

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

ОБОРотова Марина Вячеславовна

**ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СТВОЛОВОЙ
КЛЕТКОЙ ОПУХОЛИ НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ
МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА**

14.01.12 онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Заира Григорьевна Кадагидзе

кандидат фармацевтических наук

Мария Анатольевна Барышникова

МОСКВА – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1. Концепция стволовой клетки опухоли	8
1.2. Ниша стволовой клетки опухоли.....	13
1.3. Экспрессия маркеров стволовых клеток опухоли при различных злокачественных новообразованиях	15
1.4. Молекулярные детерминанты стволовой клетки меланомы	20
1.5. Как стволовая клетка меланомы уходит от иммунного надзора	28
1.6. Заключение	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	32
2.1. Материалы.....	32
2.1.1. Клеточные линии.....	32
2.1.2. Реактивы.....	32
2.1.3. Оборудование	34
2.2. Культивирование клеточных линий меланомы человека	35
2.3. Прямая реакция иммунофлуоресценции	35
2.4. Непрямая реакция иммунофлуоресценции	35
2.5. Метод проточной цитометрии	36
2.6. Иммуноцитохимическое исследование	36
2.7. Работа с архивными данными. Характеристика пациентов.	37
Получение клеточной линии mel Ibr EEMC и mel Cher EE.....	47
2.8. Статистический анализ.....	48
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	50
3.1. Экспрессия маркеров, ассоциированных со стволовыми клетками опухоли на клеточных линиях меланомы человека.....	51
3.2. Выделение из клеточных линий меланомы клонов клеток с высокой экспрессией маркеров СКО, их характеристика	90
3.2.1 Иммунологический фенотип клеточной линии mel Ibr EEMC	90
3.3 Иммунологический фенотип клеточной линии mel Cher EE	94
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ	97
ВЫВОДЫ	104
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	107

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Меланома является наиболее агрессивной злокачественной опухолью кожи. Данная патология, в целом, хорошо поддается хирургическому лечению при обнаружении на ранней стадии, однако метастатическая меланома является наиболее трудно излечиваемой формой злокачественных новообразований (ЗНО). Фундаментальной проблемой в исследовании ЗНО продолжает оставаться идентификация клеток, способных инициировать и поддерживать рост опухоли. До недавнего времени предполагалось, что все клетки меланомы обладают одинаковой способностью к образованию опухоли и формированию метастазов. Сегодня достоверно показано, что такими свойствами обладает немногочисленная популяция клеток, дающая начало всем клеткам, присутствующим в опухоли, в том числе инициирующим неоангиогенез и образование стромы [51,52,59,73] Эти клетки, по-видимому, появляются из нормальных стволовых клеток (СК) в результате злокачественной трансформации СК или их прямых потомков. Возникновение мутаций в СК, их наследование клетками-родоначальницами, а также неадекватный ответ СК на внешние сигналы может приводить к превращению здоровых СК в опухолевые. И только такие клетки являются предшественниками всех клеток определенной опухоли. Этот тип клеток получил название "стволовые клетки опухоли" (СКО). Концепция СКО сводится к следующему: СКО – это специфическая опухолевая клетка – долгоживущая и медленно пролиферирующая, способная при трансплантации иммунодефицитным животным индуцировать рост опухоли, идентичной исходной, в то время как другие короткоживущие и более дифференцированные клетки опухоли этой способностью не обладают.

Сегодня уже достоверно известно, что свойствами СКО обладают около 1 % клеток опухоли. Однако последние годы появляются публикации о стволовой клетке меланомы (СКМ), в которых показано, что опухоль инициировали 10 или даже 25% клеток опухоли. Есть основания полагать, что СКО, как и нормальные

СК, обладают гораздо более совершенным механизмом репарации ДНК и намного эффективнее и быстрее восстанавливают свой наследственный материал.

Поскольку меланома является агрессивной злокачественной опухолью, классические подходы, такие как химиотерапия и лучевая терапия, дают менее выраженные эффекты, чем в случае других опухолей кожи. Одной из причин выживаемости клеток меланомы в условиях цитотоксической терапии может быть более высокое, чем при других нозологиях, содержание СК в общей популяции клеток. По всей видимости, эта особенность и объясняет резистентность меланомы к лекарственному лечению. Становится понятным, почему даже видимое уменьшение размеров опухоли при лечении, как правило, не приводит к значительному увеличению продолжительности жизни пациента.

Легко поддающаяся лечению на самых ранних стадиях заболевания, меланома становится резистентной к противоопухолевой терапии при прогрессировании роста. Так, 5-летняя выживаемость отмечается в 97,9 % случаев, если толщина опухоли <0,76 см, и снижается до 57,5%, когда толщина опухоли >3 см. И хотя корреляция между толщиной опухоли и прогнозом течения болезни достаточно хорошо охарактеризована, фенотипическая характеристика клеток меланомы, участвующих в инициации опухоли, инвазии и формировании метастазов еще только начинается.

Цель работы:

Изучение иммунологического фенотипа и экспрессии маркеров стволовых клеток меланомы на клеточных линиях метастатической меланомы человека, полученных из опухолевого материала больных.

Задачи исследования

- 1) Определить экспрессию маркеров CD24, CD44, CD90, CD114, CD117, CD133, CD271, ABCB5, ассоциированных со стволовыми опухолевыми клетками, в клеточных линиях метастатической меланомы.
- 2) Охарактеризовать спектр иммунологических маркеров, характеризующих фенотип 19 клеточных линий метастатической меланомы человека.

3) Выявить закономерность экспрессии маркеров, ассоциированных со стволовой клеткой опухоли, в зависимости от степени дифференцировки клеточных линий.

4) Получить дочерние клеточные линии с максимальным процентом экспрессии маркеров, ассоциированных со стволовой клеткой меланомы.

Научная новизна

Впервые изучена экспрессия маркеров, ассоциированных со стволовой клеткой опухоли на клеточных линиях метастатической меланомы, выведенных из опухолевого материала больных диссеминированной меланомой. Показаны корреляции между ранее полученным лечением и частотой экспрессии маркеров стволовой клетки меланомы. Выделены маркеры стволовой клетки меланомы, характерные только для клеточных линий больных, ранее получавших противоопухолевую химиотерапию. Впервые показано, что клеточные линии метастатической меланомы, полученные в ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России, гетерогенны по своему составу и содержат популяции клеток с мономорфной экспрессией маркеров стволовых опухолевых клеток – CD133, CD90, ABCB5, CD117 (c-kit).

Из клеточной линии меланомы при культивировании в среде, адаптированной для поддержания роста клеток-предшественников впервые получены клоны, характеризующиеся большим количеством клеток, экспрессирующих маркеры, ассоциированные со СК – CD133, SOX-2, Oct-4, нестин, CD117.

Иммунофенотипически установлены отличия клеточных линий меланомы больных, получавших комплексное лечение (хирургическое, химио- и/или иммунотерапию, лучевую терапию) и больных, не получавших тот или иной вариант лечения.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные знания об экспрессии антигенов, ассоциированных со стволовой клеткой опухоли, на клеточных линиях метастатической меланомы человека могут быть использованы для диагностически значимого исследования СКО с целью поиска способов воздействия (торможение функциональной активности клеток, уничтожение СКО в клеточной популяции) на них при таргентной терапии меланомы, что приведет к увеличению выживаемости больных, а также сможет значительно увеличить роль иммунотерапии, биотерапии перед химиотерапевтическим и хирургическим лечением.

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследования составили труды российских и зарубежных ученых в области исследования стволовых клеток опухоли.

При проведении исследования использованы:

- работа с архивным материалом;
- методы работы с клеточными культурами;
- реакция иммунофлуоресценции
- проточная цитофлуориметрия;
- иммуноцитохимия;
- статистические методы анализа и обработки результатов, полученных

в ходе экспериментальной работы.

Степень достоверности результатов

При проведении экспериментальной работы использовано сертифицированное современное оборудование, методами статистической обработки установлена воспроизводимость результатов исследований, что позволяет считать их достоверными.

Положения, выносимые на защиту

- Клеточные линии метастатической меланомы обладают гетерогенной экспрессией маркеров, ассоциированных с стволовой клеткой опухоли.
- Низкодифференцированные клеточные линии из метастазов пациентов, ранее получавших противоопухолевую терапию, экспрессируют больше маркеров, ассоциированных со стволовой клеткой опухоли.
- Из клеточных линий метастатической меланомы при культивировании в среде Methocult-GI H4434 возможно получение дочерних клеточных линий, обогащенных клетками с экспрессией маркеров клеток-предшественников CD133 (от 50% до 100%), CD117 (40%), Oct-4, SOX-2, Nestin, ABCB5, и с утратой экспрессии антигена CD271.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Концепция стволовой клетки опухоли

В начале 1990-х гг. были предложены две модели, объясняющие разнородный состав опухоли [52]. Согласно первой модели, любая клетка злокачественной опухоли может инициировать новую опухоль или участвовать в формировании метастазов, а функциональная гетерогенность ассоциируется со случайными воздействиями: внутренними (связанные с транскрипционной активностью генома) или внешними (микроокружение, клетки, иммунная система организма). Согласно второй модели, опухоли формируются лишь из специальных опухолевых клеток. Эти клетки, по-видимому, появляются из нормальных стволовых клеток (СК) в результате злокачественной трансформации СК или их прямых потомков. Возникновение мутаций в СК, их наследование клетками-родоначальницами, а также неадекватный ответ СК на внешние сигналы может приводить к превращению здоровых СК в опухолевые. И только такие клетки являются предшественниками всех клеток определенной опухоли. Этот тип клеток получил название "стволовые клетки опухоли" (СКО). Постепенно стало ясно, что многие вопросы, на которые нет ответа в настоящее время, могут найти объяснение именно в рамках этой модели. Например, почему некоторые опухолевые клетки в одной и той же опухоли агрессивнее остальных? Почему некоторые клетки не восприимчивы ни к облучению, ни к химиотерапии? Концепция СКО сводится к следующему: СКО – это специфическая опухолевая клетка – долгоживущая и медленно пролиферирующая, способная при трансплантации иммунодефицитным животным индуцировать рост опухоли, идентичной исходной, в то время как другие короткоживущие и более дифференцированные клетки опухоли этой способностью не обладают.

Как известно, в организме непрерывно идёт процесс отмирания клеток и их замещения новыми. В одних видах тканей продолжительность жизни клеток исчисляется месяцами, в других – днями. Источником новых клеток самых различных тканей служат СК. Биологическими свойствами СК являются: 1) СК

образуют самоподдерживающуюся популяцию. Это означает, что при делении одни их потомки остаются стволовыми, а другие дифференцируются; 2) эти клетки могут неограниченно делиться и давать любое число поколений потомков, по крайней мере, в течение жизни данного организма; 3) потомки таких клеток могут дифференцироваться в разных направлениях.

В настоящее время различают три типа СК: эмбриональный, тканеспецифический и СКО [85, 117, 80, 39, 59]. Уникальной особенностью всех типов СК является самоподдержание, вместе с тем они сильно различаются по своей способности давать разные типы клеток-потомков. Эмбриональные СК, их также называют тотипотентными, обнаруживаются на самом раннем этапе эмбриогенеза во внутренней клеточной массе эмбриобласта. Эмбриобласт состоит из нескольких сотен клеток, способных образовывать клетки любого из трех типов эмбриональных зародышевых слоев — эктодермы, мезодермы и эндодермы. Начало, собственно, телу плода дает эмбриобласт. Эмбриональная СК стоит на вершине иерархии, производя клетки всех типов, которые образуют конкретный организм. Региональные или унипотентные СК представлены в органах небольшой фракцией и характеризуются способностью к

- самообновлению, то есть воспроизведению новых СК с такой же способностью к пролиферации, размножению и дифференцировке, как и исходные СК, что и обеспечивает сохранение пула СК;

- асимметричному делению, приводящему к воспроизведению СК и образованию коммитированных к дифференцировке в нужном направлении дочерних клеток с ограниченной продолжительностью существования;

- регулированию соотношения процессов обновления СК и образованием более дифференцированных клеток-потомков, восполняющих ткань в соответствии с конкретной ситуацией в ткани, например, в случае ее повреждения.

Строение и клеточная масса различных органов в норме поддерживается присутствием тканеспецифичных СК, которые обеспечивают процессы постепенного обновления тканей и их регенерацию в случае повреждения.

Следует отметить, что сегодня СК рассматривается как клетка, обладающая гораздо большей пластичностью, чем предполагалось ранее. Прежде всего, это положение относится к СК костного мозга. Гемопоэтические СК костного мозга способны дифференцироваться не только в различные клетки крови, но и в некоторые другие типы клеток – нервные клетки, клетки печени, поджелудочной железы, миокарда, эпителия, кожи, и др.

Стволовая клетка опухоли относится к третьему типу стволовых клеток, именно такая клетка дает рост опухолевому клону. К этому выводу нас привели исследования самых последних лет. Выяснилось, что

- в каждой опухоли присутствует лишь очень небольшая доля клеток, способных индуцировать опухоль (одна из 10^6 клеток);

- СКО каждой опухоли несет на своей поверхности определенные маркеры, отличающие её от основной опухолевой массы, характерные только для этого типа опухоли, что позволяет воспроизводимо выделять их из общей массы опухолевых клеток;

- опухоли, развивающиеся из СКО, содержат смешанную популяцию опухоль-иницирующих и не инициирующих клеток, соответствующую гетерогенному клеточному составу исходной опухоли.

Сегодня СКО оказались в центре внимания, так как появилось предположение, что буквально все проблемы в клинической онкологии, начиная от возникновения множественной лекарственной устойчивости до появления рецидивов спустя десятилетия после кажущегося исцеления, связаны именно с этими клетками.

Что это за клетки и откуда они берутся? Анализ литературы последних 10 лет указывает на три возможных пути появления СКО [107]. СКО образуется из тканеспецифичной СК в результате накопления мутаций. Второй вариант допускает, что в прогениторной, или даже в дифференцированной клетке могут возникнуть онкогенные мутации, в результате которых клетка вновь приобретает способность к самообновлению. Третий механизм связан с возможностью возникновения СКО в результате слияния СК с дифференцированной клеткой, с

образованием гибридных клеток со свойствами СКО или способных становиться СКО в дальнейшем. Последняя версия была выдвинута совсем недавно. Понятно, что мутации с одинаковой вероятностью могут возникнуть в стволовой, дифференцированной или гибридной клетке.

Далее объективно встает вопрос, какие механизмы и какие особенности СКО позволяют им выживать, оставаясь невосприимчивыми к химиотерапии. Современная цитотоксическая химиотерапия направлена на пролиферирующую клетку, ДНК которой открыта и легко уязвима, СКО же делится крайне редко [68]. В СКО, также как и нормальной соматической СК, наблюдается конститутивная активация экспрессии сурвивина – анти-апоптотического белка, предохраняющего клетку от апоптоза [58]. Было показано также, что в СКО гиперактивирована система АВС-транспортеров, основная задача которых сводится к быстрому выведению из клетки различных опасных для неё веществ [22]. Данное явление может частично объяснить резистентность таких клеток к классической химиотерапии, так как препарат просто не успевает подействовать. Есть основания полагать, что СКО – как и нормальные СК, – обладают гораздо более совершенным механизмом репарации ДНК и намного эффективнее и быстрее восстанавливают свой наследственный материал [112]. Для СКО характерен также высокий уровень экспрессии антиоксидантных ферментов [123]. И когда мы говорим о бессмертии опухолевых клеток, то имеем в виду бессмертие именно СКО, потому что все другие клетки опухоли не проявляют столь уникальных свойств. Подобные закономерности выявлены при лечении многих злокачественных новообразований. Становится понятным, почему даже видимое уменьшение размеров опухоли при лечении, как правило, не приводит к значительному увеличению продолжительности жизни пациента.

Концепция СКО объясняет также почему стволовая клетка рака молочной железы ни при каких обстоятельствах не станет стволовой клеткой рака почки. Стволовая клетка рака простаты не станет стволовой клеткой рака легкого и т.д., и наоборот. Для опухоли характерна прогрессия с потерей степени

дифференцировки, но не переход одного вида злокачественного новообразования в другой.

Глубокий интерес вызывает и другая особенность СКО. Известно, что разные виды рака имеют разную вероятность возникновения: рак молочной железы по статистике встречается в сотни раз чаще, чем опухоли системы кроветворения. Вплоть до самых последних лет подобное поведение опухолей объясняли влиянием образа жизни, экологии или же плохой наследственностью. То есть рак лёгких может чаще возникать из-за курения или, например, из-за того, что связанные с ним генетические аномалии лучше закрепляются в поколениях, чем в случае гемобластозов. Такая аргументация не объясняет до конца, почему в разных тканях злокачественные опухоли случаются с разной вероятностью. Исследователи из Университета Джона Хопкинса (США) пришли к выводу, что, по-видимому, главный фактор, определяющий вероятность возникновения рака — это число делений тканевых СК [119]. Так, к двум известным факторам риска онкогенеза (компонентам внешней среды и врожденным мутациям) был добавлен третий — ошибки, возникающие в результате репликации генома СК. Важно отметить, что он может быть главным и при существенном влиянии первых двух факторов риска. Большинство обычных, дифференцированных клеток, составляющих основную массу ткани или органа, живут не слишком долго. Поэтому, даже если они накопят много потенциально онкогенных мутаций, клетка погибнет раньше, чем успеет спровоцировать рак. СК, напротив, живут долго, много раз делятся и могут дать начало опухоли. Ткани организма постоянно обновляются благодаря резерву собственных СК: у крови они одни, у кишечного эпителия — другие, у кожи — третьи и т.д. Скорость деления у них отличается, отличается и число делений, которые СК претерпевает за свою жизнь. Чем больше клеточных делений осуществилось в популяции СК, тем больше вероятность того, что онкогенная мутация сработает в ее потомках. Так, самые редкие опухоли возникают в костях головы, таза и предплечья — и действительно, СК здесь самые неактивные. Чаще всего они делятся в базальном слое эпителия (за счёт базального слоя происходит обновление кожи), а также в толстой и

прямой кишке – и опухоли в них относятся к одним из самых распространённых. И, как пишут Cristian Tomaset и Bert Vogelstein [118], 65% отличий между разными тканями относительно вероятности рака связаны как раз с тем, что в одних тканях СК делятся чаще, чем в других, в оставшиеся 35% входит наследственность (наследственность практически не влияет на 2/3 форм рака), и конечно, же плохая экология и нездоровый образ жизни. В 2006 году American Association for Cancer Research (AACR) ввело определение СКО как клетки, способной к самообновлению и поддержанию гетерогенной популяции в опухоли («*Cancer stem cell is a cell within a tumor that possesses the capacity of self-renew and to cause the heterogenous lineages of cancer cells that comprise the tumor*») [47].

1.2. Ниша стволовой клетки опухоли

Для нормального функционирования СК абсолютно необходимы сигналы из ближайшего окружения, в первую очередь для определения идентичности клетки и ее судьбы. *In vivo* СК может оставаться стволовой только в соответствующем микроокружении (клетки-соседи, внеклеточный матрикс, лимфа, кровь) или, что мы называем нишей - совокупность клеточных и молекулярных событий в месте локализации СК [102]. СК находятся в полипотентном состоянии длительное время, благодаря нишам. Ниши СК создают микроокружение и контролируют локальные процессы пролиферации и дифференцировки СК путем интеграции сигналов, поступающих от соседних клеток стромы, от организма и внешней среды. Ниши создают систему сигналов и направляют специфичность дифференцировки СК в участке повреждения или естественной убыли клеток в каком-либо участке. Именно сюда мигрируют СК, здесь они активируются, пролиферируют и дифференцируются в клетки данной ткани. За редким исключением СК не покидают своей ниши и иногда бывают физически связаны с ней при участии молекул адгезии. СК, выделенные из самых разных источников, в условиях культивирования *in vitro* легко пролиферируют и дифференцируются. Складывается впечатление, что именно так они и

запрограммированы, и только внешние сигналы, поступающие от ниши, держат их в «дремлющем» состоянии. По крайней мере, не исключается возможность, что СКО может возникать из тканевых СК, в случае если ниша за ними «не уследила» [69]. Имея в виду ту роль, которую играет микроокружение для обычных СК в поддержании их в недифференцированном состоянии и в активации в ответ на поступление сигнала о необходимости появления новых клеток, предполагается, что подобного рода локальные внешние сигналы распоряжаются и судьбой СКО [97]. Ведь именно общие свойства СК и ряда опухолевых клеток позволили сформулировать концепцию СКО. Подтверждением контроля нишей судьбы СКО служат следующие эксперименты. Когда СКО помещали в новую нишу, они не всегда инициировали опухоль. И напротив, если нормальные СК трансплантировать в предварительно облученную ткань, опухоль будет развиваться [60]. Кроме того, установлено, что если СКО удерживались в состоянии покоя с помощью окружения, образующего нишу, а затем эта ниша тем или иным образом увеличивалась в размерах, численность СКО начинала возрастать [69]. СКО будет находиться под строгим контролем, осуществляемым нишей, до тех пор, пока не произойдут изменения в самой нише или возникнут мутации в СКО, вследствие которых утрачивается контроль над ними. Такие клетки не могут более адаптироваться к нише и покидают ее, покидают для формирования отдаленных метастазов [81]. Становится понятным, что метастаз инициирует не СКО - «родоначальница», а ее мутированный аналог [92]. Только ничтожно малая часть из миллионов клеток, покидающих первичную опухоль, реализуется в виде отдаленных метастазов. Абсолютно большая часть клеток погибает в системном кровотоке, а многим так и не удается выжить во враждебном микроокружении после экстравазации. В 2009 С. Klein была предложена гипотеза параллельной прогрессии, когда процесс метастазирования начинается на самых ранних стадиях возникновения опухоли, а не в результате длительного накопления онкогенных мутаций отдельными клеточными клонами в первичной опухоли [72]. Было показано, что злокачественная эпителиальная клетка сразу после фазы инициации опухоли способна активировать «молчащие»

эмбриональные программы эпителиально-мезенхимального перехода, приобретать веретенообразную форму, дающая ей преимущество в подвижности, повышать инвазивный потенциал и способность разрушать базальную мембрану, проникать в системный кровоток, достигать пре-метастатической ниши в тканях отдаленного органа и формировать метастаз. Концепция ранней диссеминации позволяет объяснить наличие метастазов опухоли без выявленной первичной локализации и отдаленных метастазов при ранних клинических стадиях рака (T1-2N0M1).

1.3. Экспрессия маркеров стволовых клеток опухоли при различных злокачественных новообразованиях

Первоначально СКО были обнаружены при остром миелоидном лейкозе и хроническом миелоидном лейкозе [35,4]. Эти клетки характеризовались экспрессией антигена CD34. В последующем были охарактеризованы маркеры СКО и других злокачественных новообразований.

Маркерами СКО *рака легкого* являются антигены CD133, CD44 и ALDH [116]. В образцах немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легкого Eramo A. и соавт. обнаружили небольшую популяцию CD133+ положительных опухолевых клеток. Эти клетки формировали сфероиды при культивировании *in vitro*, инициировали формирование опухоли при введении иммунодефицитным мышам и были устойчивы к химиотерапии, что указывало на фенотип стволовой клетки опухоли [53]. Длительная химиотерапия может обогащать популяцию CD133+ клеток при раке легкого [124]. В других исследованиях продемонстрировано, что в CD133-положительных клетках повышается экспрессия транскрипционного фактора OCT4 [45], а также при наличии CD133+клеток в опухолевой ткани усиливается ангиогенез [63].

В ряде исследований подтверждено прогностическое значение экспрессии CD133 при раке легкого [124,87,88,93]. Mazugaki и соавт. показали, что экспрессия CD133 у больных НМКРЛ коррелировала со стадиями заболевания и этот маркер рассматривался ими как независимый фактор плохого прогноза [88].

Однако, Salnikov и соавт. выявили, что экспрессия CD133 на опухолевых клетках указывает на резистентность к терапии, но не является прогностическим маркером выживаемости больных НМКРЛ [101].

В исследовании *in vitro* на клеточных линиях рака легкого Meng X. и соавт. обнаружили, что как CD133-положительные, так и CD133-отрицательные клетки были высоко туморогенны, резистентны к химиопрепаратам и способны к самоподдержанию [86]. Возможно, причиной этого являются различия в моноклональных антителах, которые выявляют различные гликозилированные эпитопы CD133-антигена. Или, что более вероятно, CD133-отрицательные клетки несли другие маркеры СКО.

CD44 – еще один маркер СКО при раке легкого. CD44 – поверхностный антиген, ответственный за взаимодействие опухолевых клеток друг с другом, с внеклеточным матриксом, а также за миграцию опухолевых клеток. Повышенная экспрессия антигена CD44 обнаружена на определенном этапе дифференцировки пневмоцитов, на активированных пневмоцитах II типа, при плоскоклеточной метаплазии и НМКРЛ. CD44 может играть роль в прогрессировании заболевания. Leung E.L. и соавт. показали, что субпопуляция CD44+ клеток НМКРЛ устойчива к цисплатину, способна образовывать сфероиды и инициировать опухоль в иммунодефицитных мышцах, что послужило основанием считать этот антиген маркером СКО. Кроме того, CD44+ клетки НМКРЛ экспрессировали плюрипотентные гены *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*. [79]. Анализ опухолевого материала больных НМКРЛ указывал на то, что появление этого антигена коррелировало с переходом опухоли в агрессивную фазу роста [95].

Третьим идентифицированным маркером СКО при раке легкого является ALDH. Анализ образцов опухолей от пациентов показал, что клетки НМКРЛ экспрессируют ALDH1A1 и ALDH3A1 [94]. Энзиматическая активность ALDH обнаружена также и МКРЛ [91]. Sullivan J.P. и соавт. показали, что субпопуляция клеток, экспрессирующих ALDH, имела повышенную туморогенность, клоногенность и зависимость от Notch сигнального пути способность к самовоспроизведению [114]. Аналогичные результаты были получены и Akutere

S. и соавт.: ALDH^{high} клетки формировали сфероиды и обладали высоким метастатическим потенциалом. В таких клетках была повышена экспрессия Notch1 и маркеров эпителиально-мезенхимального перехода [23]. В отличие от CD133 и CD44, ALDH используют в клинике для определения стадии заболевания и оценки прогноза рака легкого [114].

Для *глиомы* описаны маркеры СКО, к которым относятся CD133, CD171 CD44, CD15, интегрин- α 6 [38].

Основным маркером СКО при глиоме является антиген CD133 [31]. Количественный анализ CD133-положительных клеток методом ПЦР показал наличие низкого уровня этих клеток в глиомах, как в клеточных культурах, так и в материале, полученном от больных [67, 109, 110, 113]. В то же время определение иммуногистохимическим методом выявило во многих случаях более 25% клеток, положительных по CD133. Неоднородность экспрессии этого антигена, вероятно, связана с использованием разных моноклональных антител [32]. Экспрессия CD133 в злокачественных глиомах является достаточным и необходимым условием для инициации роста опухоли после цитотоксической терапии [126].

Другим маркером СКО глиомы считается CD171 (L-1CAM) – молекула адгезии нейральных клеток [28]. L-1CAM регулирует рост нейронов, выживание и миграцию в процессе развития ЦНС. Гиперэкспрессия данного маркера играет роль в инвазии не только при глиоме, но и при других опухолях, включая колоректальный рак, где L-1CAM имеет прогностическое значение [29]. Bao S. и соавт. было показано, что экспрессия CD171 необходима для поддержания роста CD133-положительных клеток глиомы и их миграции [28]. Уровень экспрессии L-1CAM в CD133+ клетках выше, чем в клетках, негативных по CD133. Однако CD171 не используют для идентификации или изоляции СКО.

К маркерам СКО при глиоме относят антиген CD44, который также экспрессирован на СКО рака молочной железы, поджелудочной железы, легкого, меланомы, простаты [26].

Некоторые исследователи относят к маркерам СКО при глиоме антиген CD15, известный также как SSEA-1 или LeX, в норме участвующий в фагоцитозе и хемотаксисе. Этот антиген обнаружили в CD133-отрицательной популяции СКО глиомы [113].

Интегрин- $\alpha 6$, компонент внеклеточного матрикса, коэкспрессируется на СКО глиомы с CD133 и нестином. Интегрин- $\alpha 6$ необходим СКО для взаимодействия с экспрессирующими ламинин эндотелиальными клетками и регулирует рост СКО [61].

Также в СКО глиомы гиперэкспрессируется ген с-Мус, белковый продукт с-Мус которого является транскрипционным фактором и необходим для поддержания пролиферативного потенциала как нормальных, так и опухолевых клеток. Недавно было показано, что нокаун этого гена в стволовой клетке глиомы приводит к снижению пролиферации СКО, остановке клеток в фазе G0/G1 и апоптозу. В нестволовых клетках глиомы блокада гена с-Мус не влияет на пролиферативный потенциал клетки. Интересно отметить, что снижение уровня экспрессии с-Мус сопровождалось потерей CD133-положительными клетками способностей образовывать сфероиды в культуре клеток и формировать опухоли в иммунодефицитных мышцах [122].

СКО глиомы химио- и радиорезистентны [5]. CD133-положительные клетки глиомы устойчивы к TRAIL (лиганду TNF- α -рецептора), тогда как CD133-отрицательные – чувствительны. СКО имеют низкий уровень каспазы-8. Реэкспрессия каспазы-8 делала СКО глиомы чувствительными к внешнему апоптозу, индуцируемому TRAIL [42].

За последнюю декаду были выделены и охарактеризованы маркеры СКО **рака яичника**. К ним относятся CD133, ALDH, CD44+/CD117+, CD44+/MydSS+, CD44+/CD24-. Исторически первым маркером СКО рака яичников был CD133. CD133-положительные клетки рака яичников способны к самоподдержанию и обладают повышенной туморогенностью при ксенотрансплантации иммунодефицитным мышам. Экспрессия CD133 в первичных опухолях оказалась выше, чем в нормальном яичнике и при доброкачественных поражениях яичника,

но ниже, чем в метастазах рака яичника. Также, CD133⁺ опухолевые клетки имеют большую пролиферативную и клоногенную активность [127].

