- Mosele F., Stefanovska B., Lusque A. et al. Outcome and molecular landscape of patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2020;31(3):377–86. DOI: 10.1016/j.annonc.2019.11.006
- Ertay A., Liu H., Liu D. et al. WDHD1 is essential for the survival of PTEN-inactive triple-negative breast cancer. *Cell Death Dis* 2020;11(11):1001. DOI: 10.1038/s41419-020-03210-5
- Hanker A.B., Sudhan D.R., Arteaga C.L. Overcoming endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 2020;37(4):496–513. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.03.009
- Endicott S.J., Ziemba Z.J., Beckmann L.J. et al. Inhibition of class I PI3K enhances chaperone-mediated autophagy. *J Cell Biol* 2020;219(12):202001031. DOI: 10.1083/jcb.202001031
- Rugo H.S., Raskina K., Schrock A.B. et al. Biology and targetability of the extended spectrum of PIK3CA mutations detected in breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2023;29(6):1056–67. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-2115
- Riobo-Del Galdo N.A., Montero Á.L., Wertheimer E.V. Role of Hedgehog signaling in breast cancer: pathogenesis and therapeutics. *Cells* 2019;8(4):375. DOI: 10.3390/cells8040375
- Habib J.G., O'Shaughnessy J.A. The hedgehog pathway in triple-negative breast cancer. *Cancer Med* 2016;5(10):2989–3006. DOI: 10.1002/cam4.833

29. Patel D.K., Kesharwani R., Verma A. et al. Scope of Wnt signaling in the precise diagnosis and treatment of breast cancer. *Drug Discov Today* 2023;28(7):103597. DOI: 10.1016/j.drudis.2023.103597
30. Xu X., Zhang M., Xu F., Jiang S. Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities. *Mol Cancer* 2020;19(1):165. DOI: 10.1186/s12943-020-01276-5
31. Harbeck N., Penault-Llorca F., Cortes J. et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2019;5(1):66. DOI: 10.1038/s41572-019-0111-2
32. Theodosiou A., Arhondakis S., Baumann M., Kossida S. Evolutionary scenarios of Notch proteins. *Mol Biol Evol* 2009;26(7):1631–40. DOI: 10.1093/molbev/msp075
33. Krishna B.M., Jana S., Singhal J. et al. Notch signaling in breast cancer: from pathway analysis to therapy. *Cancer Lett* 2019;461:123–31. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.07.012
34. Huang P., Chen A., He W. et al. BMP-2 induces EMT and breast cancer stemness through Rb and CD44. *Cell Death Discov* 2017;3:17039. DOI: 10.1038/cddiscovery.2017.39
35. Nilendu P., Kumar A., Kumar A. et al. Breast cancer stem cells as last soldiers eluding therapeutic burn: a hard nut to crack. *Int J Cancer* 2018;142(1):7–17. DOI: 10.1002/ijc.30898

Вклад авторов

И.Н. Михайлова, Е.М. Трещалина: разработка концепции исследования, сбор данных, анализ и интерпретация результатов, написание текста статьи;

С.Ш. Каршиева: разработка дизайна исследования, постановка опыта, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи;

Д.А. Хоченков: интерпретация данных, написание текста статьи, подготовка иллюстративного материала;

Н.В. Андропова, И.Ж. Шубина: интерпретация данных, написание текста статьи;

М.В. Киселевский: разработка дизайна исследования, анализ и интерпретация данных.

Authors' contributions

I.N. Mikhaylova, H.M. Treshalina: development of the research concept, data collection, analysis and interpretation of the results, article writing;

S.S. Karshieva: developing a research design, setting up an experience, analyzing and interpreting data, article writing;

D.A. Khochenkov: data interpretation, article writing, preparation of illustrative material;

N.V. Andronova, I.Zh. Shubina: interpretation of data, article writing;

M.V. Kiselevskiy: research design development, data analysis and interpretation.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.Н. Михайлова / I.N. Mikhaylova: <https://orcid.org/0000-0002-7659-6045>

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

С.Ш. Каршиева / S.Sh. Karshieva: <https://orcid.org/0000-0003-2469-2315>

Д.А. Хоченков / D.A. Khochenkov: <https://orcid.org/0000-0002-5694-3492>

И.Ж. Шубина / I.Zh. Shubina: <https://orcid.org/0000-0002-9374-3158>

М.В. Киселевский / M.V. Kiselevskiy: <https://orcid.org/0000-0002-0132-167X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.

Соблюдение правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (протокол № Act708n от 23.08.2010).

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (protocol No. Act708n dated 08.23.2010).

The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Research and Other Scientific Purposes.

Статья поступила: 05.09.2024. **Принята к публикации:** 11.03.2025. **Опубликована онлайн:** 23.06.2025.

Article submitted: 05.09.2024. **Accepted for publication:** 11.03.2025. **Published online:** 23.06.2025.