При некоторых видах рака яичника была также обнаружена повышенная экспрессия CD117, рецептора стволового фактора роста, в сочетании с гиперэкспрессией CD44 и низким уровнем ADHL [46]. При эпителиальных раках яичника коэкспрессия CD44 и CD117 приводило к повышенной резистентности к фторурацилу, доксетакселу, цисплатину и карбоплатину. CD117-положительные клетки рака яичника были способны к самовоспроизведению, дифференцировке и генерировали опухоль в мышинной модели, что позволило идентифицировать CD117 как маркер стволовой клетки рака яичника.

Экспрессия CD44 коррелировала с низкой безрецидивной выживаемостью больных и плохим прогнозом. В экспериментах *in vitro* было продемонстрировано, что сочетание Ерсат, CD24 и CD44 на клетках рака яичника значительно снижало клоногенную активность клеток [128].

Первая публикация о фенотипе СКО при **раке молочной железы** появилась в 2003 г. [25]. Авторы показали, что CD44⁺/CD24⁻ клетки рака молочной железы при трансплантации иммунодефицитным мышам оказались более туморогенны, чем CD44⁻CD24⁻. Эти данные послужили основой для изучения клинического аспекта вопроса. Иммуногистохимическое исследование экспрессии CD44⁺CD24⁻ на клетках опухоли не выявило статистически значимой корреляции между этим фенотипом клеток и стадией, типом опухоли и размером. Аналогичные результаты были получены и анализом экспрессии маркеров стволовой клетки рака молочной железы методом проточной цитофлюориметрии. Изучение прогностического значения экспрессии этих антигенов выявило, что экспрессия CD44⁺ характерна для клеток базально-подобных опухолей рака молочной железы и появление его в опухоли связана с плохим прогнозом. CD24 экспрессируют люминально-подобные клетки рака молочной железы, которые представляют более дифференцированный тип клеток опухоли [44].

Таким образом, проведенный анализ литературных данных о фенотипе СКО показал, что опухоли различаются по экспрессии антигенов, ассоциированных с

СКО. Каждая опухоль имеет антигены, как общие для нескольких типов опухолей, так и характерные только для одной.

1.4. Молекулярные детерминанты стволовой клетки меланомы

Меланома, клинические признаки которой могут проявиться у пациентов в любом возрасте, чрезвычайно злокачественная опухоль. Ее можно легко обнаружить на поверхности кожи, но, несмотря на это, меланома весьма коварная, так как может метастазировать в то время, как первичная опухоль имеет совсем маленький размер. Отличают две фазы роста меланомы: горизонтальная и вертикальная фазы [66, 100, 111].

- *Горизонтальная фаза развития* поверхностно-распространяющейся меланомы может длиться до 7 лет. В горизонтальной стадии рост опухоли происходит за счет проникновения клеток меланомы в нижние слои эпидермиса (базальный и шиповатый), где впоследствии они распространяются в горизонтальном направлении.

- *Вертикальная фаза роста* проявляется возвышением опухоли над поверхностью кожи и образованием в ней узлов. Вертикальную фазу роста характеризует проникновение клеток меланомы в поверхностные слои эпидермиса и инвазией через базальную мембрану в дерму и подкожную жировую клетчатку. Эту фазу развития характеризуют быстрый рост меланомы и склонность к метастазированию.

Легко поддающаяся лечению на самых ранних стадиях заболевания, меланома становится резистентной к противоопухолевой терапии при переходе прогрессии роста. Так, 5-летняя выживаемость отмечается в 97,9 % случаев, если толщина опухоли < 0,76 мм, и снижается до 57,5%, когда размеры опухоли >3 мм [30]. И хотя корреляция между толщиной опухоли и прогнозом течения болезни достаточно хорошо охарактеризована, фенотипическая характеристика клеток меланомы, участвующих в инициации опухоли, инвазии и формирования метастазов еще продолжается.

Значительное количество экспериментальных данных говорит о том, что среди клеток меланомы имеется небольшая популяция СК, формирующая

дифференцированные клетки опухоли, а также способная к собственному воспроизведению [54, 105, 48, 51, 84]. Эта клеточная популяция меланомы наиболее агрессивна и вызывает при ксенотрансплантации опухоли у бестимусных мышей. Кроме того, эти клетки устойчивы к химиотерапии. Сегодня описаны несколько ключевых маркеров для стволовой клетки меланомы [73].

Первое сообщение о существовании популяции стволовой клетки меланомы (СКМ) появилось в 2005 году [54]. Авторы характеризовали такие клетки как не прикрепляющиеся к пластику и образующие сфероиды в процессе культивирования в среде для человеческих эмбриональных стволовых клеток. После клонирования такие клетки были способны к самообновлению и дифференцировались в адипоциты, хондроциты, остеобласты или меланоциты. Адгезивная же фракция клеток, полученная из той же культуры клеток меланомы, представляла собой веретено-подобный морфофенотип. Формирующие сфероиды клетки меланомы характеризовались высокой экспрессией CD20 – маркера В-лимфоцитов, и именно эта популяция клеток меланомы формировала опухоль в иммунодефицитных SCID мышам. Так были получены первые данные о существовании популяции СКМ.

Pinc A. и соавт. в дальнейшем также обнаружили антиген CD20 на малом проценте клеток при культивировании меланомы в среде эмбриональных стволовых клеток [96]. Введение мышам с ксенотрансплантатами меланомы субпопуляции аутологичных Т-клеток с генно-инженерно встроенным химерным рецептором антигена CD3/CD20 приводило к регрессии опухоли. В пилотном исследовании 9 пациентам с меланомой IV стадии вводили Ретуксимаб (моноклональные антитела к CD20) по 375 мг/мг 1 раз в 4 недели, а затем проводили поддерживающую терапию каждые 8 недель в течение 2 лет. Шесть пациентов были живы в течение 2 лет, и у 5 из них не было признаков опухоли [96].

В 2007 году появилось сообщение о получении из биопсийного материала больных меланомой популяции клеток, положительных по CD133, маркеру предшественников нейронов [90]. Эти клетки отличались большим онкогенным

потенциалом и при имплантации NOD/SCID мышам инициировали опухоль. CD133+ клетки при длительном культивировании сохраняли экспрессию этого маркера и проявляли способность к дифференцировке в клетки мезенхимального и нейронального ряда. CD133+ клетки также формировали сфероиды *in vitro* и экспрессировали ангиогенные и лимфангиогенные маркеры. Несколько позже были получены статистически достоверные данные о положительной корреляции экспрессии CD133 в опухоли и прогрессии меланомы [99]. Совсем недавно появилась информация, что даун-регуляция CD133 в таких клетках малыми интерферирующими РНК заметно снижала рост меланомы и способность к метастазированию.

Kumar D. и соавт. показали, что меланома-специфичные CD133-положительные СКО обладают повышенным потенциалом к инициации опухоли, взаимодействию с эндотелиальными клетками и метастазированию в легкие. Эти СКО способны к трансдифференцировке в эндотелио-подобный фенотип при культивировании в определенных условиях. Это происходит из-за того, что Notch1 повышает активацию MAPK через CD133, который контролирует экспрессию VEGF и MMP в CD133-положительных СКО, приводя к росту меланомы, ангиогенезу и метастазированию в легкие. Блокада или генетическая абляция сигнальных путей Notch1 и MAPK отменяет миграцию меланомных клеток и ангиогенез. Анализ образцов меланомы человека показал высокую корреляцию между экспрессией NICD1, CD133 и p-p38 MAPK и прогрессированием меланомы. Таким образом, таргетная терапия, направленная на Notch1 и регуляцию его сигнальных путей может быть потенциальным подходом к лечению меланомы, прогрессирующей из СКМ [74].

Calvani M. и соавт. обнаружили, что СКМ могут обладать фенотипом VEGF-R2+/CD133+. Клеточные линии Hs294T и A375 культивировали в условиях гипоксии, используя «тест формирования сфероидов», и затем выделяли СК по экспрессии на поверхности CD133 и способности к миграции. Авторы обнаружили, что субпопуляция клеток, обладающая способностью к формированию сфер и CD133+, также экспрессирует высокое количество VEGF-

R2. Воздействие на *in vitro* и *in vivo* комбинацией Этопозида и Бевацизумаба показало эффективность этих препаратов для VEGF-R2/CD133-положительных СКМ [41].

В 2010 г. исследователи из Стэнфордского университета из опухолевого материала больных диссеминированной меланомой получили популяцию CD271-положительных клеток меланомы [34]. CD271 является рецептором фактора роста нейрального гребня (neural crest nerve growth factor receptor). Voiko A.D. и соавт. трансплантировали CD271+ клетки меланомы иммунодефицитным мышам. Из пересаженных CD271+ клеток формировались полноценные меланомы, быстро растущие и быстро метастазирующие. Выделенные из экспериментальной опухоли CD271+ клетки сохраняли свои свойства, и при трансплантации бестимусным мышам давали начало подобным опухолям. В другой работе разделяли клетки на CD271-положительные и CD271-отрицательные и трансплантировали их иммунодефицитным мышам. CD271-положительные клетки вызывали образование опухоли у 70% мышей, тогда как CD271-отрицательные – только у 7%.

Антиген CD271 обнаружен на опухолевых клетках, формирующих васкулогенную мимикрию. Васкулогенная мимикрия – свойство меланомных клеток формировать сосудисто-подобные каналы внутри опухоли, по которым происходит кровоснабжение опухоли при отсутствии нормальных сосудов [121]. Существует мнение, что СКО усиливают опухолевый рост путем индукции образования сосудистой мимикрии [57]. Экспрессия CD271 также ассоциирована с метастазированием меланомы [89].

Интересно отметить, что в CD271+ клетках меланомы отмечалось снижение экспрессии генов *TYR*, *MART1* и *MAGEC1/MAGEC2* (на 86, 69 и 68% соответственно) [34]. Этот факт объясняет неудачи при терапии меланомы с использованием антител к белковым продуктам этих генов.

Группа исследователей [125] обнаружила, что CD114 является еще одним маркером СКМ и СК других опухолей, клетки которых в эмбриогенезе развиваются из нервного гребня. В патогенезе таких опухолей играет роль

активация сигнального пути STAT3 гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (ГКСФ). Экспрессия на поверхности СК CD114 (рецептора ГКСФ) может приводить к прогрессированию и плохому прогнозу заболевания. Авторы исследования предполагают, что CD114 может быть потенциальной мишенью для таргетной терапии, направленной на СКО.

Несомненный интерес вызывают результаты исследования роли ABC-транспортеров в функционировании СКМ. Белки семейства АТФ-зависимых ABC-транспортеров в норме защищают клетку от экзогенных и эндогенных токсинов, участвуют в транспорте АТФ, стероидов, полипептидов. Высокая экспрессия ABC-транспортеров в опухолевых клетках приводит к множественной лекарственной устойчивости, которая проявляется выбросом противоопухолевых препаратов из клетки, что приводит к уменьшению их концентрации в клетке, необходимой для успешной терапии [70]. Помимо способности к повышенному выбросу токсичных лекарственных препаратов, ABC-транспортеры способны выбрасывать из СК красители, например, для транспортеров ABCB1 и ABCB5 (MDR1 и MDR/TAP, соответственно) таким красителем является родамин123. Тест на выброс родамина является хорошим инструментом для определения стволовых клеток, гиперэкспрессирующих ABC-транспортеры, позволяющим оценить множественную лекарственную устойчивость в клетках [108, 56]. Touil Y. и соавт. использовали метод оценки выброса родамина 123 для того, чтобы идентифицировать по функциональной активности стволовые клетки в образцах метастатической меланомы, полученных от больных, и в клеточных линиях меланомы. Авторы показали, что небольшая популяция клеток, слабо удерживающих родамин (Rh123(low)), обладает свойствами СКМ, включая способность к самообновлению и производству нестволового потомства (с высокой способностью к захвату родамина 123 (Rh123(high))). Клетки Rh123(low) обладали устойчивостью к химиопрепаратам, кроме того, они гиперэкспрессировали HIF1 α , плюрипотентный фактор OCT4 и маркер СКМ ABCB5 [120].

В ряде исследований было показано, что в ABCB5+ клетках меланомы снижена экспрессия МНС I класса [27, 106], что является одним из основных механизмов, используемых опухолью для ухода от воздействия иммунной системы.

В лаборатории Гарвардской медицинской школы в г.Бостоне (США) впервые было показано, что в культуре клеток, полученных из образцов опухолевого материала меланомы, часть клеток несет на своей поверхности молекулы белка ABCB5 [56,55].

Белок ABCB5 на 73% гомологичен ABCB1 (MDR1), впервые был выявлен в тканях нейроэктодермального происхождения, в частности, в предшественниках меланоцитов, в клеточных линиях меланомы и образцах опухолей, полученных от пациентов [103].

Высокий уровень экспрессии ABCB5 был характерен для клеток меланомы, полученных из «толстой» опухоли. Аналогичная корреляция экспрессии маркера наблюдается в клетках, полученных из метастазов, а не из первичной опухоли. Подтверждение способности ABCB5 положительных клеток меланомы инициировать опухоль у бестимусных мышей также было получено в лаборатории Гарвардской медицинской школы (г.Бостон, США). Увеличение экспрессии маркера в ксенографте заметно уменьшалось, если мышам с меланомой вводили моноклональные антитела к ABCB5 [55]. Так было получено экспериментальное подтверждение тому, что экспрессия ABCB5 на клетках меланомы может служить свидетельством их принадлежности к СКМ. Раково-тестикулярные антигены NY-ESO-1 и MAGE-A, характерные для меланомы, также экспрессируются на ABCB5-положительных клетках.

Monzani E. и соавт. изучили стволовые клетки меланомы в биопсийном материале больных, в клеточной культуре и в ксенографтах. Во всех 3 формах исследования материала были найдены CD133-положительные клетки. Авторы обнаружили, что клетки линии меланомы человека WM115 экспрессируют как CD133, так и ABC-транспортер ABCD2. Эта клеточная линия образует в культуре сфероиды, экспрессирует прегениторные и зрелые нейрональные

олигодендроцитарные маркеры и способна дифференцироваться в определенных условиях в астроциты или клетки мезенхимального ряда. Также клетки этой линии экспрессируют важные ангиогенные и лимфоангиогенные факторы, такие как notch 4, prox1 и подопланин, которые могут способствовать повышенной туморогенности *in vivo* [90].

Есть сообщения о том, что субпопуляции меланомных клеток, у которых идентифицирована повышенная активность альдегид дегидрогеназы ALDH, обладает большей туморогенной активностью и способностью к самообновлению, по сравнению с ALDH-негативными клетками [37]. Также известно, что клетки меланомы, которые экспрессировали рецептор активатор NFκB RANK демонстрировали повышенную туморогенную активность, по сравнению с негативными по этому рецептору клетками [75].

Lukenda A. и соавт. изучили иммуногистохимическим методом экспрессию прогностической значимости таких маркеров СКО как CD117, CD15, CD20 у пациентов с первичной меланомой хориоидеи и меланомой цилиарного тела. Авторы не обнаружили экспрессии маркеров CD20. Маркер CD15 экспрессировался в 10-26% случаев, однако, его экспрессия не была связана с выживаемостью пациентов. Интересные данные были получены для CD117, этот маркер экспрессировался наиболее часто. Статистический анализ показал, что экспрессия CD117 коррелирует с более короткой общей и безрецидивной выживаемостью. Риск летального исхода в 4,13 раз выше у пациентов с CD117+, чем с CD117- [83]. CD117(c-kit) – рецептор фактора СК, относится к III типу рецепторов семейства тирозинкиназы, он необходим для пролиферации и выживания нормальных меланоцитов. В меланомах слизистых оболочек, увеальных меланомах, а также меланомах кожи, образовавшихся вследствие хронического повреждения солнечными ожогами, активируется мутация гена KIT, которая является онкогенной и может быть потенциальной терапевтической мишенью [50,77].

IGF-1 (инсулино-подобный фактор роста 1) продуцируется клетками меланомы и ее микроокружением, он ассоциирован с эпителиально-

мезенхимальным переходом и приобретением клетками свойств стволовых. [49] Авторы оценили влияние IGF-1 на фенотип и химиорезистентность клеточной линии мышинной меланомы B16-F10. Ингибирование IGF-1 предотвращало пролиферацию, миграцию, инвазию и метастазирование опухолевых клеток. Даунрегуляция IGF-1 также заметно ингибировала эпителиально-мезенхимальный переход, с низким уровнем ZEB1 и мезенхимальных маркеров (N-кадгерина, CD44, CD29, CD105), ассоциированный с высоким уровнем E-кадгерина и MITF, основного регулятора дифференцировки меланоцитов. Также ингибирование IGF-1 значительно снижало характеристики «стволовости», включая экспрессию ключевых стволовых маркеров (SOX2, Oct-3/4, CD24 и CD133) и функциональных характеристик меланома-иницирующих клеток (формирование сфероидов, активность альдегид-дегидрогеназы). Блокирование сигнальных путей IGF-1 может улучшить иммунный ответ, снизить метастатический потенциал опухолевых клеток меланомы и увеличить чувствительность к химиопрепаратам.

CD24 – поверхностный клеточный белок, ассоциированный с метастазированием, часто гиперэкспрессирован на многих опухолях. В исследовании [115] определили роль CD24 при меланоме кожи, уровень экспрессии как мРНК, так и самого белка, был выше в тканях опухоли, чем в нормальных тканях. Экспрессия CD24 связана со снижением выживаемости больных меланомой. Ряд исследований выделяет фенотип CD44+/CD24– как характерный для СКО, однако чаще эти исследования касаются таких опухолей как рак молочной железы, рак яичников [40]. Для стволовой клетки рака поджелудочной железы, наоборот, описан фенотип CD44+/CD24+ [71]. В случае меланомы мы не нашли литературных данных о связи обоих фенотипов с СКМ.

В обзорах об СКМ, опубликованных в последние 2-3 года, высказано предположение, что популяция СКМ может быть гетерогенной для каждой отдельной меланомы. Совсем необязательно, чтобы популяция СКМ экспрессировала сразу CD20, CD133, CD271 и ABCB5. Может наблюдаться разное сочетание экспрессии этих маркеров [76, 98]. Этот вывод наделяет

популяцию СКМ уникальной пластичностью и отличает СКМ от стволовых клеток других опухолей. Так, все стволовые клетки рака молочной железы экспрессируют CD44+/CD24-, а стволовые клетки множественной миеломы – CD34+/CD38- и т.д. [35]

«Золотым стандартом» оценки СКО продолжает оставаться их способность инициировать опухоль малым количеством клеток. Предполагается, что в культуре клеток, полученной из опухолевого материала больных раком, свойствами СКО обладают менее 1% клеток новообразования. Это верно и для СКМ. Однако в 2010 году появляются публикации, что опухолевым потенциалом могут обладать до 25% клеток меланомы, полученных из опухолевого материала [98]. Согласно определению AACR, СКО – популяция клеток, способных к самообновлению и дифференцировке. В определении не указано, что такой способностью во всех злокачественных новообразованиях должна обладать небольшая часть клеток. Высокий процент клеток, инициирующих экспериментальную меланому, говорит, скорее, о чрезвычайной злокачественности этой опухоли, чем представляет исключение из правила.

1.5. Как стволовая клетка меланомы уходит от иммунного надзора

В клетках организма постоянно накапливаются мутации, которые отслеживаются системами контроля. Накопление критической массы мутаций, затрагивающих гены «стабильности», может привести к возникновению опухолевой клетки. В большинстве случаев иммунная система выявляет и уничтожает такие клетки, но злокачественные новообразования, тем не менее, появляются и, появившись, не регрессируют под действием иммунной системы. Одной из главных причин ускользания опухоли от иммунологического надзора является отсутствие распознавания Т-лимфоцитами опухолевых клеток [78]. Данные о коммуникации СКМ с клетками иммунной системы появились совсем недавно. Было показано, что одним из механизмов ухода СКМ от иммунного надзора может служить низкая экспрессия стволовой клеткой MART-1 – меланоцит-специфического антигена, экспрессирующегося на поверхности

клеток, который и узнают Т-клетки [104, 106]. Аналогичная корреляция наблюдается и с пониженной экспрессией генов ML-IAP, NY-ESO-1, MAGE-A в клетках меланомы, положительных по ABCB5 (как в клеточных линиях, так и в образцах опухоли больных) [106]. В образцах опухоли, полученных от пациентов, положительных по CD271+ снижена экспрессия TYR, MART и MAGE(C1-C2) [34]. Через даун-регуляцию этих генов СКМ может уходить от противоопухолевого иммунного ответа, направленного на опухолевые антигены, ассоциированные с более дифференцированным злокачественным фенотипом. Это может объяснить отсутствие противоопухолевого ответа на CD8+ опухоле-реактивные Т-лимфоциты.

Другим механизмом, посредством которого СКМ уходит от надзора иммунной системы, являются изменения в экспрессии белков МНС Class 1. В норме, эти белки присутствуют на поверхности всех клеток и представляют антигены CD8+Т-лимфоцитам для активации адаптивного иммунного ответа. Недавно было показано, что в ABCB5+ клетках меланомы резко снижена экспрессия МНС I типа [106]. Понятно, что в отсутствии МНС I типа адаптивная иммунная система не может распознать клетки меланомы, что в итоге и приводит к прогрессии опухоли. Снижение экспрессии МНС I типа является одним из основных механизмов, используемых опухолью для избегания воздействия иммунной системы [27]. Клинически снижение экспрессии МНС Class 1 ассоциировано с прогрессированием меланомы, неэффективностью терапии и плохим клиническим прогнозом [43;65]. Интересно отметить, что если подавление экспрессии МНС I типа обеспечивает уход от CD8+Т-клеточного иммунного ответа, то низкая его экспрессия может увеличить ответ НК клеток, который в норме блокируется белками МНС I типа. Однако, СКМ удается избегать воздействия НК-клеток через экспрессию на поверхности СК молекул, ингибирующих эффекты НК-клеток.

Третий путь, с помощью которого ABCB5+ СКМ может приобретать устойчивость к иммуноопосредованному ответу – развитие толерантности к меланома-специфическим Т-клеткам. ABCB5-положительные клетки меланомы

экспрессируют на своей поверхности лиганды PD-L1 и PD-L2, которые связываются с PD-1 рецептором на поверхности Т-клеток, вызывает иммуносупрессивное действие, что позволяет опухоли уклониться от иммунного ответа [106].

Еще одним возможным вариантом ухода от иммунного ответа может служить ингибирование продукции IL-2 в СКМ, который является необходимым цитокином для активации и пролиферации Т-клеток [106]. Эффективность использования цитокинов при лечении злокачественной меланомы сегодня не вызывает сомнений. Становится очевидным, что прогрессирующая опухоль вызывает серьезные изменения в иммунном ответе, с которыми самостоятельно иммунная система не может справиться. Накопившиеся сведения о взаимоотношении опухоли и иммунной системы указывают на то, что при разработке подходов к иммунотерапии меланомы важно учитывать коммуникацию СКМ с иммунной системой [24].

1.6. Заключение

Согласно концепции СКО – клетка, инициирующая опухоль – появляется в результате мутаций в тканевой СК, их наследования клетками-родоначальницами опухоли, а также в результате сбоя в регуляторной системе СК того или иного типа тканей взрослого организма или их прямых потомков. Крайне небольшое число СКО может давать начало опухолевому процессу, непрерывно пополнять популяцию клеток опухоли и регенерировать ее после удаления или разрушения большинства ее клеток. Анализ литературных данных фенотипа СКО показал, что популяция пула СКО высоко гетерогенна. Опухоли различаются по набору антигенов - маркеров стволовой клетки опухоли, и в то же время в опухоли могут экспрессироваться антигены общие для нескольких типов опухоли. Более того, фенотип СКО может быть не стабильным в результате реверсии маркеров.

Меланома считается самой агрессивной опухолью кожи, которая характеризуется чрезвычайной гетерогенностью, склонностью к быстрому росту и метастазированию, а также устойчивостью к химиотерапевтическому лечению.

Клиническое применение новых таргетных препаратов и иммунотерапии также не всегда успешно у пациентов с прогрессирующим заболеванием. Неудачи лечения меланомы объясняются гетерогенностью опухоли из-за формирования генетически отличных субпопуляций опухолевых клеток. Эти субпопуляции образуются из небольших фракций СКО, которые способствуют образованию нестволовых раковых клеток, составляющих основную массу опухоли. СК может быть потенциальной мишенью для лечения меланомы. Фенотип и молекулярные особенности СК важно учитывать при таргетной терапии меланомы. Необходимо, чтобы мишень воздействия присутствовала на всех популяциях опухоль-инициирующих клеток, или необходимо применять комбинацию таргетных препаратов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Клеточные линии

Исследование проводили на 19 клеточных линиях меланомы человека, полученных из банка клеточных культур ФГБУ «НМИЦ онкологии им.Н.Н. Блохина» Минздрава России. Клеточные линии меланомы mel Mtp, mel Z, mel Kor, mel Ibr, mel P, mel Cher, mel Is, mel Me, mel H, mel Hn, mel Bgf, mel Si, mel Rac, mel Gus, mel Gi, mel Ksen, mel Ch, mel Il, mel R были получены из опухолевого материала больных, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им.Н.Н. Блохина» Минздрава России [6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16, 17].

Степень дифференцировки клеточных линий представлена в таблице №1 [3].

Таблица 1 – Степень дифференцировки клеточных линий, используемых в исследовании

Степень дифференцировки клеток	Название линии
Высоко дифференцированные	mel Si; mel Me
Умеренно дифференцированные	mel Bgf, mel Il, mel P, mel R, mel Ksen, mel Z, mel Hn
Низко дифференцированные	mel Kor, mel Gus, mel Mtp, mel Is, mel Gi, mel Ibr, mel Cher, mel Ch, mel H, mel Rac

2.1.2. Реактивы

Питательная среда RPMI-1640 без глутамин (ПанЭко, Россия);

Пенициллин (25000 Ед) – стрептомицин (25000 мкг) (ПанЭко, Россия);

Аминокислоты для среды RPMI-1640 (ПанЭко, Россия);

Витамины для среды RPMI-1640 (ПанЭко, Россия);

L-глутамин стерильный, 146мг (ПанЭко, Россия);

Пируват натрия 100х раствор, 11мг/мл (ПанЭко, Россия);

HEPES 1M, pH=7,2 (ПанЭко, Россия);
Сыворотка крови эмбриональная телячья (HyClone, США);
Раствор Версена (ПанЭко, Россия);
Физиологический раствор (ПанЭко, Россия);
Фосфатно-солевой буфер (PBS) (pH 7,2-7,4) (ПанЭко, Россия);
Формалин (Химмед, Россия);
Спирт этиловый 96% (Химмед, Россия);
Ацетон (Химмед, Россия);
Nоеchst-33258;
Родамин 123, 99+% чистый (Sigma-Aldrich, США);
Центрифужные пробирки на 50мл (SPL, США);
Центрифужные пробирки на 15мл (SPL, США);
Пипетки 10 мл, стерильные, с фильтром, ИУ (Greiner, Франция);
Флаконы культуральные 25см², стерильные, наклоненное горло (SPL, США);
Стекла полилизинные
Чашки Петри диаметром 10 см
Пробирки для проточного цитофлуориметра (Becton Dickinson, США).
Для определения экспрессии маркеров на клеточной мембране, характеристика которых представлена в таблице 2, в работе использовали моноклональные антитела.

Таблица 2 – Характеристика использованных в работе моноклональных антител

Название антитела	Флуорохром	Фирма-производитель
CD24	PE	BD Pharmingen™
CD 44	FITC	BD Pharmingen™
CD 133/2	PE	MACS, Miltenyi Biotec
CD 133/2	FITC	BD Pharmingen™
CD 117	APC	MACS, Miltenyi Biotec
CD 117	PE	ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
CD 90	PE	MACS, Miltenyi Biotec
CD 271	FITC	BD Pharmingen™
CD114	PE	BD Pharmingen™
Oct-4	PE	BD Pharmingen™
SOX-2	–	R&D Systems
Nestin clone 196908	–	R&D Systems
Anti-ABC5	–	Abcam
CD133 (ICO401)	–	ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

2.1.3. Оборудование

Ламинарный шкаф NU-437-400E (NuAire, США)

CO₂ -инкубатор NU-4750E (NuAire, США)

Лабораторная центрифуга (Sorvall LEGEND XTR, Германия)

Микроцентрифуга (Eppendorf, Германия)

Инвертированный микроскоп (Leica, Германия)

Флуоресцентный микроскоп AxioScope (Zeiss, Германия)

Холодильник с морозильной камерой на – 20° С (Стинол, Россия)

Морозильник с режимом холода – 80° С (NuAire, США)

Проточный цитофлуориметр FACSCanto II (Becton Dickinson, США).

2.2. Культивирование клеточных линий меланомы человека

Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % ТЭС, 2 мМ L-глутамина, пенициллин (25000 Ед) – стрептомицин (25000 мкг), пируват натрия, 0,1% раствор аминокислот и 0,1% раствор витаминов при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Культуры клеток поддерживали в логарифмической фазе роста пересевом через 3 – 4 дня. Для снятия культур с пластика использовали раствор Версена.

2.3. Прямая реакция иммунофлуоресценции

Клетки снимали с культуральных флаконов, 2 раза отмывали PBS. Затем помещали в пробирки для проточной цитофлуориметрии 500 тыс. клеток в 50 мкл раствора PBS и добавляли меченые моноклональные антитела в количестве, указанном производителем. После 30 мин. инкубации при +4 °С, клетки двукратно отмывали PBS центрифугированием в течение 5–7 минут при 1000 оборотов в минуту. Затем надосадочную жидкость удаляли и добавляли 300 мкл 1 % раствора формалина в PBS. Экспрессию антигенов оценивали на проточном цитофлуориметре FACS CantoII (Beckton Dickinson, США).

2.4. Непрямая реакция иммунофлуоресценции

Клетки снимали с культуральных флаконов, 2 раза отмывали PBS. Затем помещали в пробирки для проточной цитофлуориметрии 500 тыс. клеток в 50 мкл раствора PBS и добавляли моноклональные антитела, инкубировали 30 мин. при комнатной температуре. Не связавшиеся с антигенами антитела удаляли однократной отмывкой в 1 мл PBS центрифугированием в течение 5–7 минут при 1000 оборотов в минуту. После удаления супернатантов вносили в пробирки вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом. Инкубировали 30 мин при +4 °С. После инкубации клетки двукратно отмывали PBS центрифугированием в течение 5–7 минут при 1000 оборотов в минуту. Затем

надосадочную жидкость удаляли и добавляли 300 мкл 1 % раствора формалина в PBS. Экспрессию антигенов оценивали на проточном цитофлуориметре FACSCantoII (Beckton Dickinson, США).

2.5. Метод проточной цитометрии

В исследованиях использовали проточный цитофлуориметр FACSCantoII (Beckton Dickinson, США). Клетки анализировали на основе параметров, измеряемых проточной цитометрией. Клетки в момент прохождения через луч лазера рассеивали свет во всех направлениях и испускали небольшое количество света за счет флуоресценции. Размер и форму клеток определяет прямое рассеивание света (FCS) – количество света в направлении лазерного пучка под углом 0°, тогда как боковое рассеивание (SSC) – под углом 90° по отношению к лазерному пучку определяет структурные особенности различных популяций клеток. На цитограмме устанавливали соответствующее окно дискриминации (гейт), в котором на основании SSC и FCS вырезали основной пул клеток с целью удаления крупных (агрегаты) частиц и мелких (дебрис) частиц. Определение интенсивности флуоресценции проводилась с учетом анализа гистограмм. На гистограммах по оси Y отображено число событий (число клеток), а по оси X – интенсивность флуоресценции. В каждом образце накапливали не менее 10 тысяч событий. Результаты детектировали в каналах FITC, PE, APC, в зависимости от используемого в конкретном исследовании флуорохрома. Положительными считали результаты, которые были равны или превышали 10% антиген-презентирующих клеток.

2.6. Иммуноцитохимическое исследование

Клеточные линии культивировали и на стеклах в чашках Петри в среде RPMI-1640, содержащей 10 % ТЭС, 2 мМ L-глутамин, пенициллин (25000 Ед) – стрептомицин (25000 мкг), пируват натрия, 0,1% раствор аминокислот и 0,1% раствор витаминов при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. После образования клетками 80% монослоя, стекла промывали 2 раза в PBS, просушивали на воздухе,

заворачивали в фольгу и хранили при температуре -20°C . Для проведения реакции стекла прогревали до комнатной температуры в течение 20-30 минут, фиксировали 5 минут в 96% спирте, охлажденном до -20°C , затем 3 минуты в охлажденном до -20°C ацетоне. Высушивали стекла 30 минут, после чего делили на 4 квадрата. Промывали в PBS 5 минут, инкубировали во влажной камере с БСА в течение 15 минут, стряхивали PSB. Наносили первичные антитела (в контрольные квадраты наносили вместо первичных антител PSB), инкубировали в течение ночи при $+4^{\circ}\text{C}$. На следующий день отмывали 2 раза в PBS и наносили вторичные антитела, меченные FITC (Abcam). Инкубировали 45 минут при $+4^{\circ}\text{C}$ во влажной камере. Отмывали стекла 2 раза в PBS в течение 5 минут. Затем наносили Noechst-33258 и инкубировали 15 минут во влажной камере. Промывали стекла 2 раза в PBS в течение 5 минут. После чего просушивали и заключали под покровные стекла с помощью Fluorescent Mounting Medium. Через сутки оценивали результаты на флуоресцентном микроскопе по уровню и частоте экспрессии. Выделяли слабую, умеренную, выраженную экспрессию или ее отсутствие.

2.7. Работа с архивными данными. Характеристика пациентов.

Для определения корреляции между экспрессией маркеров стволовых опухолевых клеток и течением, прогнозом меланомы проводилась работа с архивными данными пациентов, проходивших лечение в НИИ Клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им.Н.Н. Блохина» Минздрава России, из опухолевого материала которых были получены используемые в исследовании клеточные линии.

Исследовалось течение заболевания и лечение, полученное пациентами перед удалением метастазов, послуживших для создания клеточных линий, с целью поиска связи с наличием и частотой экспрессии маркеров стволовой клетки опухоли.

Ниже представлена архивная информация из историй болезни пациентов:

Mel Z. Умеренно-дифференцированная клеточная линия mel Z была получена от пациентки З.З.С. 1948 г.р., которая наблюдалась по поводу Меланомы кожи спины T2aN0M0, состояние после хирургического лечения от 05.02.2003 г. Прогрессирование (июнь 2003 г.): рецидив, состояние после хирургического лечения от 26.06.2003 г. и профилактической иммунотерапии рекомбинатным интерфероном альфа. Прогрессирование (октябрь 2003 г.): метастазы в подмышечные л/узлы слева, состояние после хирургического лечения от 15.10.2003, состояние после 2х курсов профилактической химиоиммунотерапии».

Анамнез: 05.02.2003 г. выполнено иссечение меланомы кожи спины. В июне 2003 года диагностирован рецидив опухоли, который был удален 26.06.2003 г. (дата забора материала, из которого выведена клеточная линия – 26.06.2003г.). Пациентке проведен курс профилактической иммунотерапии по схеме: реаферон в дозе 5 млн МЕ п/к ежедневно 1-20 дни, далее- динамическое наблюдение. В октябре 2003г. при обследовании выявлены увеличенные л/узлы в левой подмышечной области размерами до 2 см. 15.10.2003г. выполнена подмышечная лимфаденэктомия слева. С октября по декабрь проведено 2 курса профилактической химиоиммунотерапии по схеме: араноза 500 мг/м² в/в 1–3 дни + реаферон 5 млн МЕ п/к 3 раза в неделю 4-14 дни, с интервалом между курсами 3 недели. Далее пациентка наблюдалась по месту жительства. По состоянию на декабрь 2016г., пациентка жива.

Таким образом, пациентка не получала лекарственную терапию до взятия материала, из которого была получена клеточная линия.

Mel BGF. Умеренно-дифференцированная клеточная линия mel BGF получена из опухолевого материала пациента Б.Г.Ф. 1946г.р., который наблюдался с диагнозом «Диссеминированная меланома кожи правого плеча. TхN2M1b». В 2000 г. пациенту выполнено иссечение меланомы кожи правого плеча. В 2003 году было отмечено прогрессирование заболевания: метастазы в лимфатических узлах правой подмышечной области размерами до 5 см, метастазы в мягких тканях правого коленного сустава размерами до 1,5 см, метастазы в

левом легком до 7,5 см. (дата забора материала, из которого получена клеточная линия: 09.04.2003г). В апреле 2003 года проведена вводная фаза химиотерапии по схеме: Мюстофоран 100 мг/м² в/в 1,8,15 дни + реаферон 3 млн МЕ п/к 16-25 день. При контрольном обследовании в июне 2003 г. отмечается уменьшение метастаза правой подмышечной области до 2 см, в левом легком - до 5,4 см. В июле -августе 2003 г. проведено 2 курса химиотерапии по схеме: мюстофоран 100 мг/м² в/в 1 день + реаферон 3 млн МЕ п/к 2-11 дни с интервалом между курсами 3 недели. При обследовании в августе 2003 г. – стабилизация заболевания. Далее пациентка направлена под наблюдение онколога по месту жительства. Дата смерти: ноябрь 2005.

Пациент не получал химио- и/или иммунотерапевтического лечения до удаления метастаза, из которого получена клеточная линия.

Mel Ksen. Умеренно дифференцированная клеточная линия mel Ksen получена из метастаза больной К.Н.С., удаленного 07.06.2001г. До удаления метастаза пациентка не получала лекарственной терапии. После операции больная наблюдалась по месту жительства, о лечении, полученном после удаления метастаза, нет данных. По состоянию на декабрь 2016г., пациентка жива.

Mel Mtp. Низкодифференцированная клеточная линия mel Mtp была получена от пациентки М.Т.П. 1960 г.р., с диагнозом «Меланома кожи левой голени T4aN3M0». Пигментное образование на коже левой голени появилось в 1998 г., в 2000 г. появилось уплотнение в левой паховой области. В декабре 2001 г. выполнено иссечение меланомы кожи и операция Дюкена слева по поводу метастаза в пахово-бедренных л/узлах. При обследовании в январе 2002 года диагностированы метастазы в мягких тканях передней грудной стенки, в правой почке, в левом надпочечнике, паранефральной клетчатке. (дата забора материала, из которого выведена клеточная линия – 15.01.2002г.)

С января по апрель 2002 г. больной проведено 3 курса ПХТ по схеме: «цисплатин+араноза». По результатам обследования после 2х курсов ПХТ отмечена стабилизация заболевания, после 3го курса – прогрессирование, через 3 месяца пациентка умерла. Дата смерти: 11.07.2002г.

Таким образом, пациентка не получала лекарственную терапию до забора материала, из которого была получена клеточная линия.

Mel H. Низкодифференцированная клеточная линия mel H получена из опухолевого материала пациента Х.И.С. 1928 г.р. с диагнозом «Меланома кожи левой стопы». В 2001 году пациент обратился в НИИ КО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» по поводу метастатического поражения лимфатических узлов левой паховой области, 27.09.2001 года выполнена операция Дюкена слева. (дата забора материала, из которого выведена клеточная линия – 27.09.2001 г.) Химио- и иммунотерапию больной до удаления метастаза не получал.

Mel Rac. Низкодифференцированная клеточная линия mel Rac получена из опухолевого материала пациента Р.Д.М. 1948 г.р., который наблюдался с диагнозом: «Метастазы меланомы кожи правой голени в мягкие ткани правого бедра и голени. T4vN0M1a». В феврале 1995 года больному был оперирован по поводу меланомы кожи правой голени. В марте 2002 г. отметил появление опухолевых узлов на правом бедре, а затем правой голени. (Дата иссечения опухоли, из которой получена клеточная линия: 15.03.2002г). Специфического лечения до удаления метастазов больному не проводилось. Дата смерти: 17.10.2003г.

Mel Si. Высоко дифференцированная клеточная линия mel Si получена из опухолевого материала пациентки С.И.А. 1957 г.р. с диагнозом «Диссеминированная меланома кожи спины». В 1999 г. проведено иссечение меланомы кожи поясничной области, и в послеоперационном периоде больная получила 4 курса профилактической химиотерапии Дакарбазином. При обследовании в марте 2003 г. выявлено прогрессирование заболевания в виде поражения периферических лимфоузлов всех групп, мягких тканей грудной и брюшной стенки. (Дата взятия образца опухоли, из которого получена клеточная линия: 19.03. 2003 г.) В марте-апреле 2003 г. проведено 2 курса Араноза + Ронколейкин- без эффекта. Дата смерти: 30.05.2003г.

Mel P. Умеренно дифференцированная клеточная линия mel P получена из опухолевого материала пациента Т.А.А. 1950 года рождения с диагнозом

«Меланома кожи спины T4pN1bM1a». В сентябре 1997 года выполнено иссечение меланомы кожи поясничной области. В июле 1998 г. при контрольном обследовании выявлено прогрессирование заболевания в виде метастатического поражения мягких тканей, с сентября по ноябрь 1998 г. проведено 3 курса полихимиотерапии (Нидран + Дакарбазин + Цисплатин), на фоне которой достигнута стабилизация опухолевого процесса. В январе 1999г. проведена подмышечная лимфаденэктомия справа с иссечением подкожных лимфатических узлов. (дата забора материала, из которого получена клеточная линия 27.01.1999) В августе 1999 г. произошло резкое ухудшение самочувствия, проявляющееся желтушностью склер и кожных покровов. Дальнейшее обследование и лечение проводилось в другом лечебном учреждении. Дата смерти – 18.02.2000г.

Mel Hn. Умеренно дифференцированная клеточная линия mel Hn получена из опухолевого материала пациентки 1946 г.р., с диагнозом «Меланома кожи левого бедра. TхN2M1а». В 1994 году по месту жительства произведено иссечение меланомы левого бедра, в послеоперационном периоде профилактическое лечение не проводилось. При обследовании в январе 2003г. выявлены метастазы в л/узлы левой паховой области. Выполнена операция Дюкена слева. По результатам гистологического исследования в одном из шести удаленных лимфоузлов обнаружен метастаз меланомы. После операции проводилась профилактическая иммунотерапия по схеме: реаферон 3 млн МЕ, через день, в течение 5 месяцев. В июле 2003 года, больная обнаружила на спине опухолевое образование, в сентябре была произведена его пункция, верифицирован метастаз меланомы. Также по данным УЗИ были выявлены метастазы в л/узлы шеи справа, в левой подмышечной области, мягких тканях спины, в послеоперационных рубцах в паховой и подколенной областях слева. С августа по декабрь 2003 года проведено 6 курсов химио- иммунотерапии с кратковременной стабилизацией процесса. Проводилась иммунотерапия вакциной «Аллоген». 19.11.2004г. проведено удаление метастатических узлов в области левого бедра и спины, из которых получена клеточная линия. Далее отмечалось прогрессирование процесса. Дата смерти: 15.03.2005г

Таким образом, пациентка перед удалением опухоли, из которой получена клеточная линия, проходила иммуно- и химиотерапию 2 года.

Mel Kor. Низкодифференцированная клеточная линия mel Kor получена от пациентки К.Г.А. 1949г.р., с диагнозом «Меланома кожи правой голени. Метастазы в подкожную клетчатку, регионарные лимфатические узлы. T4N1M1». В марте 1996 г. больной проведено иссечение меланомы кожи правой голени и операция Дюкена справа (по поводу меланомы, врастающей в подкожную клетчатку с метастазами в паховые л/узлы справа). С августа по январь 1996 г. проведены 4 курса химиотерапии по схеме: дакарбазин 1000 мг/м² в/в 1 раз в 21 день. В апреле 1997 года выявлено прогрессирование: появление метастазов в мягкие ткани правой нижней конечности, проводилась иммунотерапия интроном А и тамоксифеном. С июня по июль 1997г. – 2 курса химиотерапии по схеме: араноза 500 мг/м² в/в 1-3 дни. С августа по сентябрь 2 курса: винбластин + детисен+платидиам. Отмечалась стабилизация состояния, также проводилась иммунотерапия реафероном + Т-активин + виферон. Впоследствии был обнаружен рост отдельных узлов. В декабре 2002 г. были иссечены отдельные метастазы мягких тканей правой нижней конечности. (дата забора материала, из которого получена клеточная линия – 16.12.2002).Затем наблюдалось прогрессирование опухолевого процесса. Дата смерти: 11.04.2003г.

Пациентка получала химиотерапию и иммунотерапию в течение 7 лет перед взятием материала, из которого получена клеточная линия.

Mel Ibr. Низкодифференцированная клеточная линия mel Ibr была получена из опухолевого материала пациентки И.А.У. 1932 г.р., с диагнозом «Меланома кожи левой голени. T_xN1aM1a». В ноябре 1999 г. пациентке было проведено иссечение пигментного образования левой голени (без гистологии), а также проведена операция Дюкена по поводу метастазов в паховые л/узлы слева. В январе 2000 г. появились метастазы в мягкие ткани левого бедра, левую надключичную область. Больной проведен 1 курс полихимиотерапии дакарбазин + ломустин с отрицательной динамикой. С марта по май 2000г. проведено 3 курса ПХТ «Цисплатин + тамоксифен + интрон А» с положительной динамикой. С мая

2000 г. проводилась поддерживающая терапия «тамоксифен + интрон А». В октябре 2000 г. обнаружено прогрессирование заболевания в виде появления метастазов в легких. С октября 2000 г. проведено 2 курса ПХТ «DDF + тамоксифен + интрон А» со смешанным эффектом: исчезновение метастазов в легких (январь 2001 г.), надключичной области слева и увеличение метастатического компонента в мягких тканях левого бедра. В январе 2001г. иссечение метастаза в мягких тканях левого бедра. (дата иссечения опухоли и взятия материала: 24.01.2001 г.) После операции отмечалось отсутствие признаков заболевания, была назначена терапия тамоксифеном (1,5 мес.). В марте 2001 г. отметилось прогрессирование заболевания: метастазы в легкие, мягкие ткани левого бедра. Дата смерти: 21.06.2001 г.

Больная перед взятием опухолевого материала для получения клеточной линии получала иммунотерапию и полихимиотерапию в течение года.

Mel Cher. Низкодифференцированная клеточная линия mel Cher получена из опухолевого материала пациентки Ч.Н.Н., наблюдавшейся с диагнозом «Меланома кожи левой стопы с метастазами в паховые лимфоузлы». Первичная опухоль была удалена в 1998 году, однако через некоторое время были выявлены метастазы, пациентка перед удалением метастаза, из которого получен опухолевый материал для клеточной линии, прошла 16 курсов химиотерапии, а также иммунотерапию (интрон-А, интерферон). Опухолевый материал для клеточной линии был получен в апреле 2003 года.

Mel Is. Низкодифференцированная клеточная линия mel Is получена из опухолевого материала пациента И.Л.В. 1950г.р., с диагнозом: «Меланома кожи левого бедра (T4b2N3M1a) с метастазами в паховые лимфатические узлы с двух сторон, селезенку». В марте 1998 года была иссечена меланома кожи левого бедра, операция Дюкена слева по поводу метастатического поражения паховых л/узлов. В течение 14 месяцев после операции получал иммунотерапию интроном А. В январе 2004г. (дата взятия материала для клеточной линии) удален метастаз меланомы в подкожной клетчатке правой подмышечной области. С марта 2004 г. начат курс лечения реафероном по 5 млн МЕ x 3 раза в нед. В мае 2004 г. в правой

подмышечной области появился метастаз в л/узлы до 3 см. Проведено 2 курса химиотерапии по схеме: араноза 500 мг/м² в/в 1-3 дни. В июле 2004 г. при обследовании отмечено увеличение метастаза в л/узлы правой подмышечной области до 5 см, в левой подмышечной области до 2 см, в правом бедренном треугольнике до 3 см с признаками гиперплазии. Выявлен метастаз в селезенке до 8 см. В июле-августе 2004г. проведено 2 курса CVD (дакарбазин+ цисплатин + винбластин). Отметилось прогрессирование опухолевого процесса с октября 2004г. Дата смерти – 10.03.2005г.

Таким образом, пациент до момента взятия образца, из которого получена клеточная линия, получал только иммунотерапию интроном А.

Mel Gus. Низкодифференцированная клеточная линия mel Gus получена из опухолевого материала пациентки Г.М.К. 1930 г.р., с диагнозом «Меланома кожи правой стопы. Тх N3M1». В 1998 г. выполнено иссечение пигментной опухоли кожи пяточной области правой стопы. В течение последующих 4 лет периодически проводилась криодеструкция по поводу рецидивов. В 2002 году больная обнаружила увеличение л/узла в правой паховой области, в декабре выполнена операция Дюкена справа. Также проводилась криодеструкция рецидива образования пяточной области правой стопы.

В марте 2003г. проведен курс лучевой терапии на паховую область справа, после терапии обнаружены новые метастазы в мягких тканях правой голени. В поликлинике ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина с апреля 2003г. больной проводилась иммунотерапия Т-активином. На фоне иммунотерапии отмечено прогрессирование заболевания, появление новых метастатических очагов на медиальной поверхности правого бедра, на правой голени, в правой подколенной области. В августе 2003г. лечение Т-активином прекращено. Со слов больной, в августе 2003г. в МНИОИ им. Герцена, проводилась лазерная коагуляция очагов, на фоне которой отмечалось прогрессирование заболевания. В ноябре-декабре 2003г. проведен курс лечения Араноза + Реаферон. Дата иссечения опухоли, из которой получена клеточная линия: 13.01.2004 г. Далее пациентка была

направлена под наблюдение онколога по месту жительства. Дата смерти: 02.11.2004 г.

Таким образом, до удаления опухоли, из которой выведена клеточная линия, больная получала лучевую, иммуно- и химиотерапию.

Mel Gi. Низкодифференцированная клеточная линия mel Gi получена из опухолевого материала пациента Ж.А.И. 1946 г.р., с диагнозом «Меланома кожи передней грудной стенки. T4bN3M1a». В июле 2000 г. выполнено иссечение меланомы кожи передней грудной стенки и подмышечная лимфаденэктомия слева. В послеоперационном периоде проведено 4 курса профилактической химиотерапии по схеме: дакарбазин 1000 мг/м² в/в 1 раз в 21 день.

В апреле 2001 г. при контрольном обследовании выявлены 2 мягкотканых метастаза. В июне и сентябре 2001 г. (Дата иссечения опухоли, из которой получена клеточная линия: 11.09.2001 г.) были иссечены 2 метастаза для приготовления аутологичной вакцины из опухолевых клеток, модифицированных геном tag7. В июле 2001 г. проведены 2 курса химиотерапии цисплатином + тамоксифен. Эффект расценен как отрицательный. С ноября 2001 по январь 2002 г. проводилась вакцинация аутовакциной вакциной с количеством клеток от 1 до 15 млн, на фоне которой отмечалось появление новых мягкотканых метастазов. В апреле 2002 г. определялись 5 очагов: на волосистой части головы, поясничной области справа, левой ягодичной области, нижней трети левого бедра, нижней трети левой голени (до 4,6 см). В апреле 2002 г. проведен курс Генасенс + Дакарбазин. Лечение перенес удовлетворительно, из побочных эффектов: гипертермия, тошнота, слабость. Далее направлен под наблюдение онколога по месту жительства. Дата смерти: 20.11.2002г. До удаления опухоли больной получал химиотерапию.

Mel Ch. Низкодифференцированная клеточная линия mel Ch была получена из опухолевого материала пациентки Ч.Н.Т. 1950 г.р., с диагнозом: «Меланома кожи спины. T4bN2M1a». В ноябре 1998 года проводилось иссечение меланомы кожи спины. В апреле 2000 г. – иссечение рецидива в зоне послеоперационного рубца. В сентябре 2000г. – повторное иссечение рецидива в области рубца. Далее

проведено 3 курса профилактической химиотерапии по схеме: дакарбазин 1000 мг/м² в/в 1 раз в 21 день, далее 3 курса иммунотерапии по схеме: интрон А 3 млн МЕ 1-10 дни с перерывом между курсами 2 недели. В октябре 2001 г. выявлены метастазы в подмышечных лимфатических узлах слева. В декабре 2001 г. выполнена подмышечная лимфаденэктомия слева. Проведено 3 курса полихимиотерапии дакарбазин + проспидин. Появились узлы в зоне послеоперационного рубца левой подмышечной области. Проведено 3 курса полихимиотерапии дакарбазин + араноза + винкристин – без эффекта. В августе 2002 г. выполнено иссечение рецидива левой подмышечной области. В сентябре–октябре 2002г. проведена лучевая терапия на зону левой подмышечной области СОД 25 Гр. Отмечено уменьшение узлов. В декабре 2002 г. в левой подмышечной области обнаружены 2 узла- 3 и 1 см, с тенденцией к уменьшению, ниже рубца новый узел до 3 см, который был удален 6.12.2002г, и из которого получена клеточная линия. Далее проводилось лечение дендритноклеточной вакциной. Дата смерти: 01.03.2003г. Больной до взятия опухолевого материала получал химиотерапию, лучевую терапию и иммунотерапию.

Mel Me, mel II, mel R. Нет данных о терапии, проведенной пациентам, из опухолевого материала которых получены клеточные линии mel Me, mel II, mel R. Материал для высокодифференцированной клеточной линии mel Me был получен 22.11.2002г., для умереннодифференцированных клеточных линий mel II – 02.04.2001г. и mel R – 29.06.1999г.

Таким образом, собрана информация по 16 историям болезни. Оказалось, что 6 пациентов до удаления метастазов не получали никакого лечения, кроме хирургического, а 10 пациентов получили химио- и/или иммунотерапию.

В таблице 3 кратко представлена собранная информация о течении заболевания и лечении, полученном пациентами, опухолевый материал которых был использован для создания клеточных линий.

Для дальнейшей работы клеточные линии разделили на группы согласно степени дифференцировки и полученному лечению (табл. 4)

Получение клеточной линии mel Ibr ЕЕМС и mel Cher ЕЕ

Для получения клеточной линии меланомы кожи человека mel Ibr ЕЕМС и mel Cher ЕЕ клетки родительской линии меланомы кожи человека mel Ibr и mel Cher культивировали в среде RPMI-1640 с 5% эмбриональной телячьей сывороткой в течение трех пассажей, затем рассеивали на чашки Петри диаметром 60 мм в количестве 200 – 400 клеток на чашку (в дубликатах) и культивировали в RPMI-1640 с 5% эмбриональной телячьей сывороткой с однократным добавлением 2% эмбрионального экстракта. Смену среды на свежую проводили 1 раз в 3 дня. Через 7 – 10 дней наблюдали образование единичных колоний из клеток веретенообразной формы. Спустя 14 дней колонии снимали раствором Версена и переносили в культуральный флакон 25 см² с ростовой средой для дальнейшего культивирования и наращивания. Культуру, прошедшую 20 пассажей, помещали в среду Methocult-GI H4434 в чашках Петри диаметром 230 мм. Клетки рассеивали в количестве 200 тыс. на чашку и оставляли на рост в инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 10 – 14 дней. Далее клетки культивировали для наращивания в культуральных флаконах 25 см² с ростовой средой. Культура клеточной линии меланомы кожи человека mel Ibr ЕЕМС росла в виде колоний, состоящих из клеток веретенообразной формы, так же как и mel Cher ЕЕ.

Культура клеточной линии меланомы кожи человека mel Ibr ЕЕМС мономорфная, представлена клетками разных форм: вытянутой, веретенообразной с двумя тонкими отростками разной длины. Цитоплазма клеток необильна, окрашена в базофильные тона различной степени интенсивности. Ядра опухолевых клеток крупных размеров, гиперхромные с 1-3 ядрышками. Клетки соединяются в монослой с образованием сфероидов на его поверхности. По морфологическим признакам клеточная линия низкодифференцированная.

Клеточная линия меланомы кожи человека mel Ibr ЕЕМС и mel Cher ЕЕ культивируются в питательной среде RPMI-1640 с 2 mM L-глутамина, 5% ТЭС, 1% NERES, антибиотиков – пенициллина (100 ед/мл), стрептомицина (100мкг/мл) и комплексом аминокислот и витаминов (Flow Lab). Для выращивания культуры

используют пластиковые культуральные флаконы (Costar). Во флаконы объемом 25 см² в 5 мл среды засевают 1×10^6 клеток. Температура культивирования 37°С и 5% CO₂. Монослой клеток формируется через 3–4 дня. Пассаж 1 раз в 3–4 суток. Метод снятия: 0,25% раствор трипсина и 0,02% раствор Версена в соотношении 1:1.

Для длительного хранения клетки консервируют путем замораживания в жидком азоте. Клетки клеточной линии ресуспендируют в среде для замораживания, состоящей из 80% питательной среды RPMI-1640, 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 10% ДМСО. Режим замораживания: жидкий азот, снижение температуры на 1° С в минуту до минус 25° С, затем быстрое замораживание до минус 70° С. Хранение в жидком азоте при температуре минус 196° С. Размораживание быстрое, при температуре 37° С. Клетки разводят в 10 мл бессывороточной среды и осаждают центрифугированием, ресуспендируют в 5 мл той же среды, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, и переносят в культуральный флакон объемом 25 см². Жизнеспособность клеток оценивают по включению трипанового синего. Жизнеспособность клеток после размораживания составляет 90%.

При длительном наблюдении бактерии и грибы в культуре не обнаружены. Тест на наличие микоплазмы отрицательный.

Клеточные линии меланомы кожи человека mel Ibr ЕЕМС и mel Cher ЕЕ обладают стабильными культуральными и морфологическими характеристиками.

2.8. Статистический анализ

Статистический анализ данных включал такие методы, как регрессионный анализ, определение критерия Хи-квадрат. Регрессионный анализ был использован для определения связи количественного процента экспрессии маркеров CD90, CD114, CD117, CD133 и CD271 с такими признаками, как степень дифференцировки клеток и терапия, полученная больными перед получением биоматериала. Критерий хи-квадрат был применен для определения связи качественного уровня экспрессии маркера ABCB5 с параметрами

дифференцировки клеток и наличием либо отсутствием терапии перед выведением клеточных линий. Для всех типов анализа результаты считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$. Анализ проводился в программе STATISTICA 10.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в рамках программы по созданию противоопухолевых вакцин в 2005 г. получена большая коллекция клеточных линий метастатической меланомы кожи человека из опухолевого материала больных, проходивших лечение в НИИ клинической онкологии [20,3]. Эти клеточные линии охарактеризованы по степени дифференцировки, иммунологическому фенотипу и по наличию раково-тестикулярных генов, однако экспрессия маркеров СКО на них не изучалась [19,18,3]. Исследование экспрессии маркеров СКМ способно раскрыть возможности воздействия на минорную популяцию стволовых клеток, вызывающих опухоль, с помощью таргетного механизма против определяемых антигенов.

В настоящем исследовании использовали клеточные линии метастатической меланомы человека mel Mtp, mel Z, mel Kor, mel Ibr, mel P, mel Cher, mel Is, mel Me, mel H, mel Hn, mel Bgf, mel Si, mel Rac, mel Gus, mel Gi, mel Ksen, mel Ch, mel П, mel R из банка клеточных культур лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, а также исследовались истории болезни пациентов, от которых получены вышеуказанные клеточные линии (описание в разделе " Материалы и методы").

Для дальнейшей работы клеточные линии были разделены на группы согласно степени дифференцировки и полученному лечению (табл. 3)

Таблица 3 – Характеристика клеточных линий меланомы

Клеточные линии	Высокодифференцированные	Умереннодифференцированные	Низкодифференцированные
из опухолевого материала пациентов, не получавших лекарственной терапии	–	mel Z, mel Bgf, mel Ksen	mel Mtp, mel H, mel Rac
из опухолевого материала пациентов, получавших иммунотерапию и химиотерапию	mel Si	mel P, mel Hn	mel Kor, mel Ibr, mel Cher, mel Is*, mel Gus, mel Gi, mel Ch
Нет данных о пациентах	mel Me	mel II, mel R	–

*пациент получал только иммунотерапии

3.1. Экспрессия маркеров, ассоциированных со стволовыми клетками опухоли на клеточных линиях меланомы человека

Согласно литературным данным, для СК меланомы характерно наличие антигенов: CD133, CD271, CD117, CD114, гиперэкспрессия белков-транспортеров, в частности, ABCB5 [73].

В данной работе мы изучили на клеточных линиях меланомы человека экспрессию антигенов, ассоциированных с СК меланомы (CD90, CD114, CD117, CD133, CD271 и ABCB5), а также исследовали экспрессию антигенов, которые в литературных источниках описаны как маркеры СК других злокачественных новообразований: CD90, CD24, CD44.

Экспрессию антигенов CD90, CD114, CD117, CD133, CD271 определяли в прямой реакции иммунофлуоресценции, результаты которой оценивали на проточном цитофлуориметре FACSCantoII. Результат считали положительным, при экспрессии 5% и более антиген-презентирующих клеток.

В качестве отрицательного контроля использовали изоспецифические антитела. В отрицательном контроле показатели не превышали 0,5% клеток.

Результаты экспрессии антигенов, ассоциированных с СК меланомы, представлены в табл. 4-7. Как видно из таблиц, экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, была гетерогенна.

Таблица 4 – Экспрессия антигенов CD24, CD44, и CD90, ассоциированных с СКО, на клеточных линиях меланомы человека

№ п/п	Название линии	Процент антиген-положительных клеток		
		CD24	CD44	CD90
1.	mel Mtp	0,8±0,1	99,7±0,3	0,1±0,1
2.	mel Z	1,7±0,2	99,9±0,1	4,5±0,7
3.	mel Kor	0,4±0,1	95,4±4,2	0,6±0,5
4.	mel Ibr	1,3±0,1	99,7±0,3	59,6±4,4
5.	mel P	0,5±0,1	99,9±0,1	0,0±0,0
6.	mel Cher	0,2±0,2	76,2±4,4	0,9±0,1
7.	mel Is	0,1±0,1	99,8±0,2	0,1±0,1
8.	mel Me	0,3±0,1	99,3±0,7	0,3±0,1
9.	mel H	0,4±0,1	88,9±2,4	1,3±1,0
10.	mel Hn	0,3±0,1	99,7±3,2	0,3±0,1
11.	mel Bgf	0,1±0,1	99,7±0,3	0,9±0,1
12.	mel Si	0,1±0,1	99,9±0,1	0,7±0,1
13.	mel Rac	0,6±0,1	98,8±1,2	1,5±0,3
14.	mel Gus	0,2±0,2	99,7±0,3	0,1±0,1
15.	mel Gi	2,8±1,9	99,1±0,9	0,5±0,3
16.	mel Ksen	0,1±0,1	97,9±1,4	0,1±0,1
17.	mel Ch	0,1±0,1	98,4±0,7	0,0±0,0
18.	mel Il	1,1±0,3	97,8±0,1	0,1±0,1
19.	mel R	7,3±0,6	99,2±0,8	77,2±3,5

Все клеточные линии меланомы имели фенотип CD24⁻/CD44⁺. CD 44 экспрессировался 99±0,9% клеток 17 клеточных линий. На двух клеточных линиях CD44 экспрессировался меньшим процентом клеток: mel Cher – 76,2%, mel H – 88,9% (таблица 4).

Экспрессия CD24 является прогностическим признаком, коррелирующим с низкой выживаемостью у больных меланомой [115]. Однако только одна из 19 исследованных клеточных линий метастатической меланомы содержала небольшой процент клеток, экспрессирующих CD24: mel R (7,3%) (таблица 4).

Экспрессия CD44, антигена, ответственного за миграцию опухолевых клеток, по данным многих исследователей достоверно коррелирует с

лимфогенным метастазированием опухоли, стадией заболевания и снижением общей выживаемости больных при многих злокачественных новообразованиях, в том числе при меланоме. В нашем исследовании все 19 клеточных линий метастатической меланомы были CD44-положительными (таблица 4).

Антиген CD90 участвует в регуляции клеточной адгезии, миграции, ангиогенеза и является важным прогностическим маркером при многих видах рака. О его экспрессии при меланоме в мировой литературе, информации недостаточно. Мы обнаружили, что CD90 экспрессировали 2 клеточные линии: mel Ibr (59,6%) и mel R (77,2%).

На исследованных клеточных линиях меланомы человека часто встречалась экспрессия антигена CD114 (рецептора ГКСФ), который по литературным данным относится к маркерам СК опухолей тканей, происходящих в эмбриогенезе из нервного гребня. Экспрессия CD114 является по мнению ряда исследователей признаком прогрессирования и плохого прогноза заболевания (например, глиом).

CD114 экспрессировался клетками 13 линий из 19, но небольшим процентом клеток (таблица 5).

Таблица 5 – Экспрессия антигена CD114 в клеточных линиях меланомы человека

Клеточные линии	Высоко дифференцированные	Умеренно дифференцированные	Низко дифференцированные
из опухолевого материала пациентов, не получавших лекарственной терапии	–	mel Bgf (9,5%)	mel H (11,0%) mel Rac (5,2%)
Клеточные линии из опухолевого материала пациентов, получавших иммунотерапию и химиотерапию	mel Si (15,3%)	mel P (10,0%)	mel Kor (19,2%) mel Ibr (8,9%) mel Cher (26,5%) mel Is (6,0%) mel Gus (5,3%) mel Ch (15,7%)
Нет данных о лечении	mel Me (11,6%),	mel Il (6,0%)	–

Как видно из представленных результатов, CD114 чаще экспрессировался клетками низкодифференцированных линий и линий, полученных из опухолевого материала больных после химио- и иммунотерапии (таблица 6), таким образом экспрессия CD 114 может свидетельствовать об агрессивности течения и рефрактерности к терапии. В таблице 6 представлены результаты, на рис. 1, рис.2. наглядно представлены различия в экспрессии CD 114 на клеточных линиях из опухолевого материала пациентов, получавших/ не получавших химиотерапию и иммунотерапию.

Таблица 6 – Экспрессия антигенов CD114, CD117, CD133 и CD271 на клеточных линиях меланомы человека

№ п/п	Название линии	Процент антиген-положительных клеток			
		CD114	CD117	CD133	CD271
1.	mel Mtp	0,6±0,1	0,6±0,2	0,5±0,1	4,0±0,3
2.	mel Z	4,8±0,3	1,4±0,3	0,3±0,1	19,4±0,8
3.	mel Kor	19,2±1,1	99,6±0,3	0,0±0,0	6,8±0,7
4.	mel Ibr	8,9±0,5	0,2±0,1	8,5±0,0	68,8±4,1
5.	mel P	10,0±0,9	0,3±0,2	7,6±1,3	13,8±1,2
6.	mel Cher	26,5±0,5	3,7±3,0	8,4±0,8	68,6±1,0
7.	mel Is	6,0±0,9	4,7±2,2	0,2±0,1	21,1±1,9
8.	mel Me	11,6±1,2	5,2±0,6	0,1±0,1	76,1±3,4
9.	mel H	11,0±1,1	1,1±0,9	0,6±0,1	44,0±2,0
10.	mel Hn	0,0±0,0	0,2±0,1	0,9±0,1	55,6±5,1
11.	mel Bgf	9,5±0,9	0,4±0,3	0,5±0,1	9,5±1,0
12.	mel Si	15,3±1,3	6,8±1,7	0,4±0,1	68,6±3,3
13.	mel Rac	5,2±0,4	0,4±0,1	0,4±0,1	42,8±4,1
14.	mel Gus	5,3±0,3	0,3±0,0	0,1±0,1	2,2±0,3
15.	mel Gi	0,0±0,0	1,8±0,9	1,4±0,1	80,5±5,3
16.	mel Ksen	0,1±0,1	0,2±0,1	2,1±0,5	61,5±4,4
17.	mel Ch	15,7±1,3	0,2±0,1	0,0±0,0	71,4±3,3
18.	mel Il	6,0±0,9	81,7±0,9	0,2±0,1	19,6±0,9
19.	mel R	3,9±0,9	1,9±1,1	3,0±0,3	25,8±1,5

Экспрессия CD 114 на клеточных линиях из опухолевого материала пациентов, получавших химиотерапию и иммунотерапию.

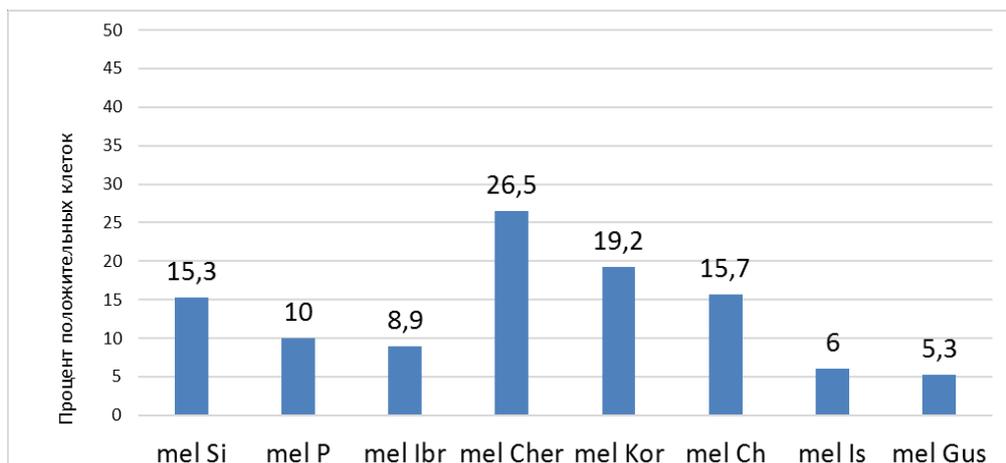


Рисунок 1 — Экспрессия CD 114 на клеточных линиях из опухолевого материала пациентов, получавших химиотерапию и иммунотерапию.

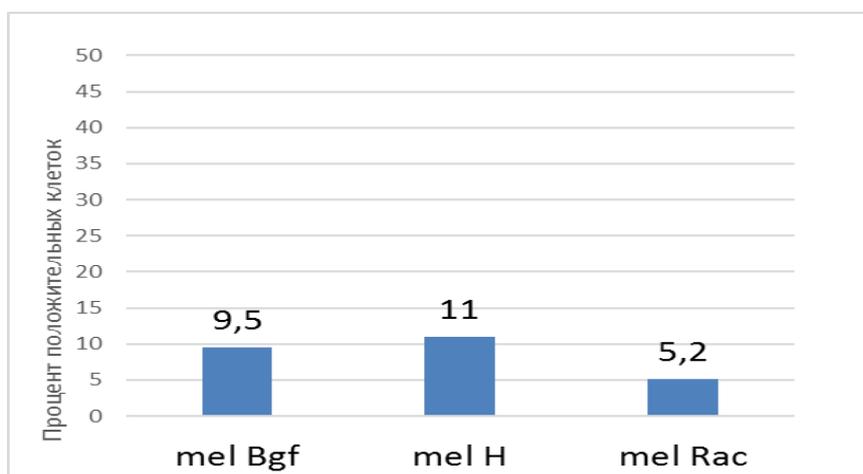


Рисунок 2 — Экспрессия CD 114 на клеточных линиях из опухолевого материала пациентов, не получавших лекарственную терапию.

Антиген CD117 по литературным данным относят к маркерам СКО при раке яичника. При других злокачественных опухолях рассматривают его коэкспрессию с CD44 в качестве признака СКО. Среди 19 исследованных нами клеточных линий метастатической меланомы CD117 экспрессировали 4: две высокодифференцированные линии mel Me и mel Si имели небольшой процент CD117-положительных клеток (5,2% и 6,8% соответственно, таблица 6, рис. 16, рис.6), умереннодифференцированная линия mel H (таблица 6, рис. 17) имела 81,7%, а низкодифференцированная линия mel Kor – 99,6% CD117-положительных клеток (таблица 6, рис. 9).

Антиген CD133 присутствует на стволовых опухолевых клетках многих солидных, эпителиальных опухолей и является одним из наиболее изученных прогностических маркеров. В литературе CD133 и CD271 чаще всего рассматриваются в качестве маркеров СК меланомы. CD133-положительные клетки встречались в 3 линиях, полученных из опухолевого материала пациентов после химиотерапии: умеренно дифференцированной mel P (6,2%) и низкодифференцированных mel Ibr (8,5%), mel Cher (8,4%) (таблица 6, рис. 7,10,11).

Антиген CD271, известный как рецептор фактора роста нервной ткани, экспрессируется на СК, имеющих происхождение из нервного гребня. Наиболее часто на клеточных линиях меланомы нами была выявлена экспрессия именно этого маркера. CD271 экспрессировали 16 из 19 клеточных линий. Чаще экспрессия CD271 наблюдалась в клеточных линиях из опухолевого материала пациентов, ранее получавших химиотерапию (таблица 7, рис.3-5).

Таблица 7 – Экспрессия антигена CD271 в клеточных линиях меланомы человека

Клеточные линии	Высоко дифференцированные	Умеренно дифференцированные	Низко дифференцированные
из опухолевого материала пациентов, не получавших лекарственной терапии	–	mel Ksen (61,5%); mel Z (19,4%)	mel H (44,0%); mel Rac (42,8%)
Клеточные линии из опухолевого материала пациентов, получавших иммунотерапию и химиотерапию	mel Si (68,6%)	mel Hn (55,6%); mel P (13,8%)	mel Gi (80,5%); mel Ch (71,4%); mel Ibr (68,8%); mel Cher (68,6%); mel Is (21,1%); mel Kor (6,8%)
Нет данных о лечении	mel Me (76,1%)	mel R (25,8%); mel П (19,6%),	–

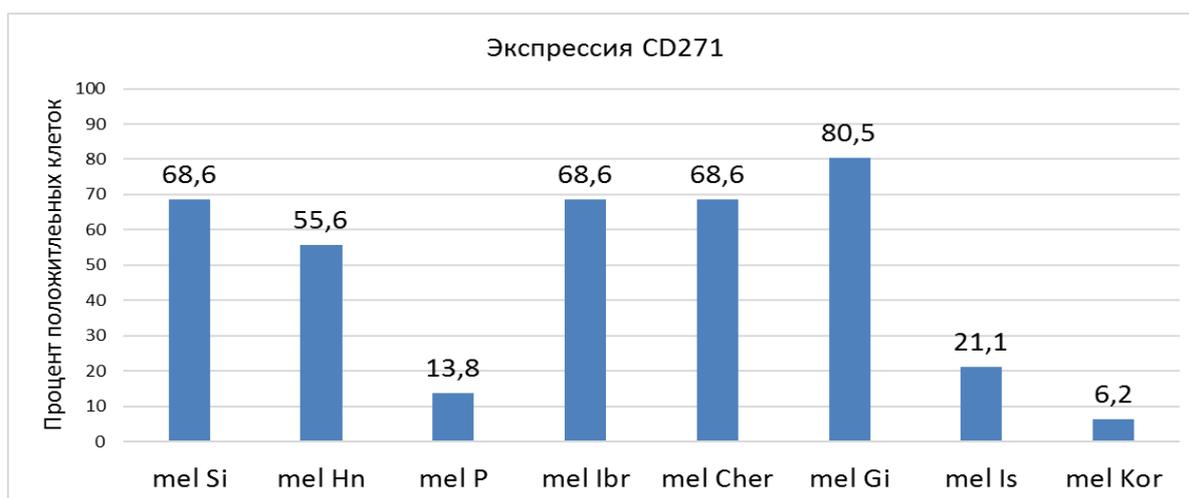


Рисунок 3 — Экспрессия CD271 на клеточных линиях из опухолевого материала пациентов, получавших химиотерапию и иммунотерапию.

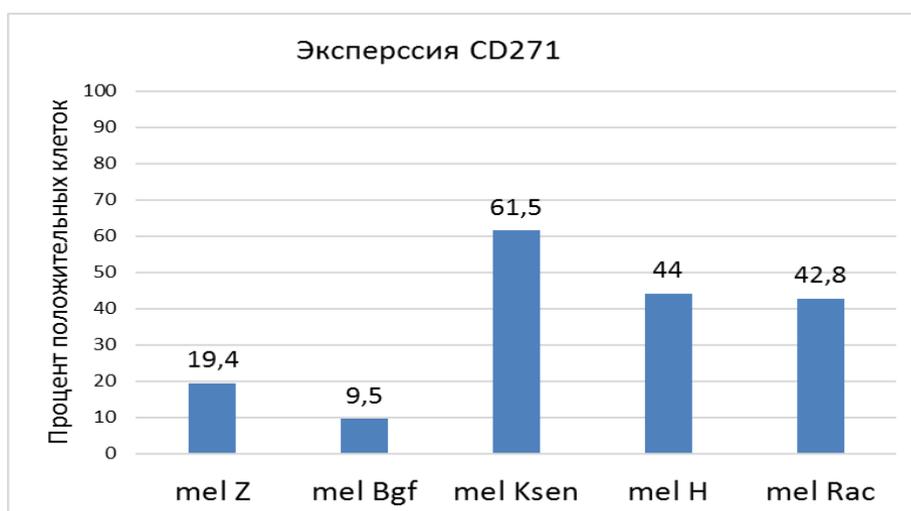


Рисунок 4 — Экспрессия CD271 на клеточных линиях из опухолевого материала пациентов, не получавших лекарственную терапию.

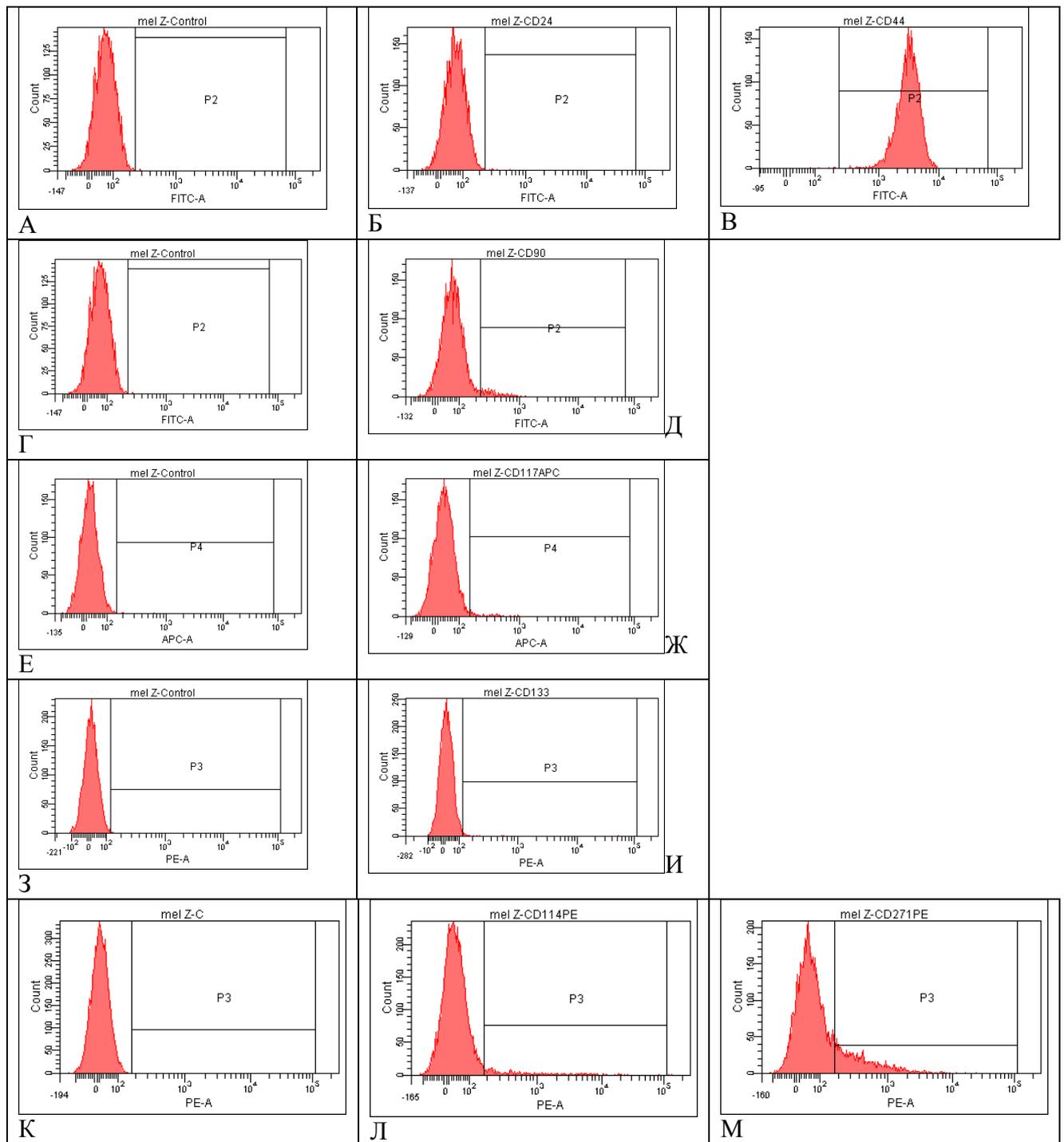


Рисунок 5 — Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках mel Z: А, Г, Е, З, К – негативный контроль; Б – CD24-FITC; В – CD44-FITC; Д – CD90-FITC; Ж – CD117-APC; И – CD133-PE; Л – CD114-PE; М – CD271-PE.

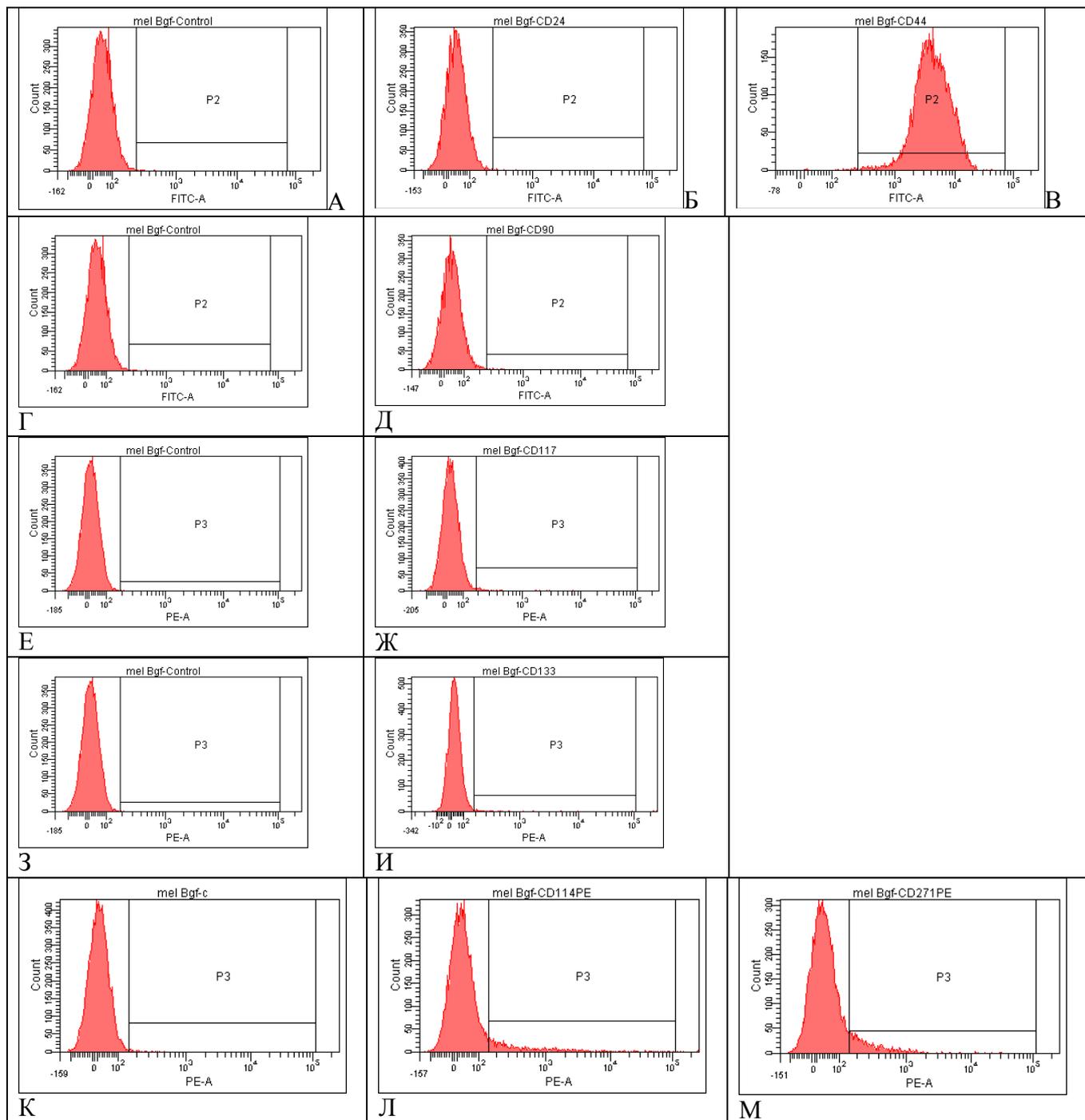


Рисунок 6 — Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках mel Bgf: А, Г, Е, З, К – негативный контроль; Б – CD24-FITC; В – CD44-FITC; Д – CD90-FITC; Ж – CD117-PE; И – CD133-PE; Л – CD114-PE; М – CD271-PE.

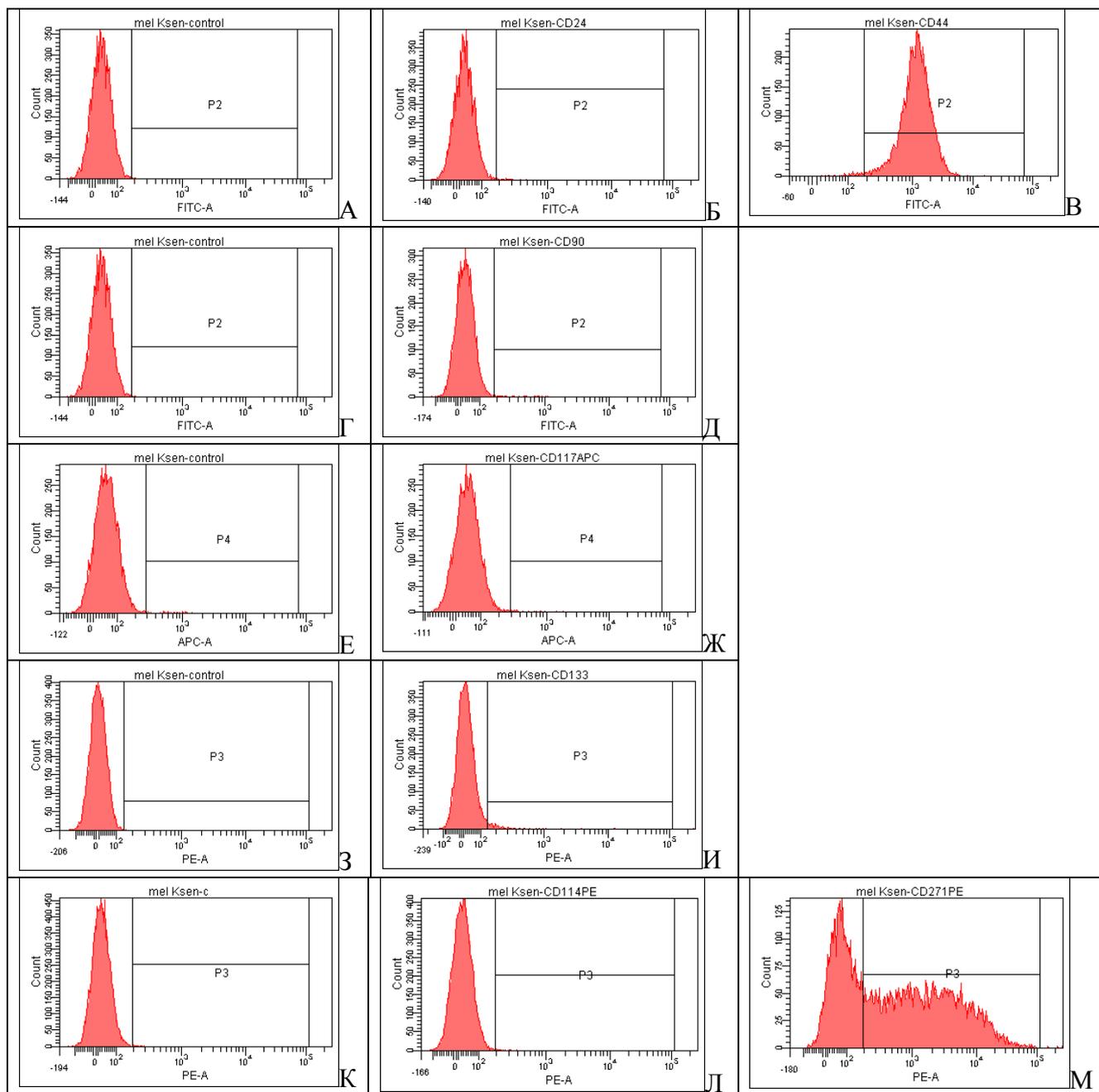


Рисунок 7— Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках mel Ksen: А, Г, Е, З, К – негативный контроль; Б – CD24-FITC; В – CD44-FITC; Д – CD90-FITC; Ж – CD117-APC; И – CD133-PE; Л – CD114-PE; М – CD271-PE.

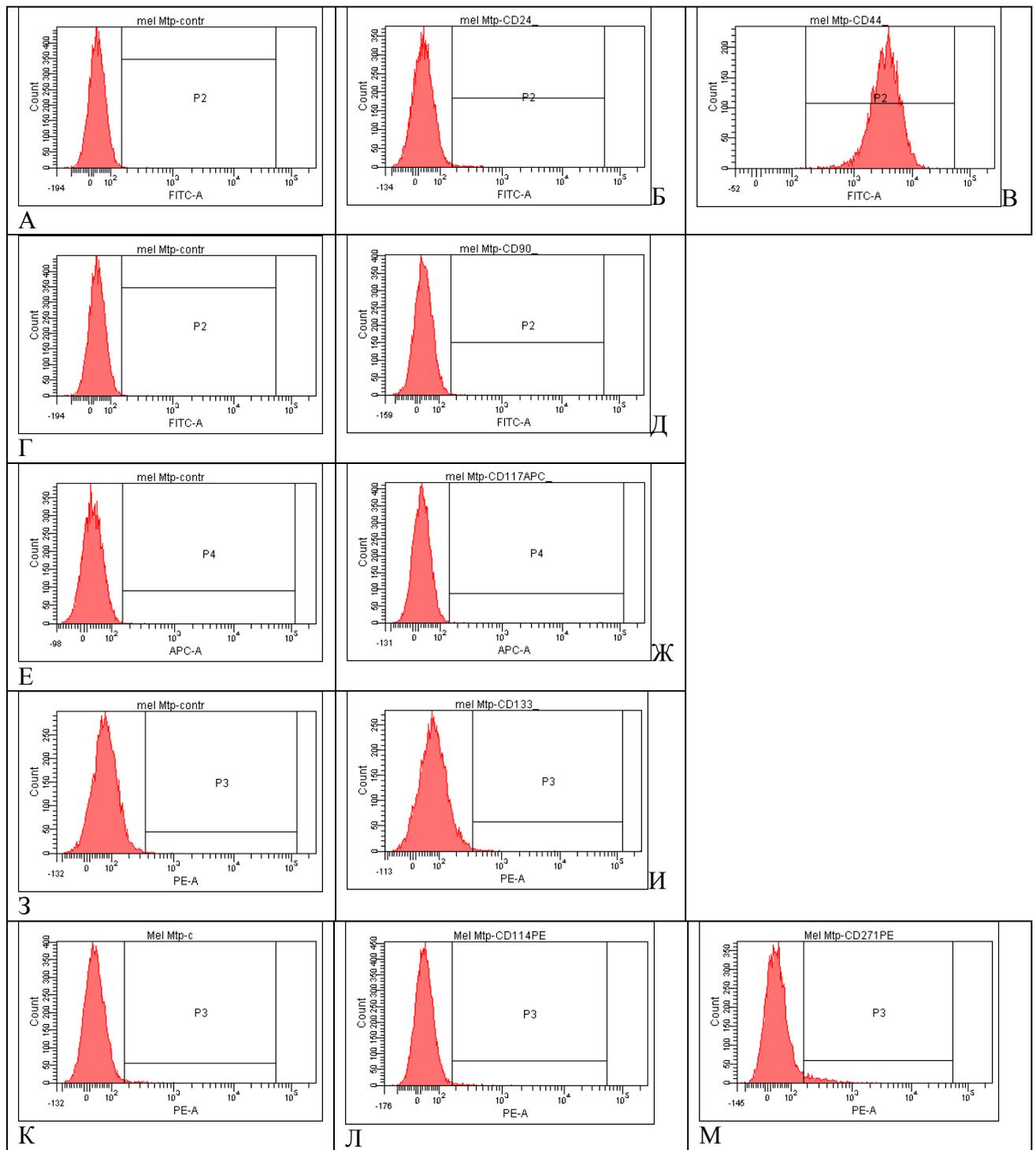


Рисунок 8— Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках mel Mtp: А, Г, Е, З, К – негативный контроль; Б – CD24-FITC; В – CD44-FITC; Д – CD90-FITC; Ж – CD117-APC; И – CD133-PE; Л – CD114-PE; М – CD271-PE.

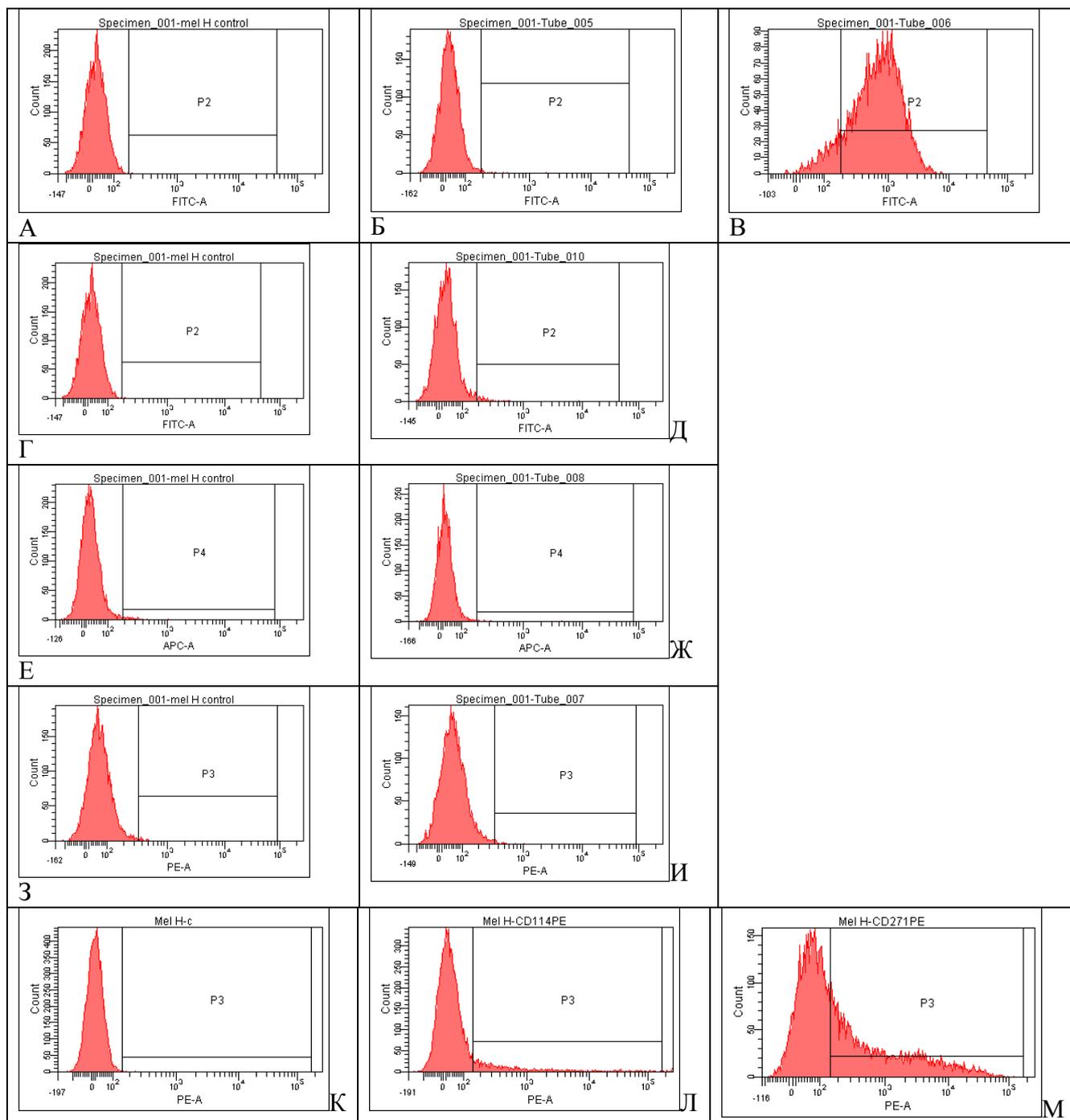


Рисунок 9— Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках mel H: А, Г, Е, З, К – негативный контроль; Б – CD24-FITC; В – CD44-FITC; Д – CD90-FITC; Ж – CD117-APC; И – CD133-PE; Л – CD114-PE; М – CD271-PE.

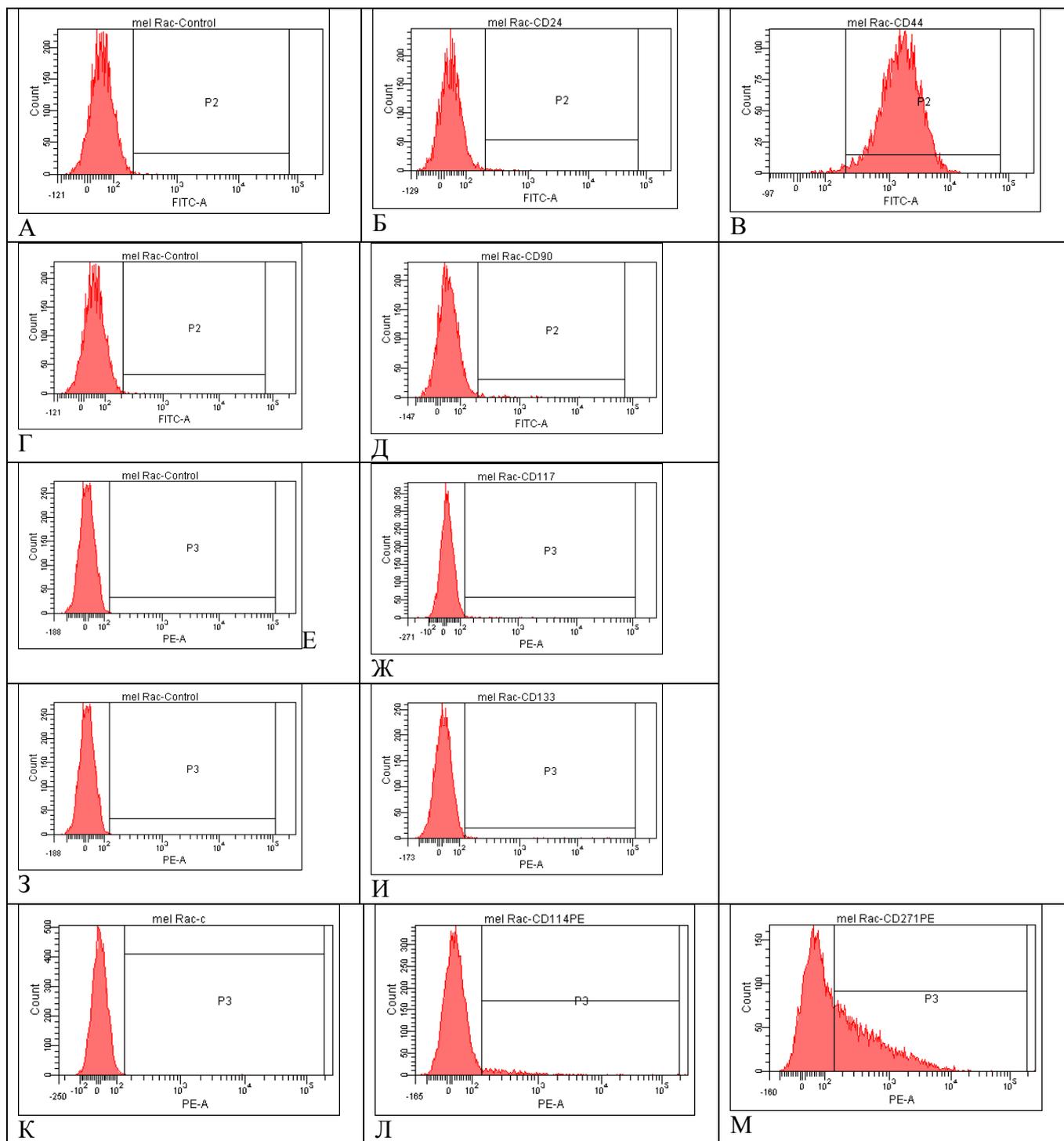


Рисунок 10— Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках mel Rac: А, Г, Е, З, К – негативный контроль; Б – CD24-FITC; В – CD44-FITC; Д – CD90-FITC; Ж – CD117-PE; И – CD133-PE; Л – CD114-PE; М – CD271-PE.

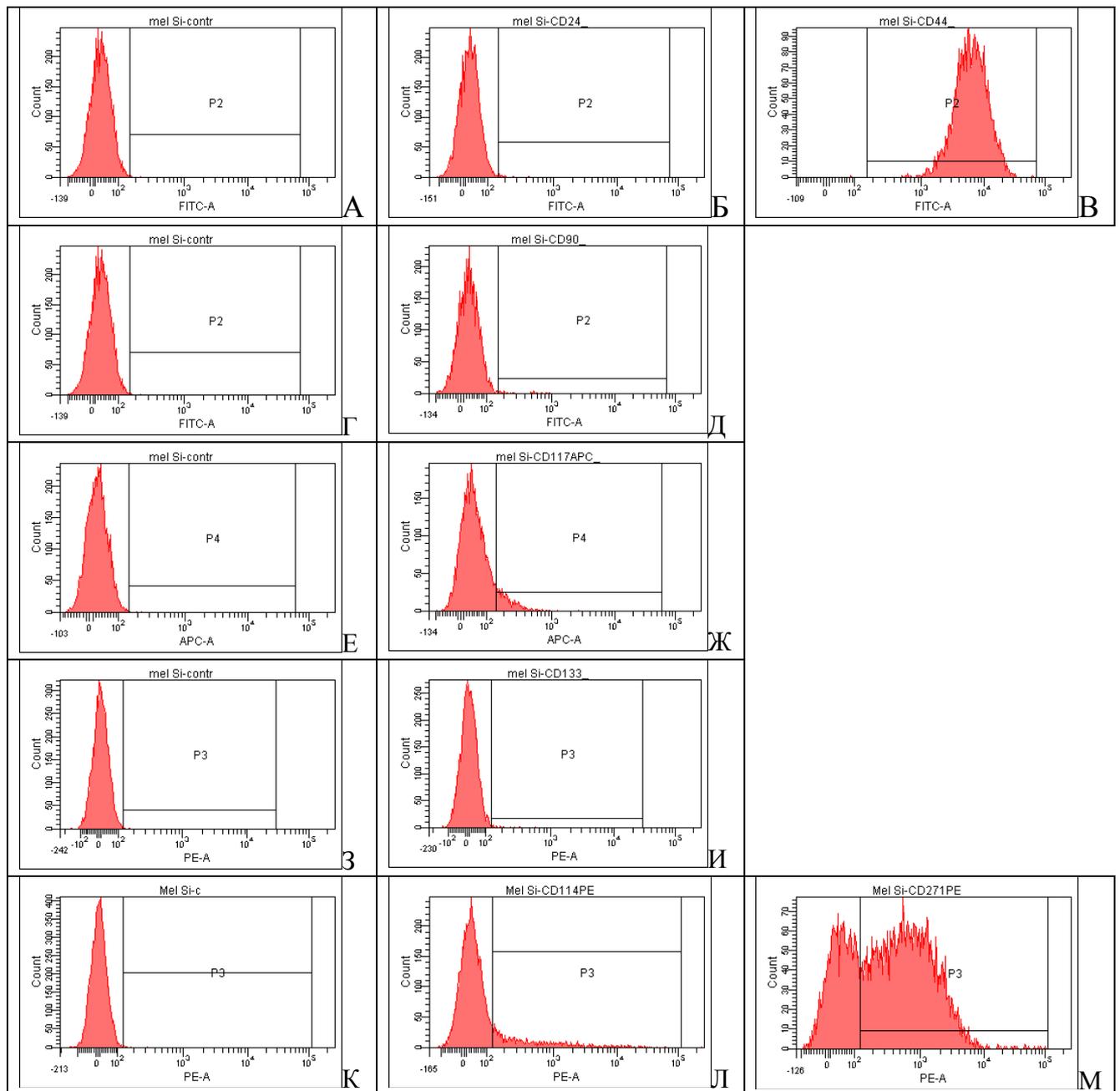


Рисунок 11— Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках mel Si: А, Г, Е, З, К – негативный контроль; Б – CD24-FITC; В – CD44-FITC; Д – CD90-FITC; Ж – CD117-APC; И – CD133-PE; Л – CD114-PE; М – CD271-PE.

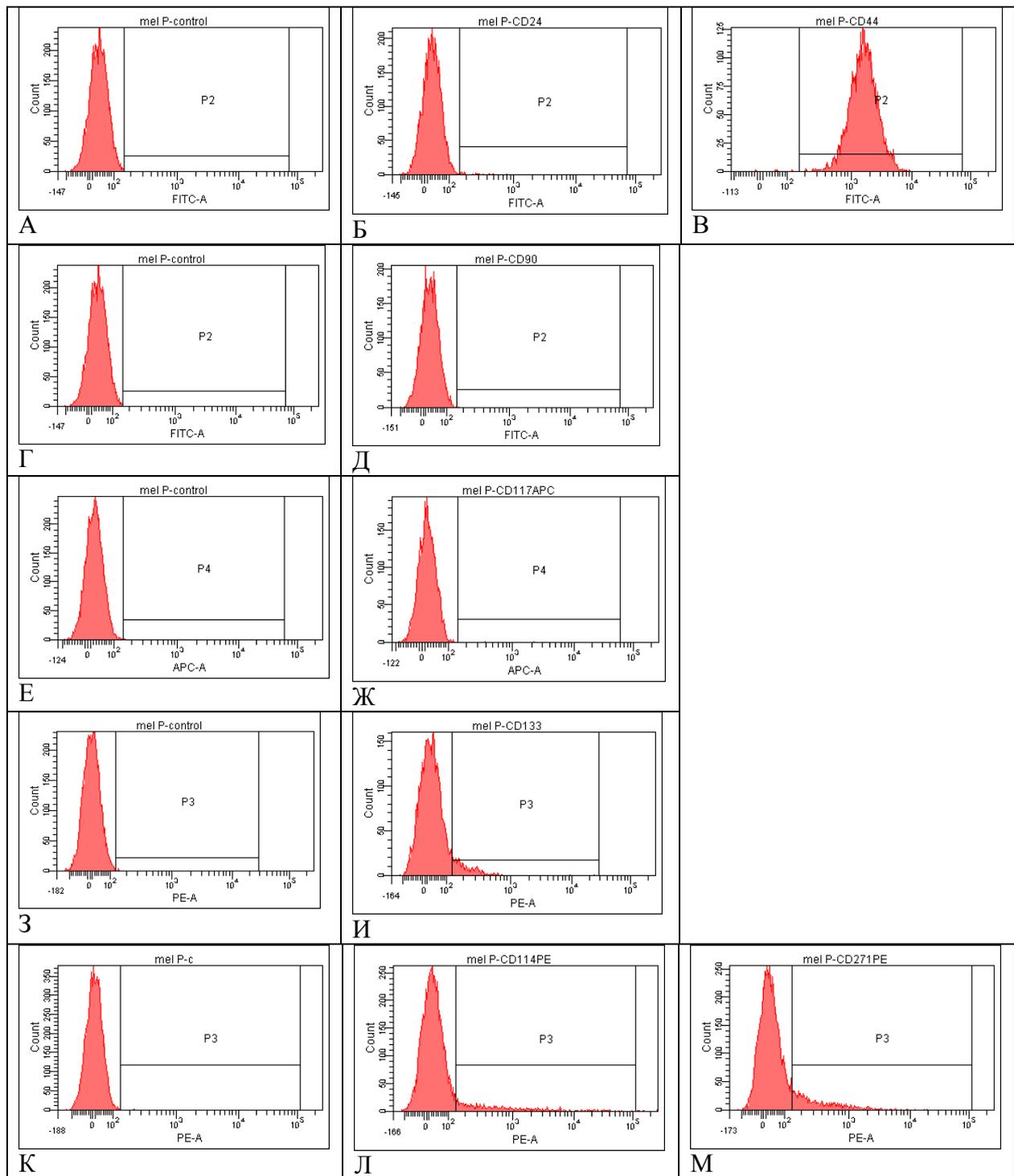


Рисунок 12— Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках mel P: А, Г, Е, З, К – негативный контроль; Б – CD24-FITC; В – CD44-FITC; Д – CD90-FITC; Ж – CD117-APC; И – CD133-PE; Л – CD114-PE; М – CD271-PE.

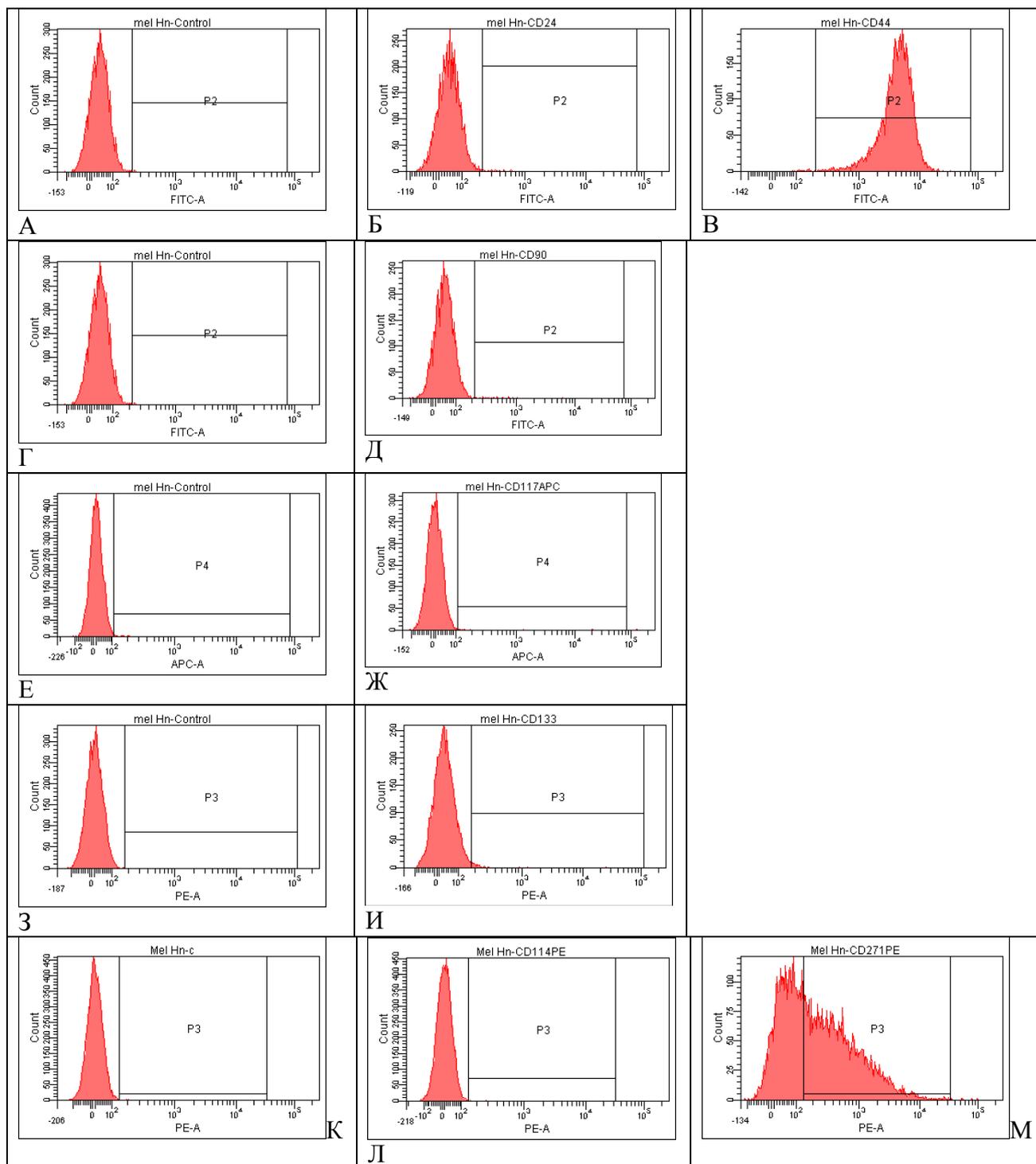


Рисунок 13— Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках mel Hn: А, Г, Е, З, К – негативный контроль; Б – CD24-FITC; В – CD44-FITC; Д – CD90-FITC; Ж – CD117-APC; И – CD133-PE; Л – CD114-PE; М – CD271-PE.

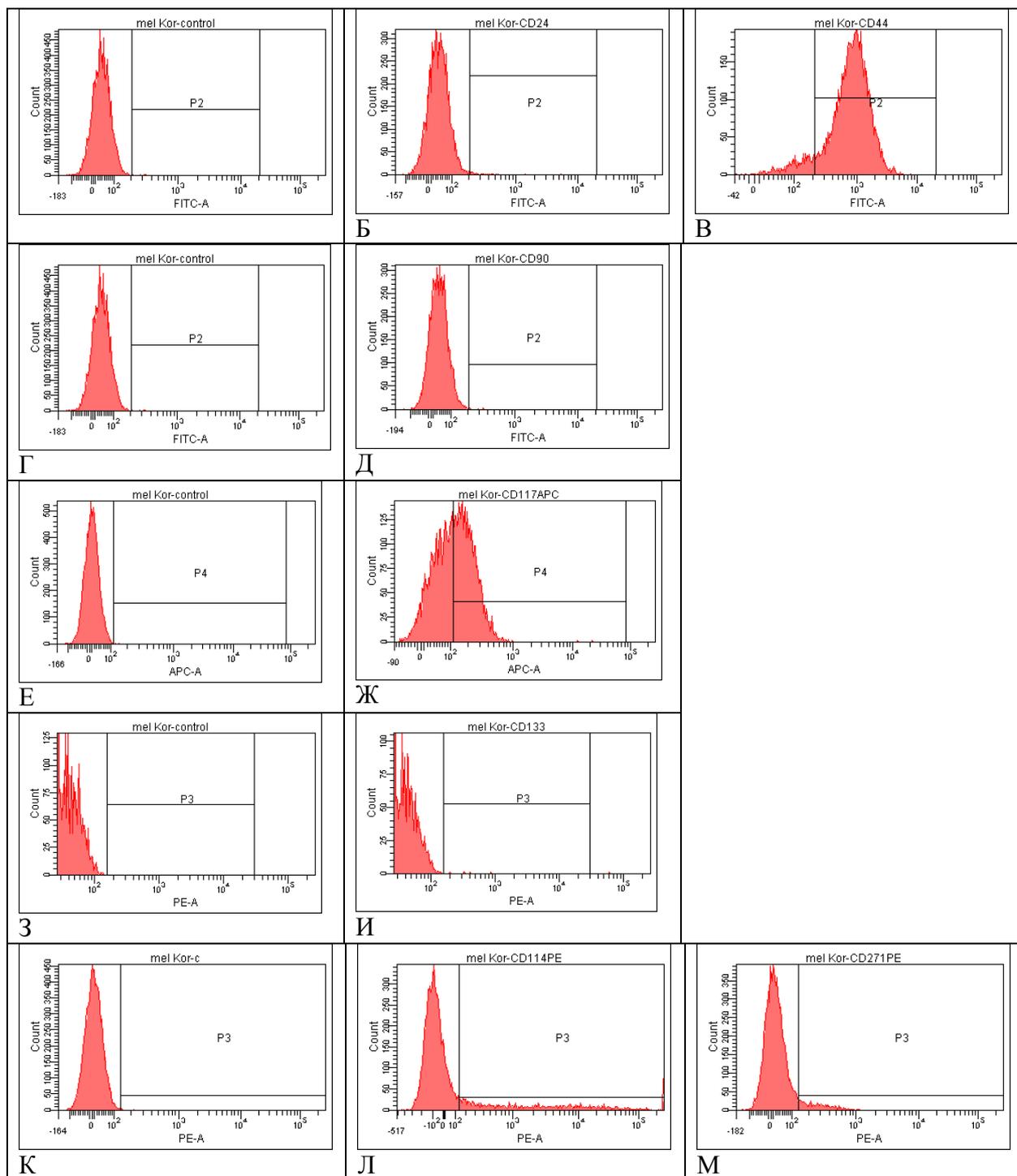


Рисунок 14— Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках mel Kor: А, Г, Е, З, К – негативный контроль; Б – CD24-FITC; В – CD44-FITC; Д – CD90-FITC; Ж – CD117-APC; И – CD133-PE; Л – CD114-PE; М – CD271-PE.

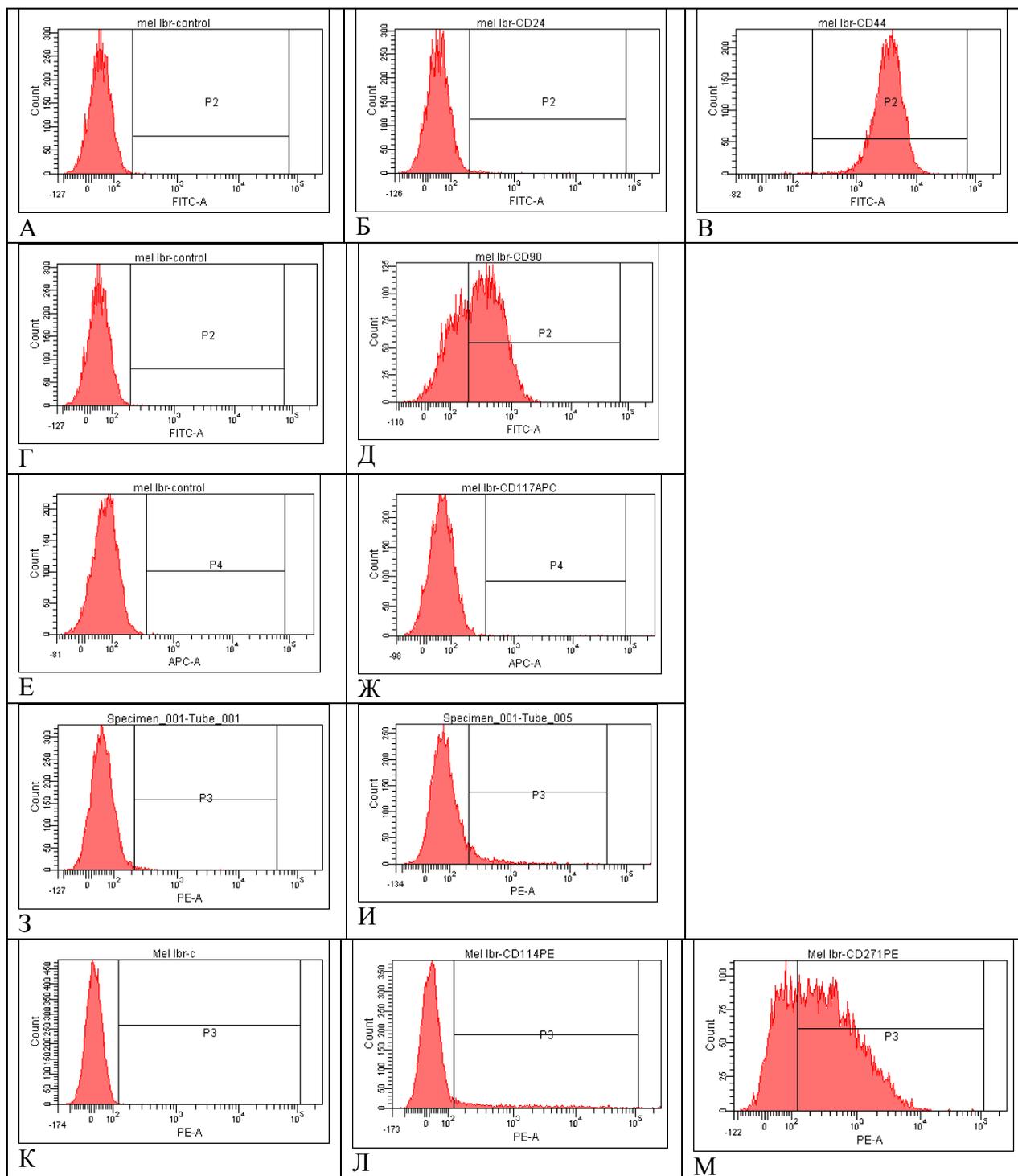


Рисунок 15 — Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках mel Ibr:

А, Г, Е, З, К – негативный контроль; Б – CD24-FITC; В – CD44-FITC; Д – CD90-FITC; Ж – CD117-APC; И – CD133-PE; Л – CD114-PE; М – CD271-PE.

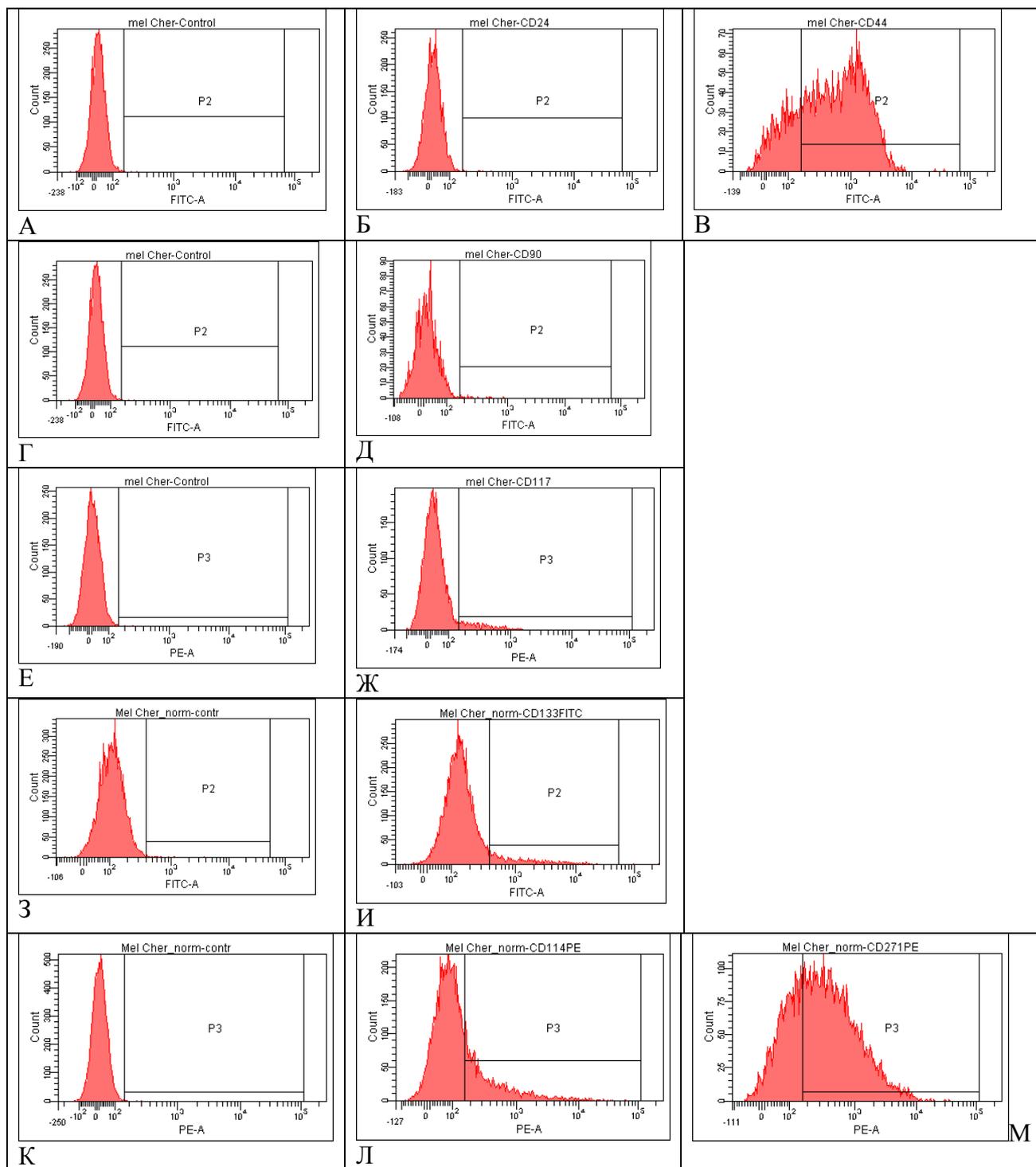


Рисунок 16— Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках melCher: А, Г, Е, З, К – негативный контроль; Б – CD24-FITC; В – CD44-FITC; Д – CD90-FITC; Ж – CD117-PE; И – CD133-PE; Л – CD114-PE; М – CD271-PE.

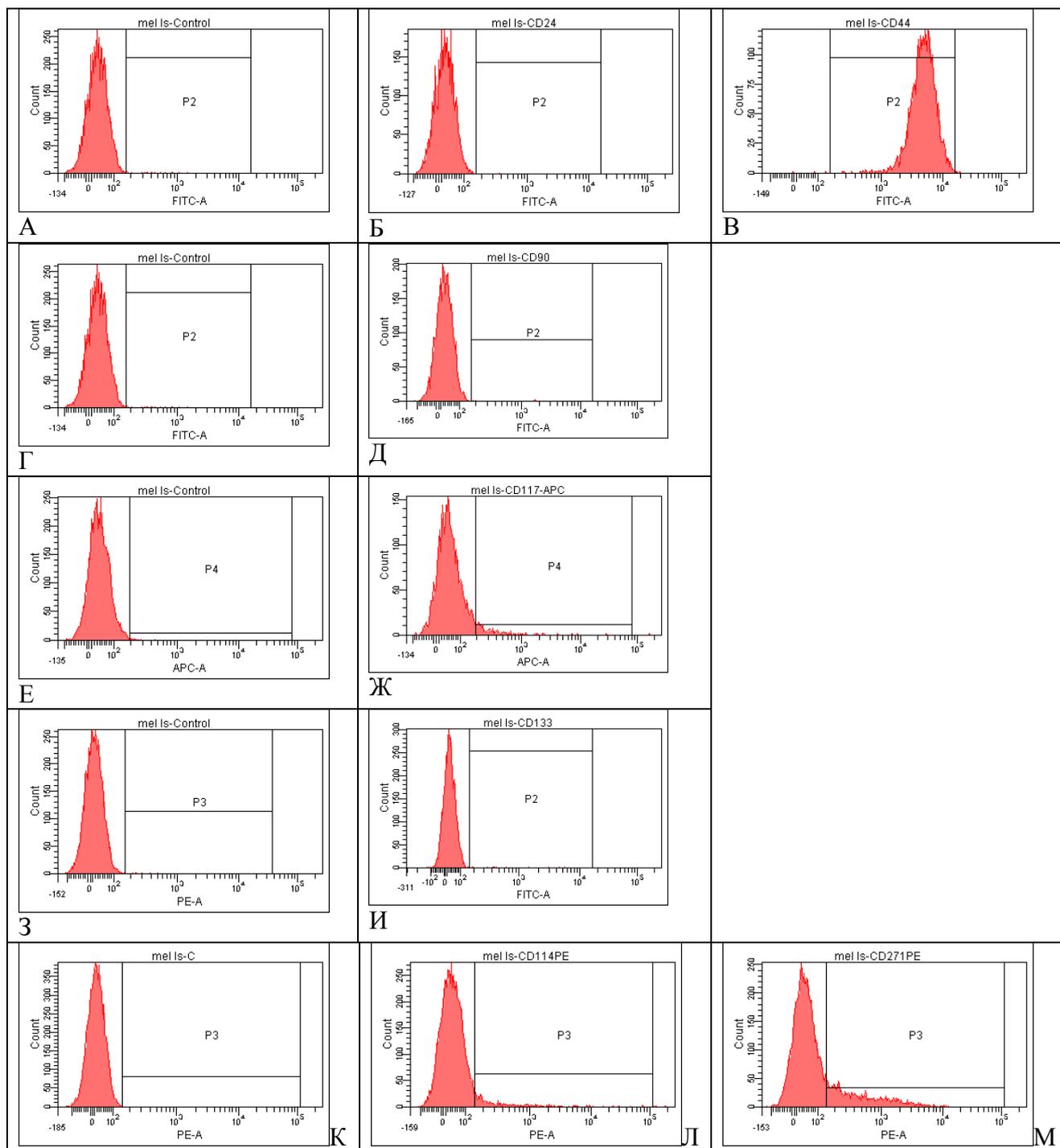


Рисунок 17— Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках mel Is: А, Г, Е, З, К – негативный контроль; Б – CD24-FITC; В – CD44-FITC; Д – CD90-FITC; Ж – CD117-APC; И – CD133-PE; Л – CD114-PE; М – CD271-PE.

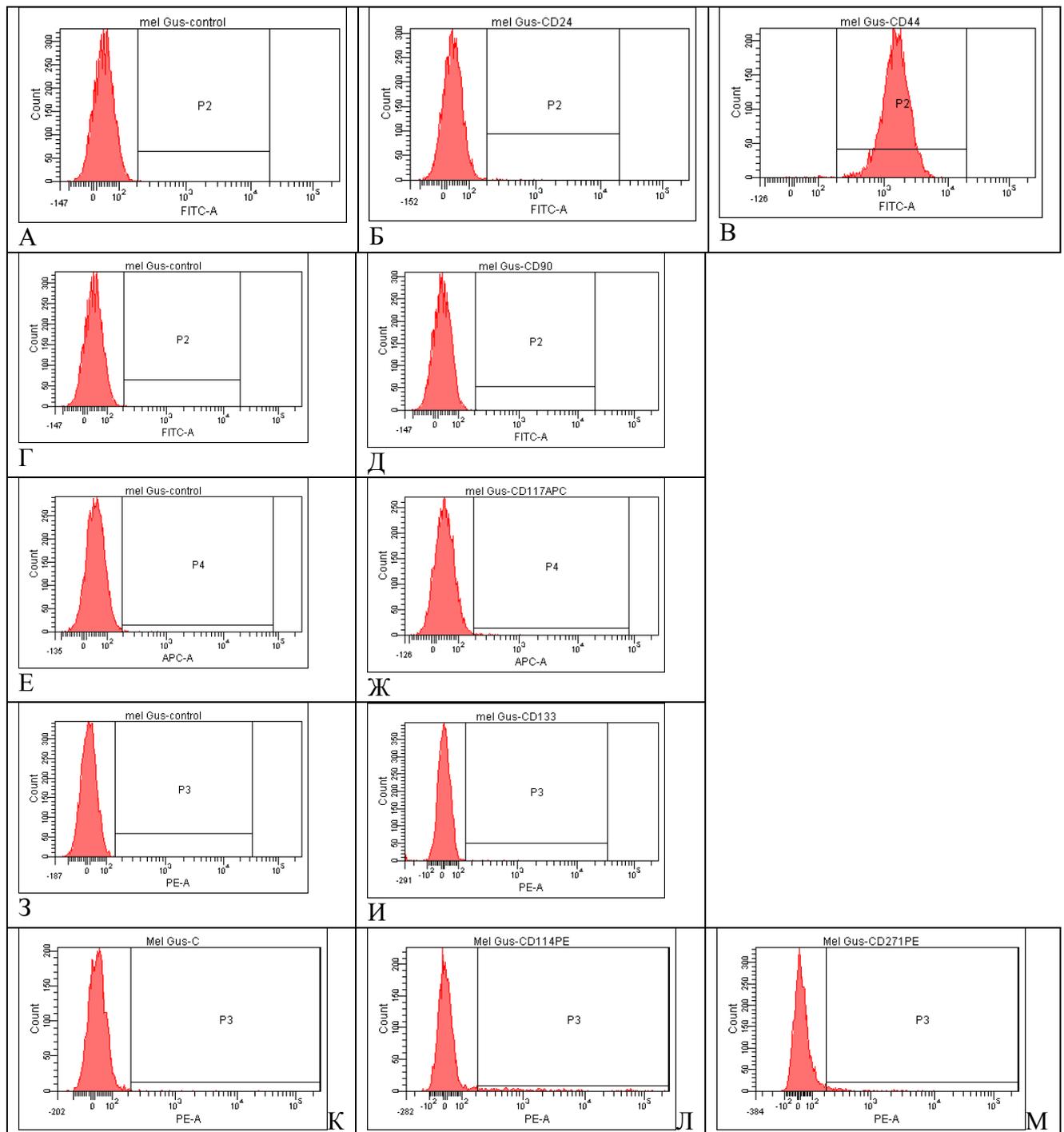


Рисунок 18— Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках mel Gus: А, Г, Е, З, К – негативный контроль; Б – CD24-FITC; В – CD44-FITC; Д – CD90-FITC; Ж – CD117-APC; И – CD133-PE; Л – CD114-PE; М – CD271-PE.

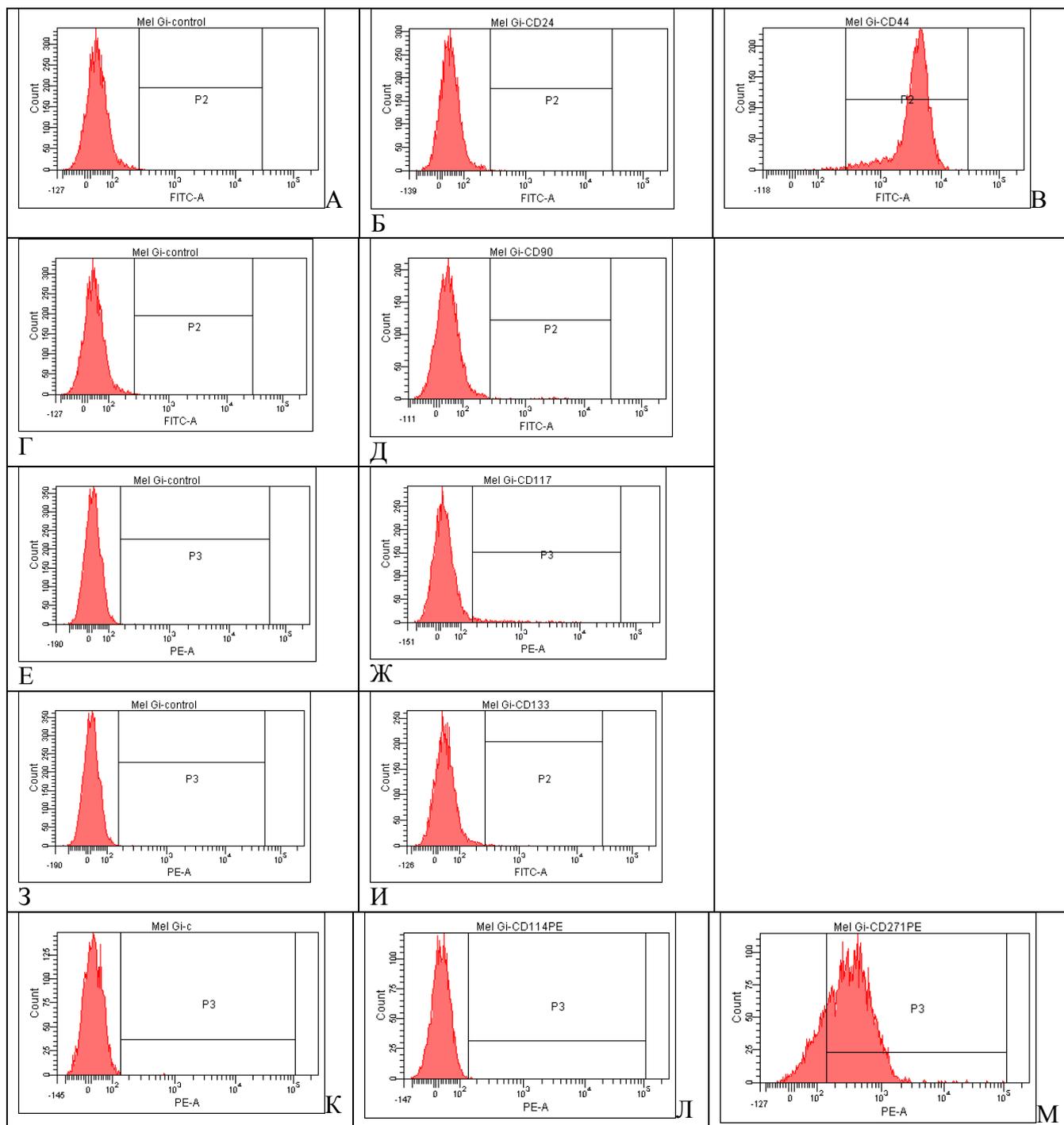


Рисунок 19— Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках mel Gi:

А, Г, Е, З, К – негативный контроль; Б – CD24-FITC; В – CD44-FITC; Д – CD90-FITC; Ж – CD117-PE; И – CD133-PE; Л – CD114-PE; М – CD271-PE.

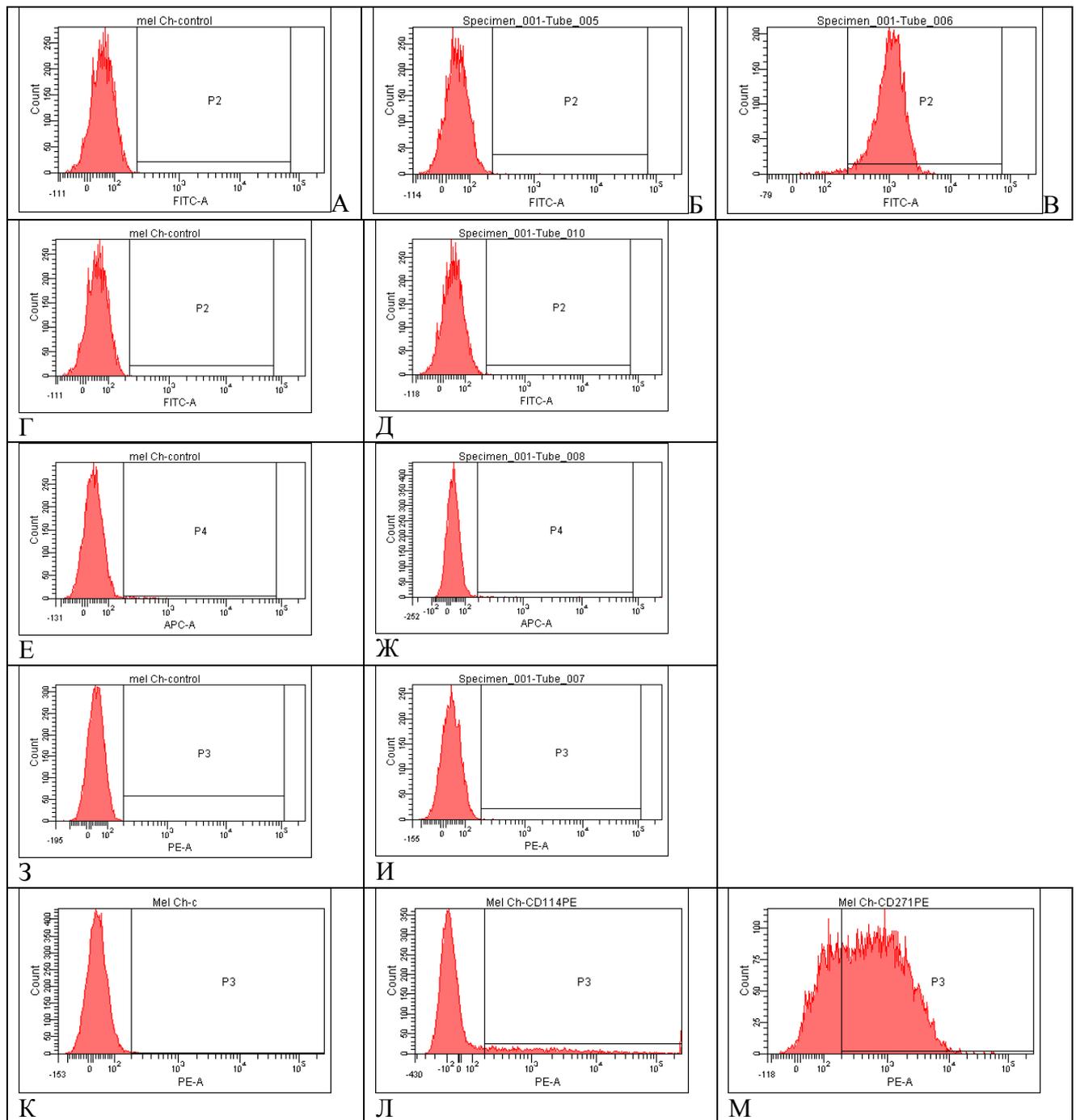


Рисунок 20— Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках mel Ch: А, Г, Е, З, К – негативный контроль; Б – CD24-FITC; В – CD44-FITC; Д – CD90-FITC; Ж – CD117-APC; И – CD133-PE; Л – CD114-PE; М – CD271-PE.

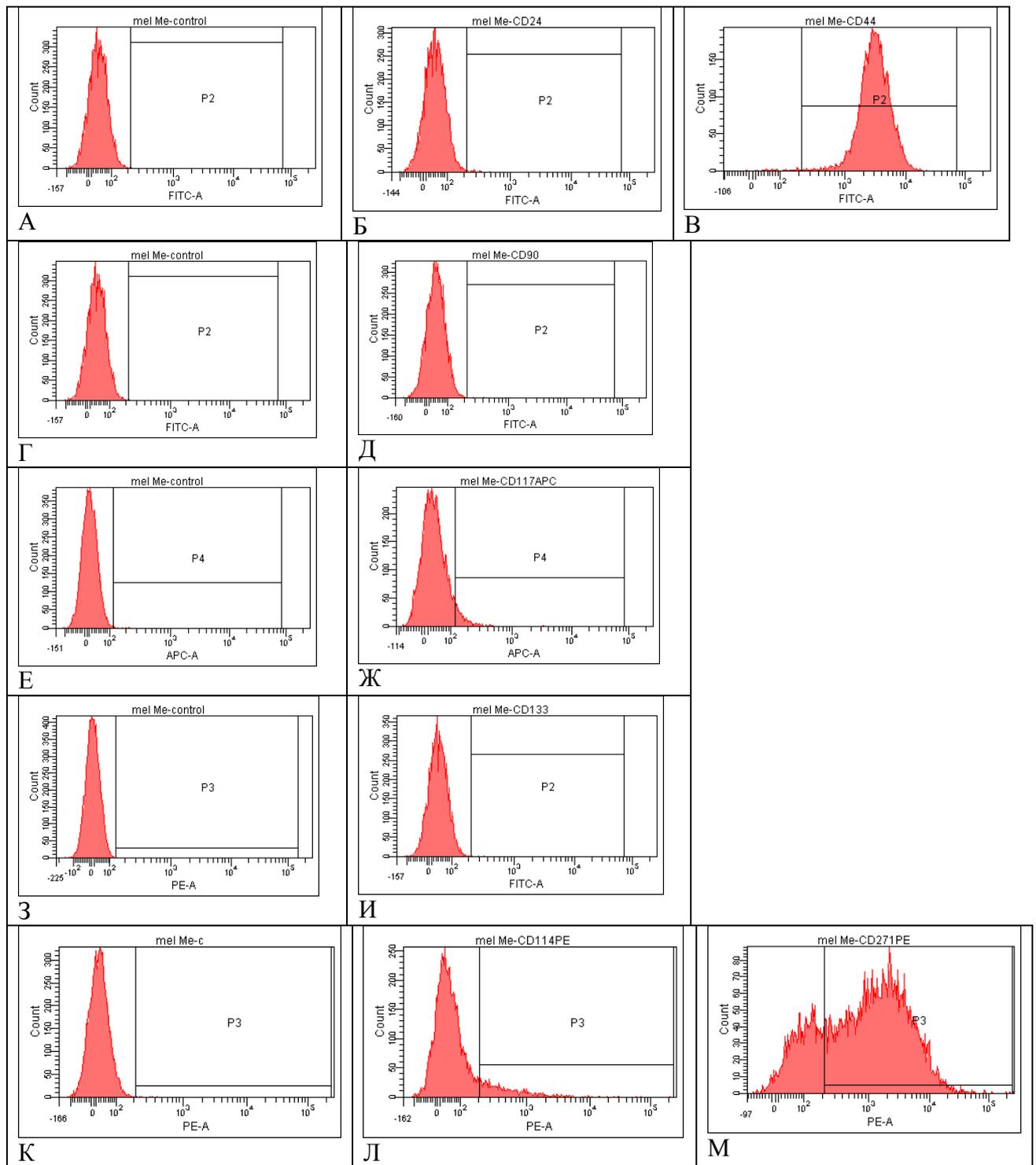


Рисунок 21— Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках mel Me: А, Г, Е, З, К – негативный контроль; Б – CD24-FITC; В – CD44-FITC; Д – CD90-FITC; Ж – CD117-APC; И – CD133-PE; Л – CD114-PE; М – CD271-PE.

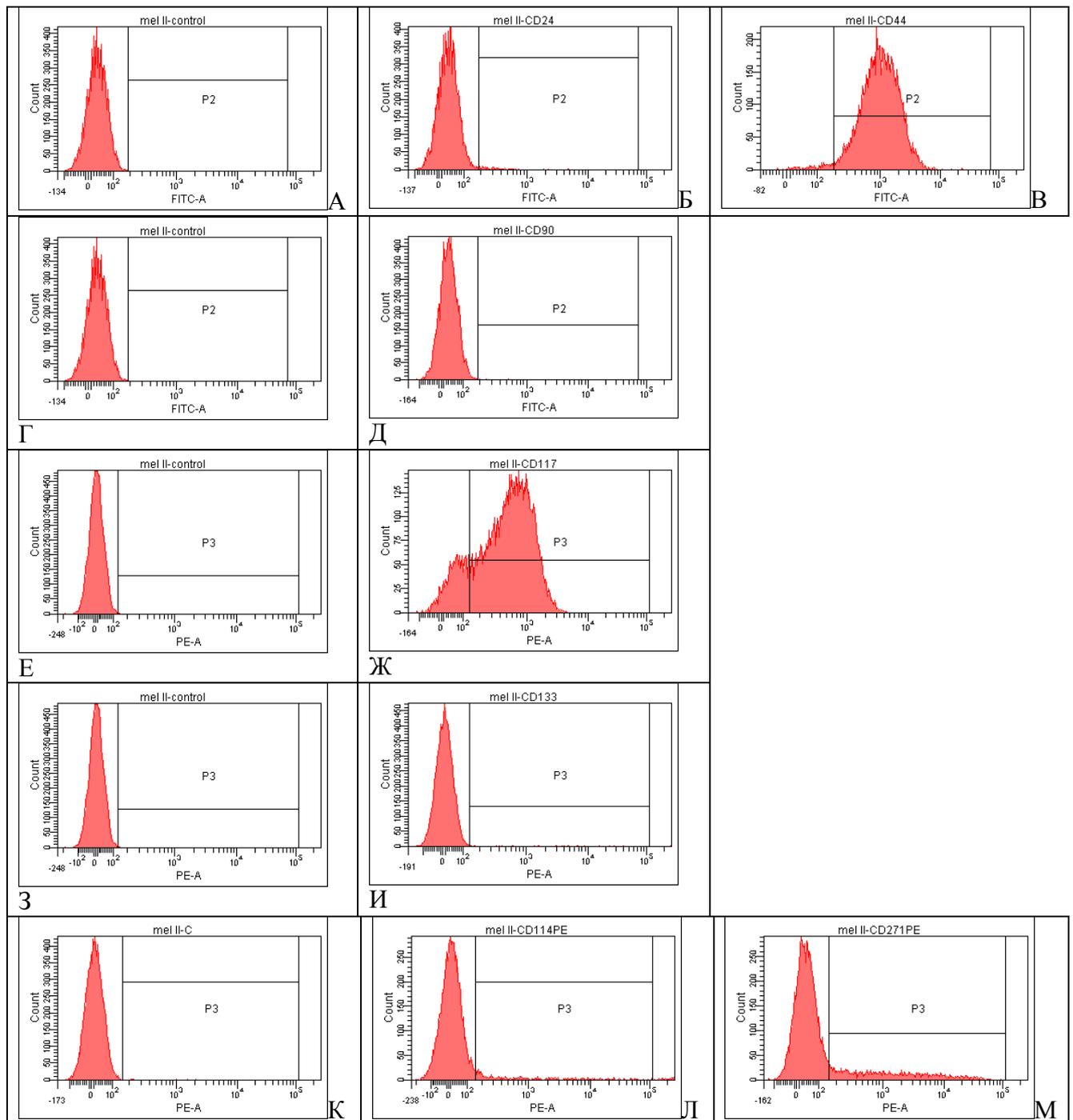


Рисунок 22— Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках mel II: А, Г, Е, З, К – негативный контроль; Б – CD24-FITC; В – CD44-FITC; Д – CD90-FITC; Ж – CD117-PE; И – CD133-PE; Л – CD114-PE; М – CD271-PE.

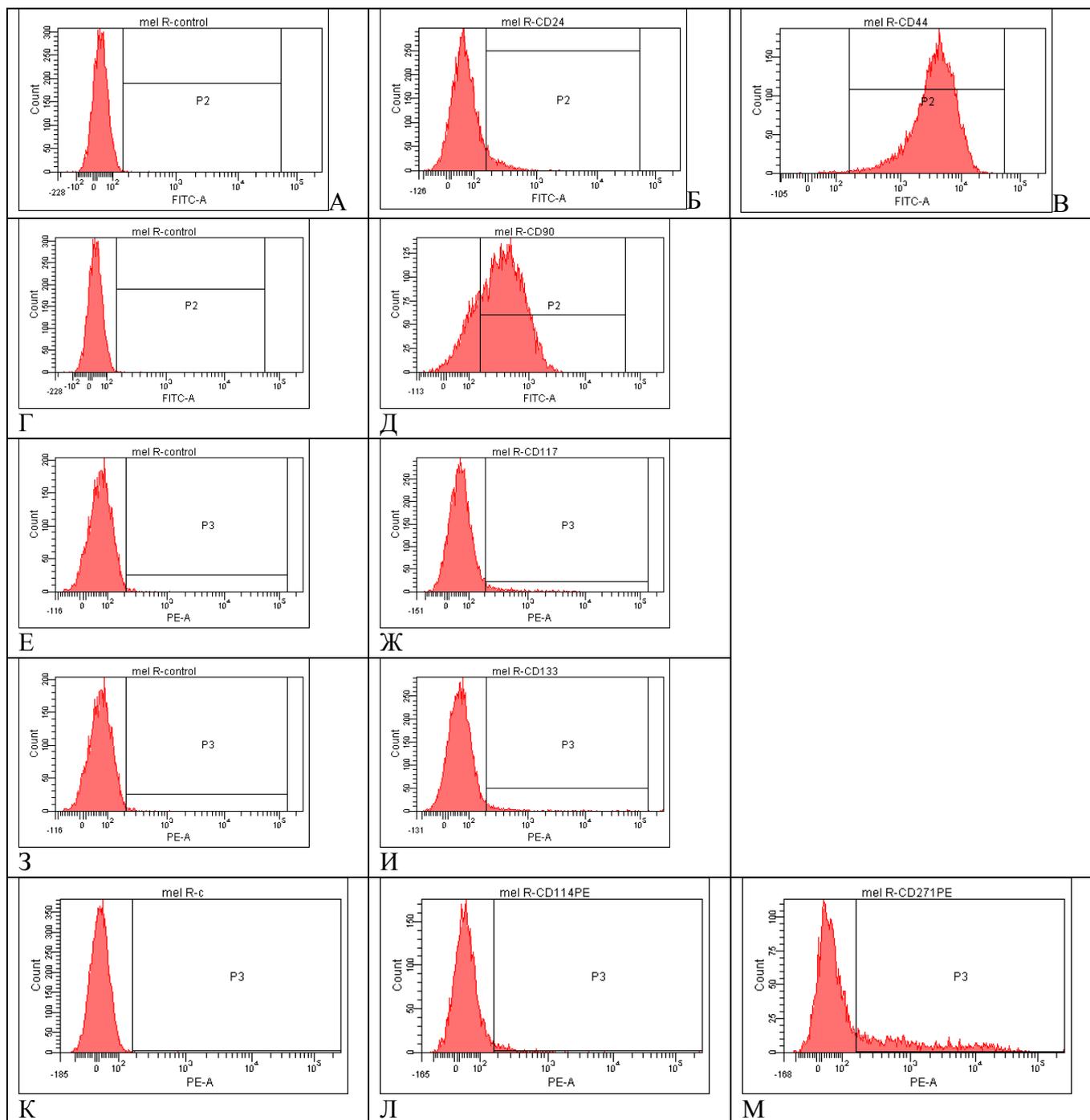


Рисунок 23— Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках mel R: А, Г, Е, З, К – негативный контроль; Б – CD24-FITC; В – CD44-FITC; Д – CD90-FITC; Ж – CD117-PE; И – CD133-PE; Л – CD114-PE; М – CD271-PE.

Экспрессию белка семейства АТФ-зависимых АВС-транспортеров ABCB5 (MDR/TAP) оценили на клеточных линиях метастатической меланомы человека при помощи иммуноцитохимического окрашивания. Результаты представлены в таблице 8 и на рисунках 24-42. ABCB5 экспрессировали 13 клеточных линий из 19 исследованных: высокодифференцированные линии mel Si, mel Me, умеренно

дифференцированные линии mel P, mel Hn, mel II, низкодифференцированные линии mel H, mel Rac, mel Kor, mel Ibr, mel Cher, mel Gus, mel Gi, mel Ch. Не экспрессировали ABCB5 умеренно дифференцированные клеточные линии mel Z, mel Bgf, mel Ksen, mel R и низкодифференцированные mel Mtp, mel Is.

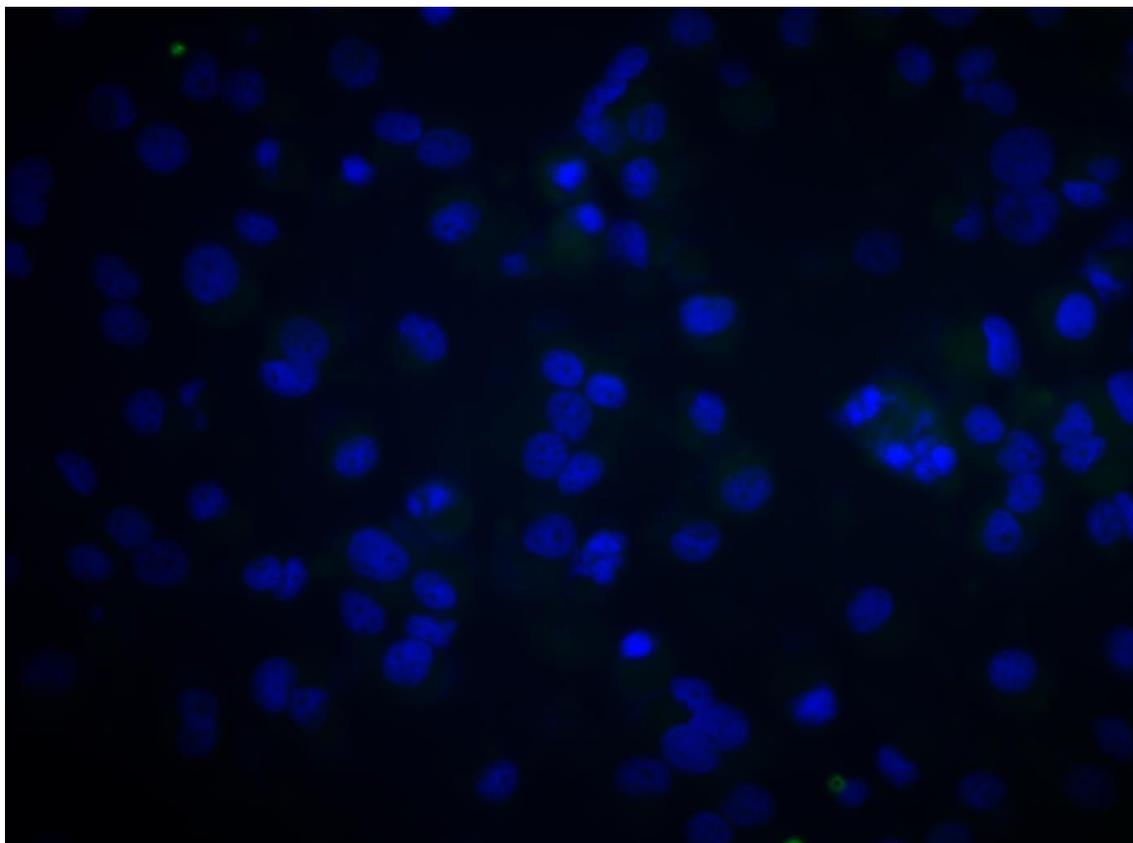


Рисунок 24 – Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel Z, увеличение X40.

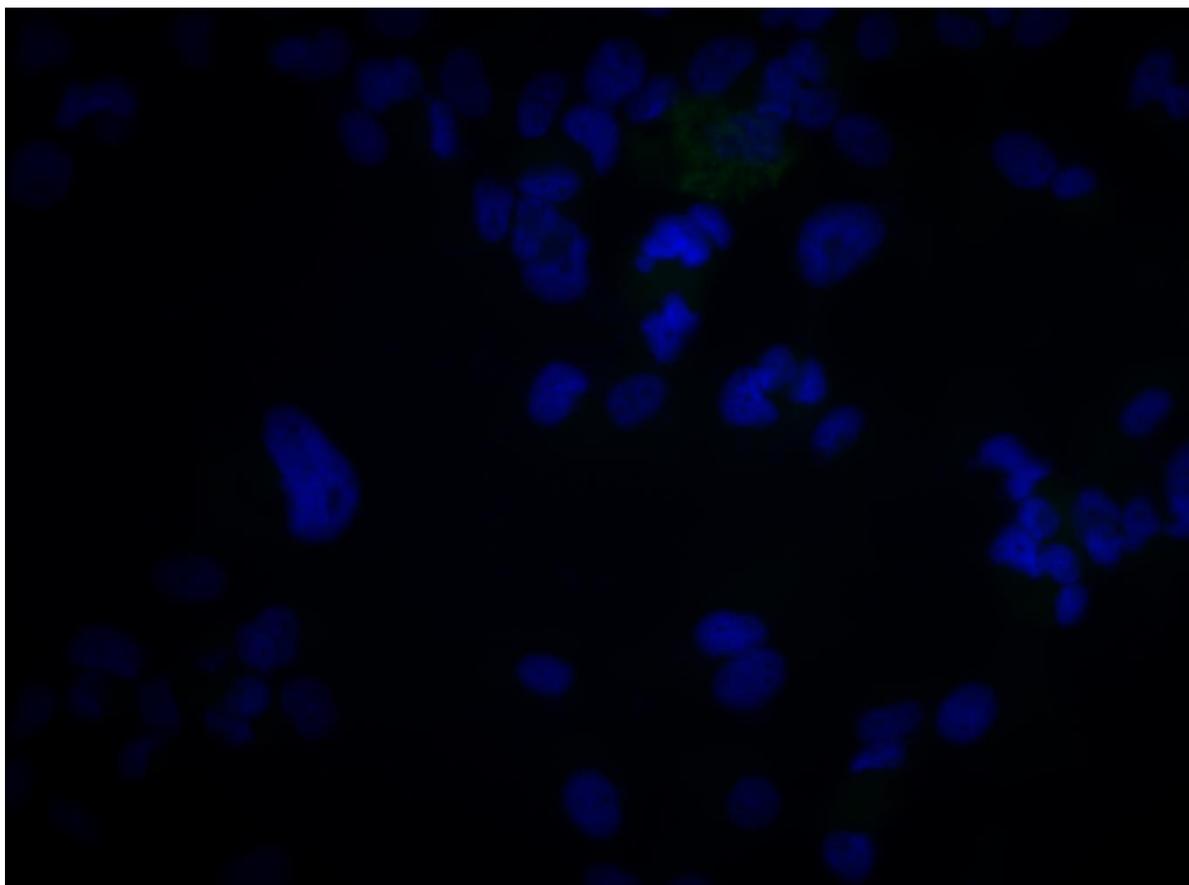


Рисунок 25 – Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel Vgf, увеличение X40.

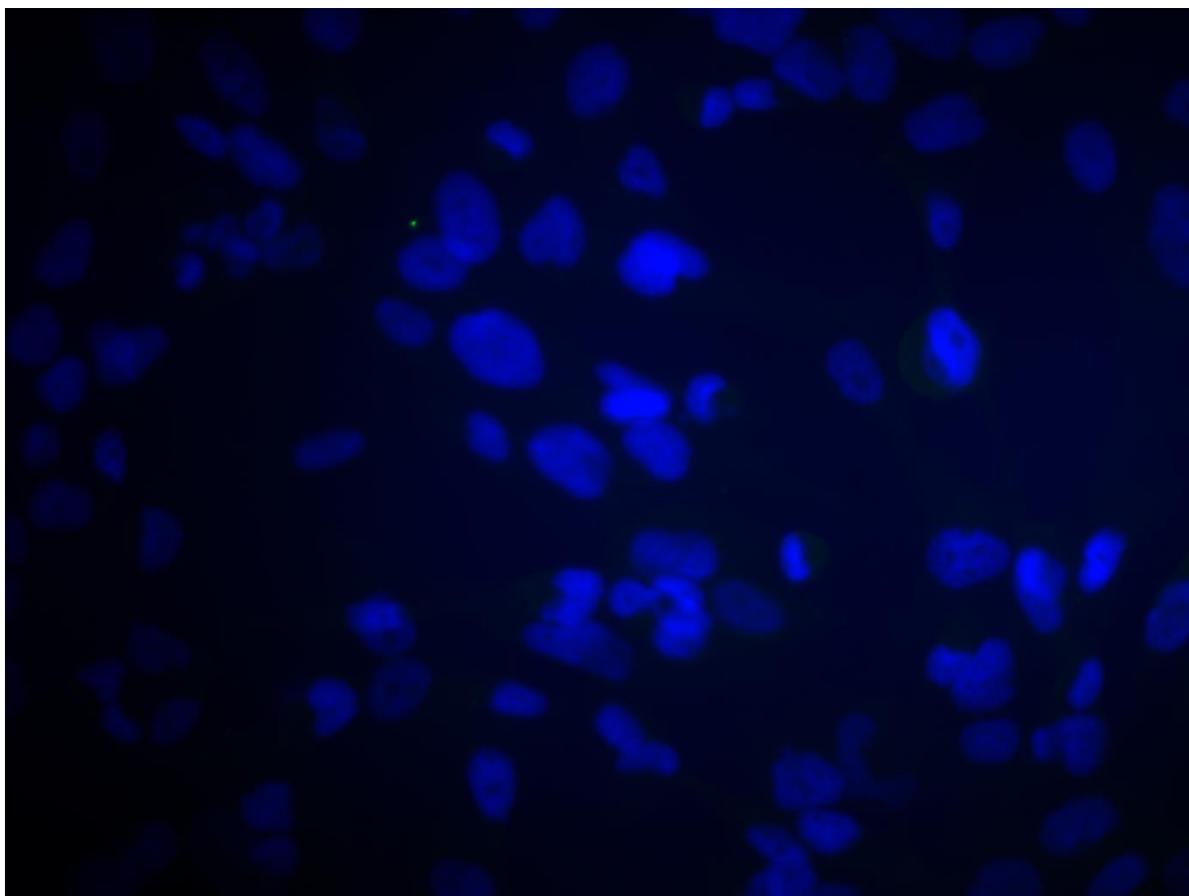


Рисунок 26 – Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel Ksen, увеличение X40.

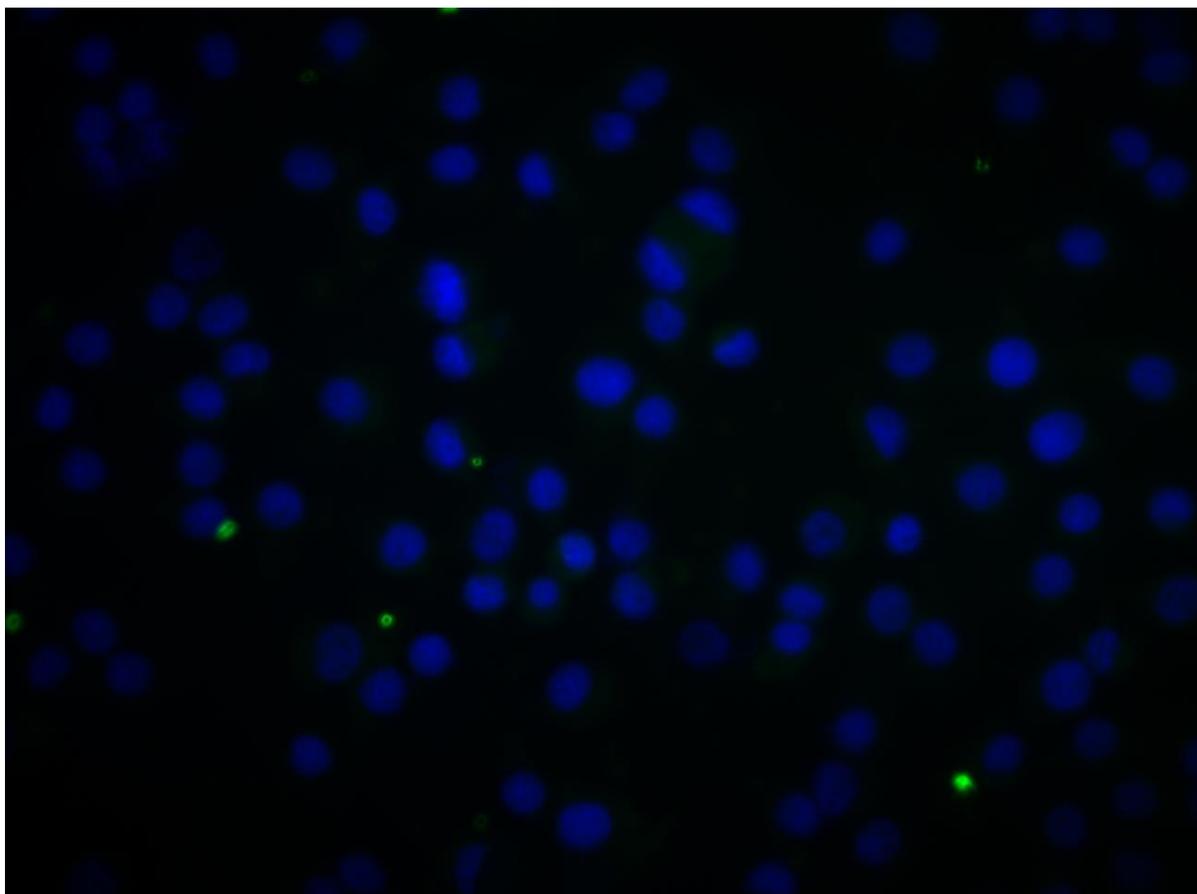


Рисунок 27 – Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel Mtr, увеличение X40.

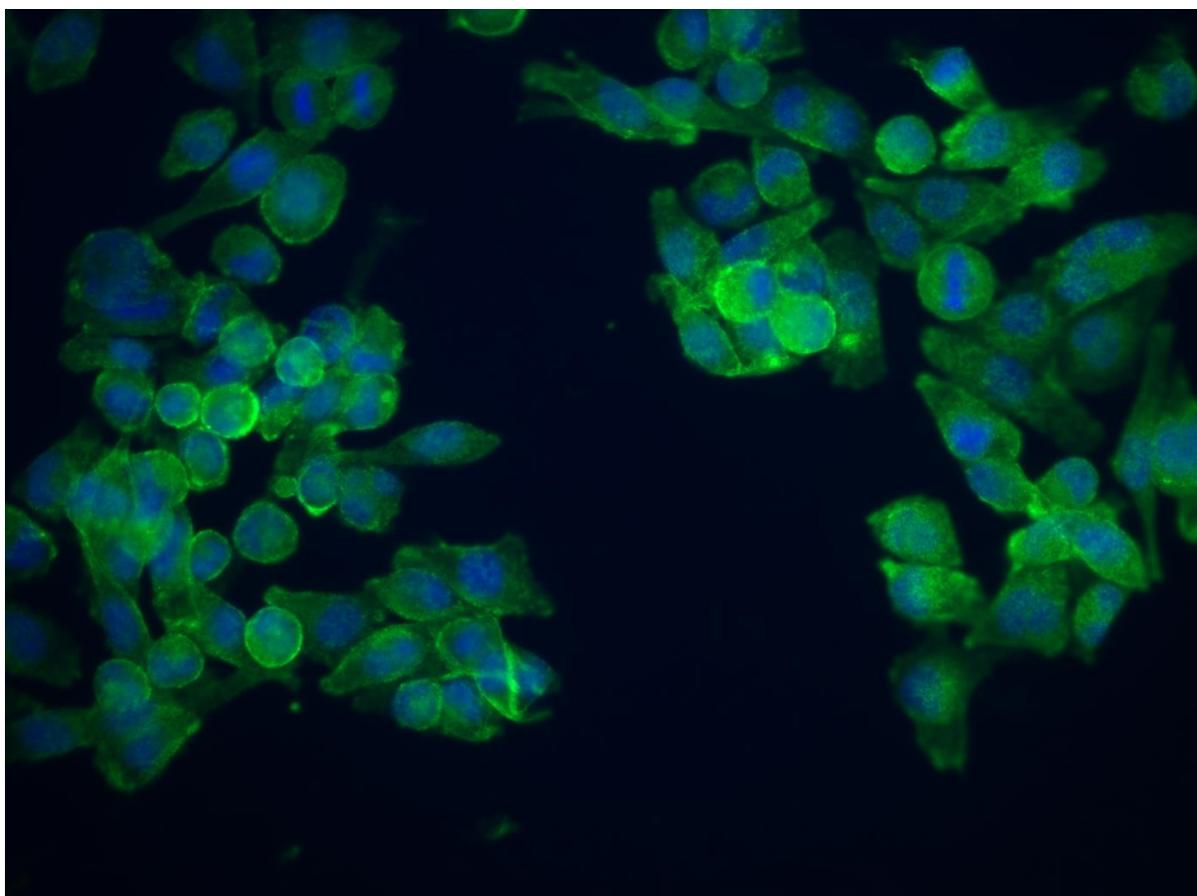


Рисунок 28 – Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel H, увеличение X40.

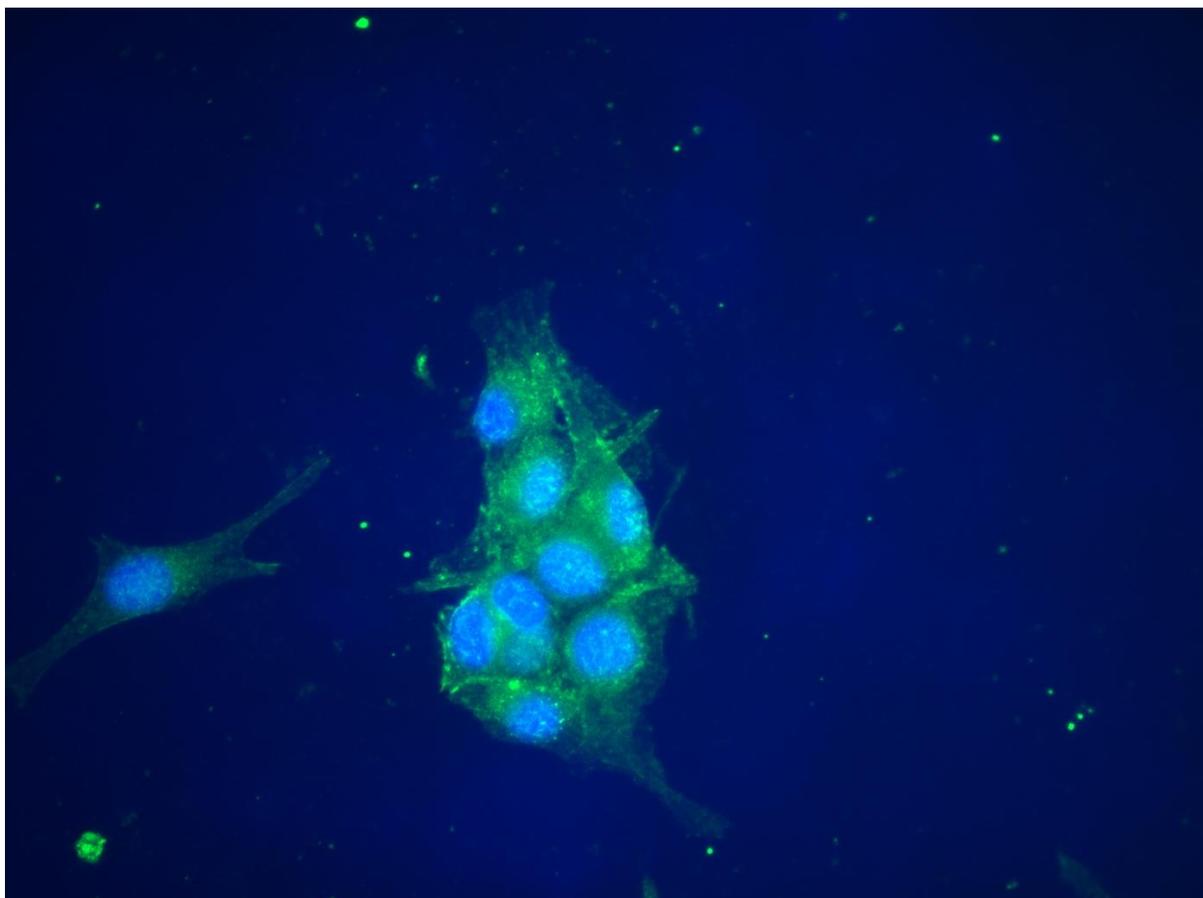


Рисунок 29 – Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel Ras, увеличение X40.

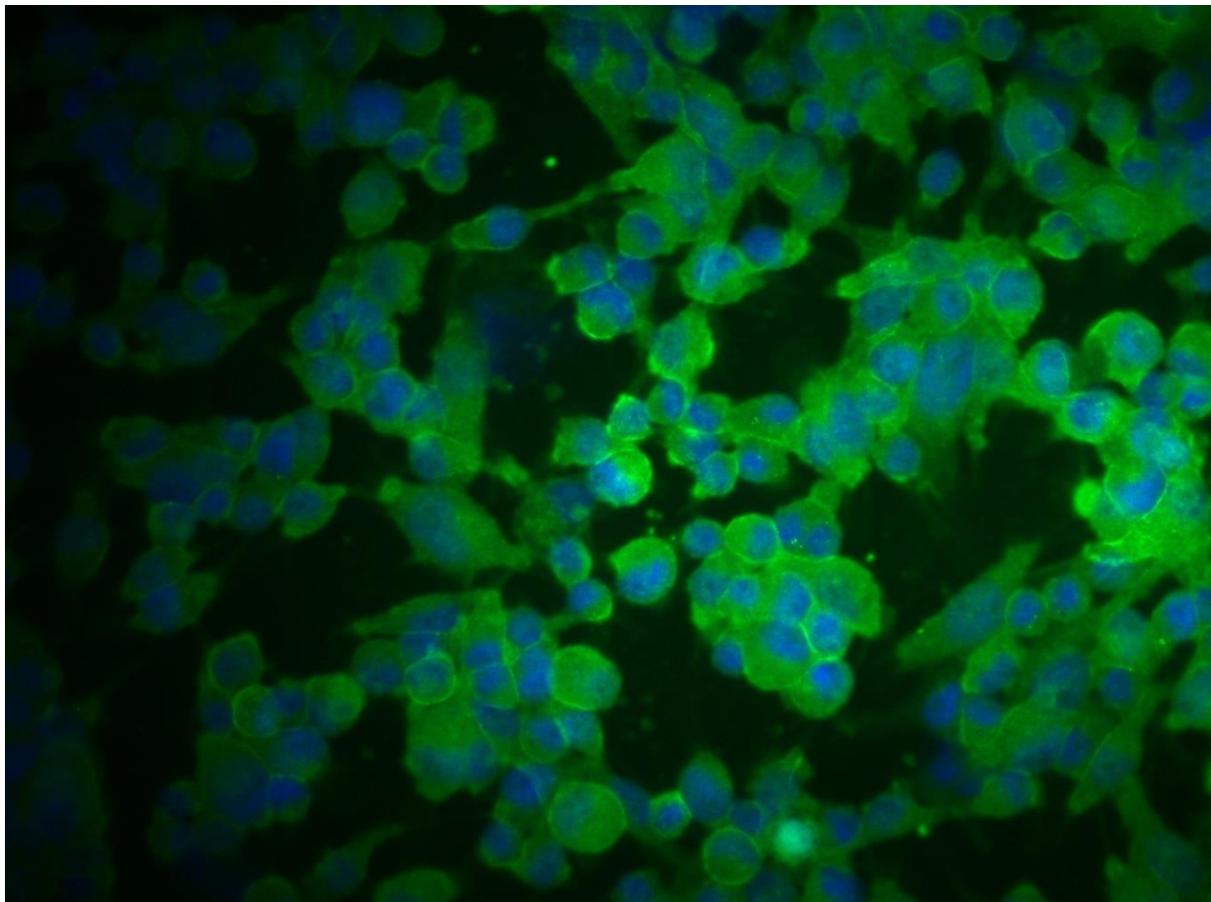


Рисунок 30 – Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel Si, увеличение X40.

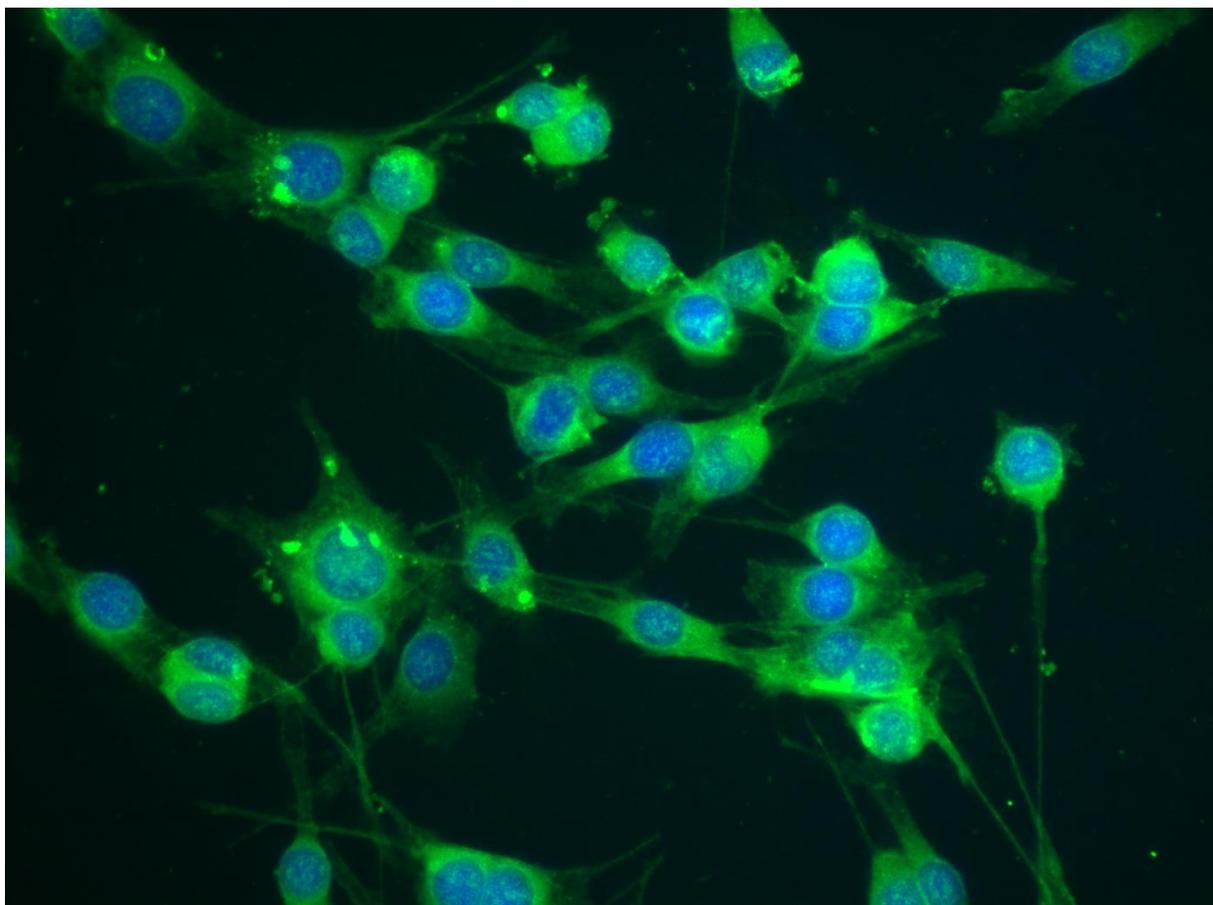


Рисунок 31 – Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel P, увеличение X40.

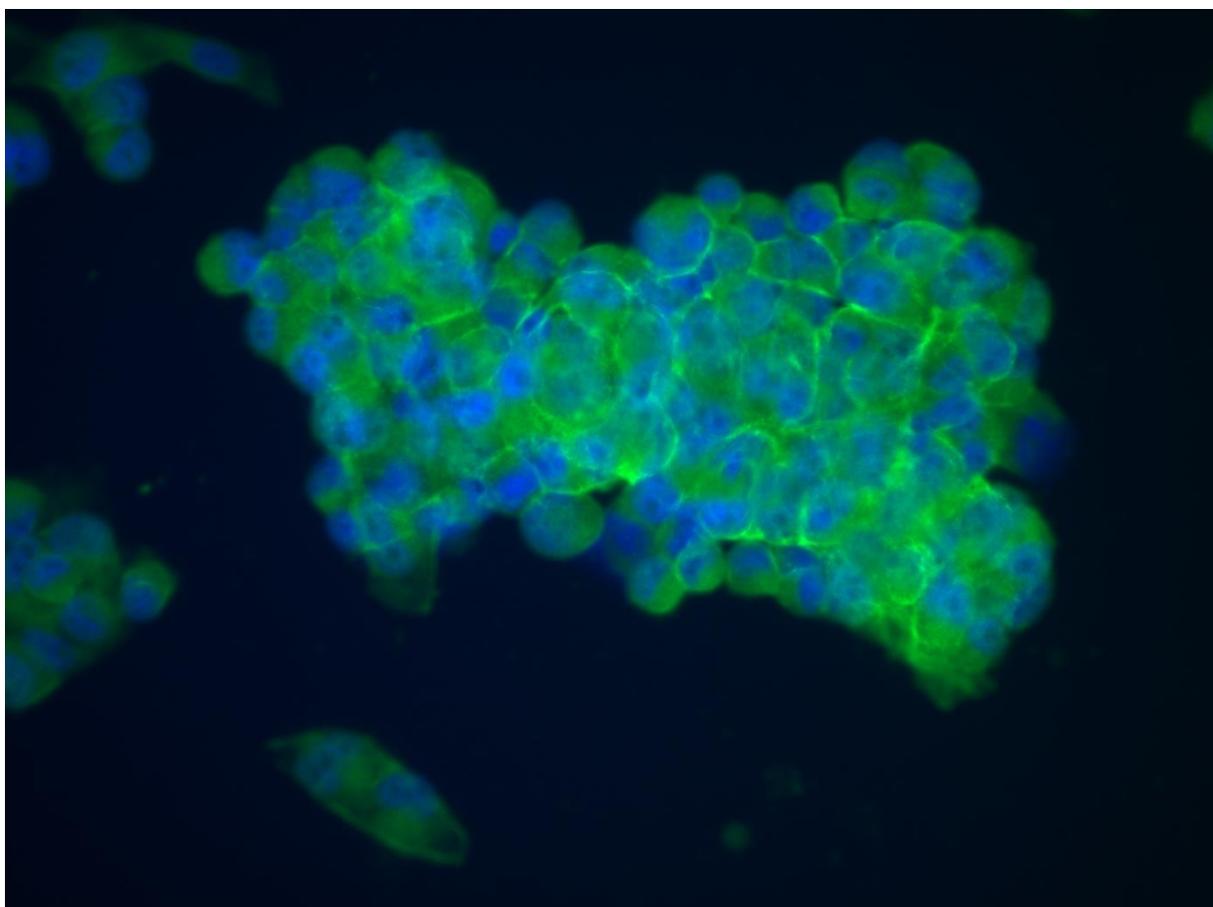


Рисунок 32 – Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel Hn, увеличение X40.

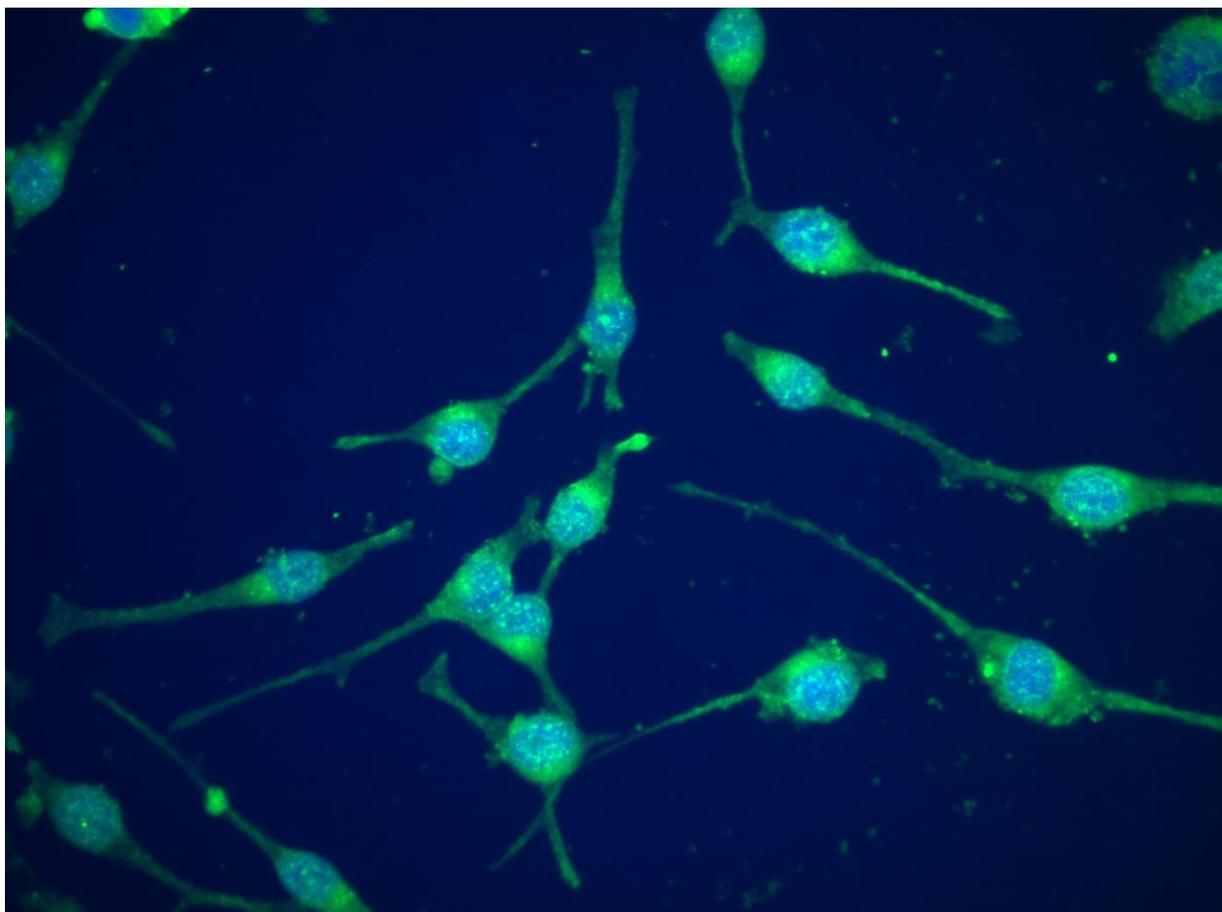


Рисунок 33 – Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel K09, увеличение X40.

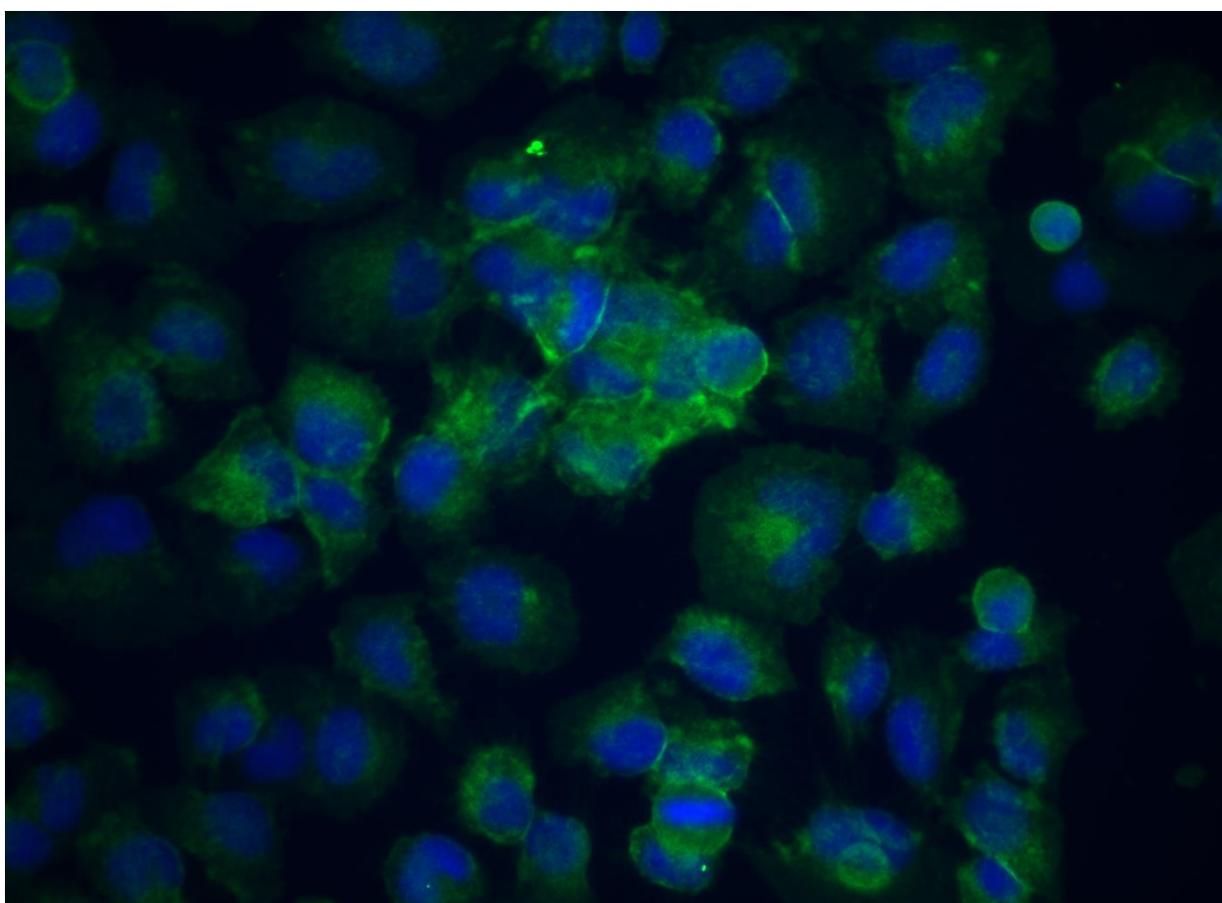


Рисунок 34 – Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel Ibr, увеличение X40.

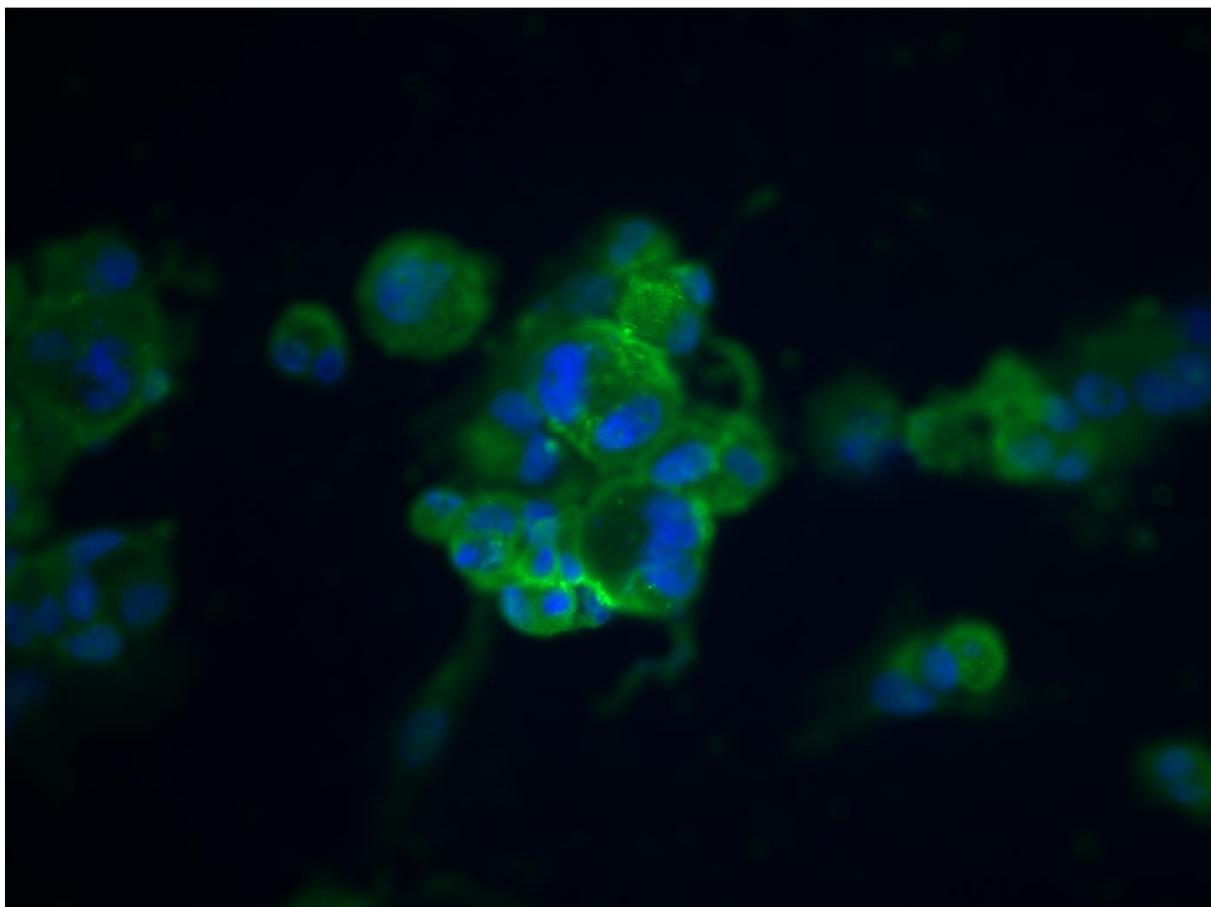


Рисунок 35 – Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel Cher, увеличение X40.

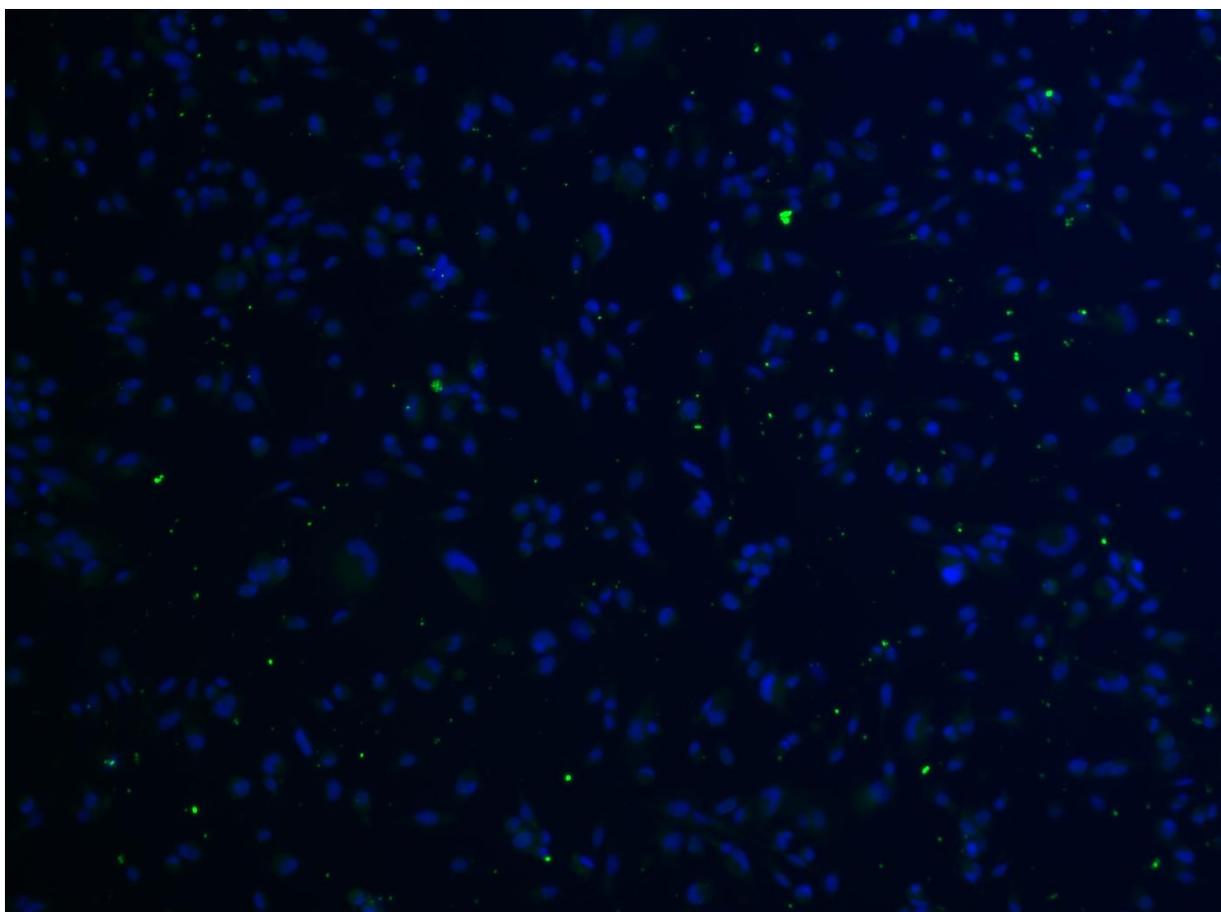


Рисунок 36 – Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel Is, увеличение X10.

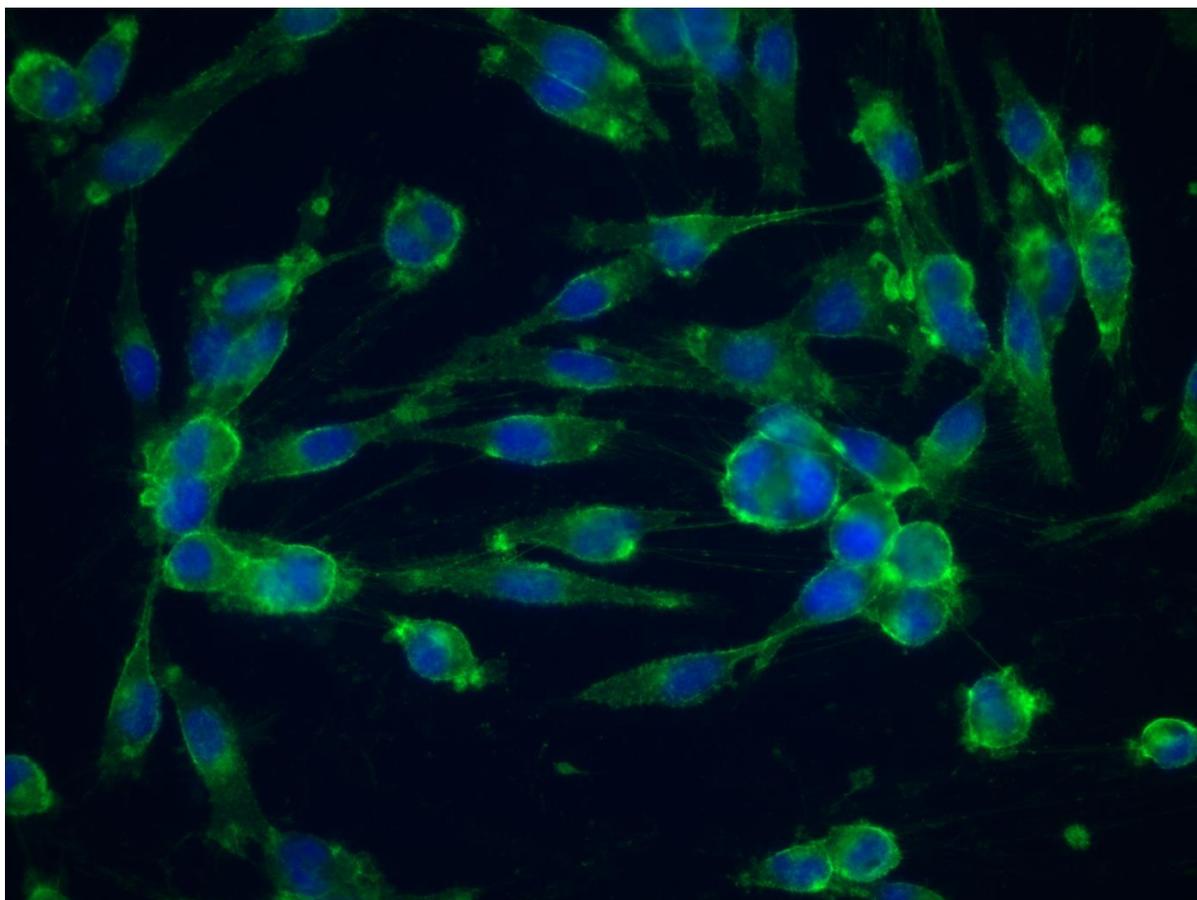


Рисунок 37 – Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel Gus, увеличение X40.

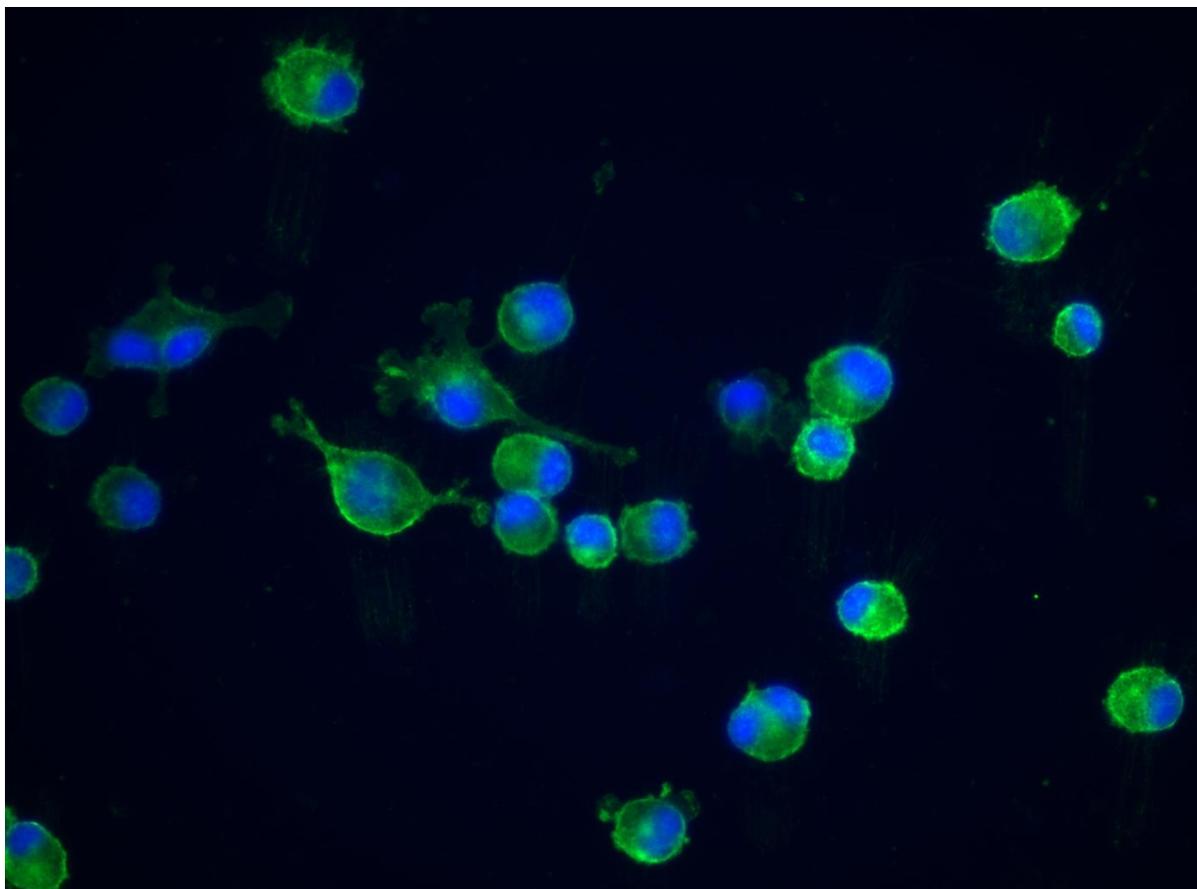


Рисунок 38 – Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel Gi, увеличение X40.

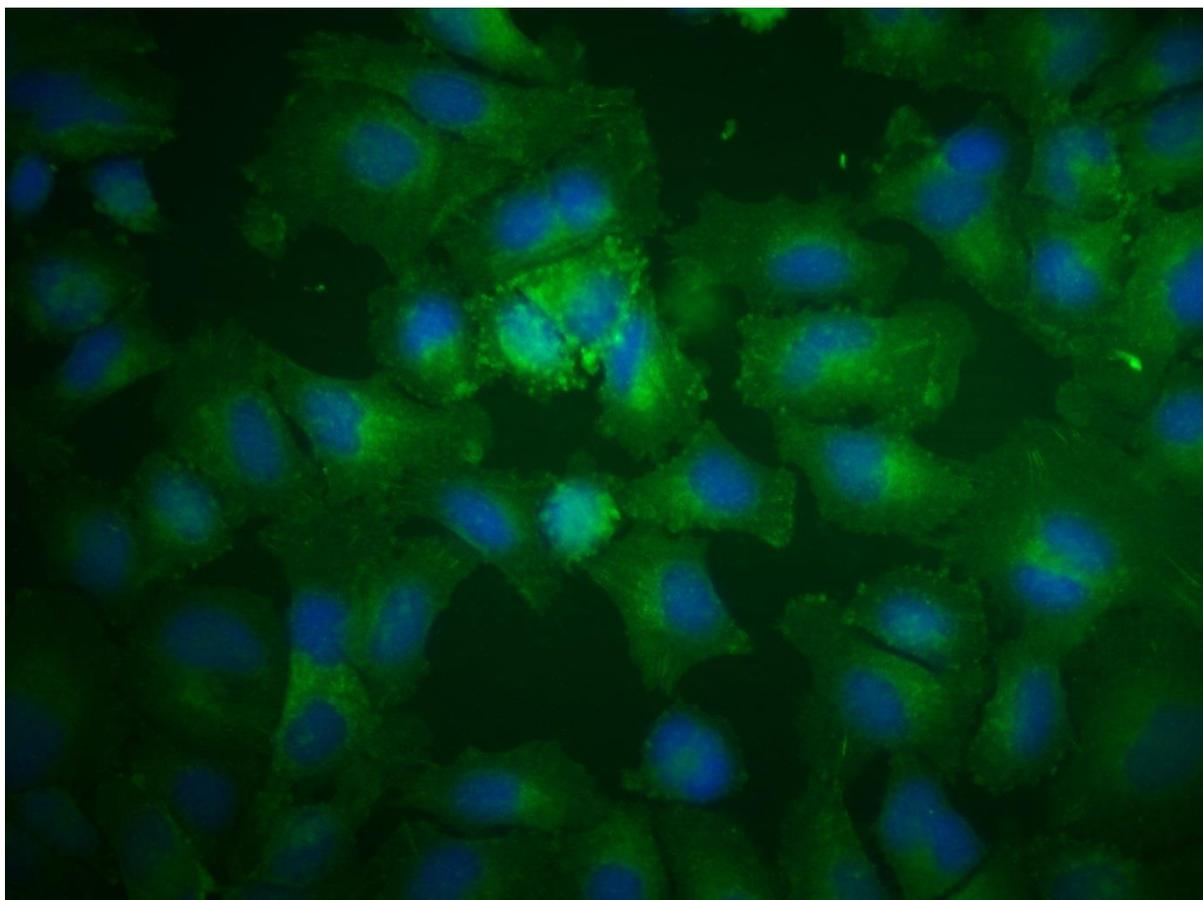


Рисунок 39 – Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel Ch, увеличение X40.

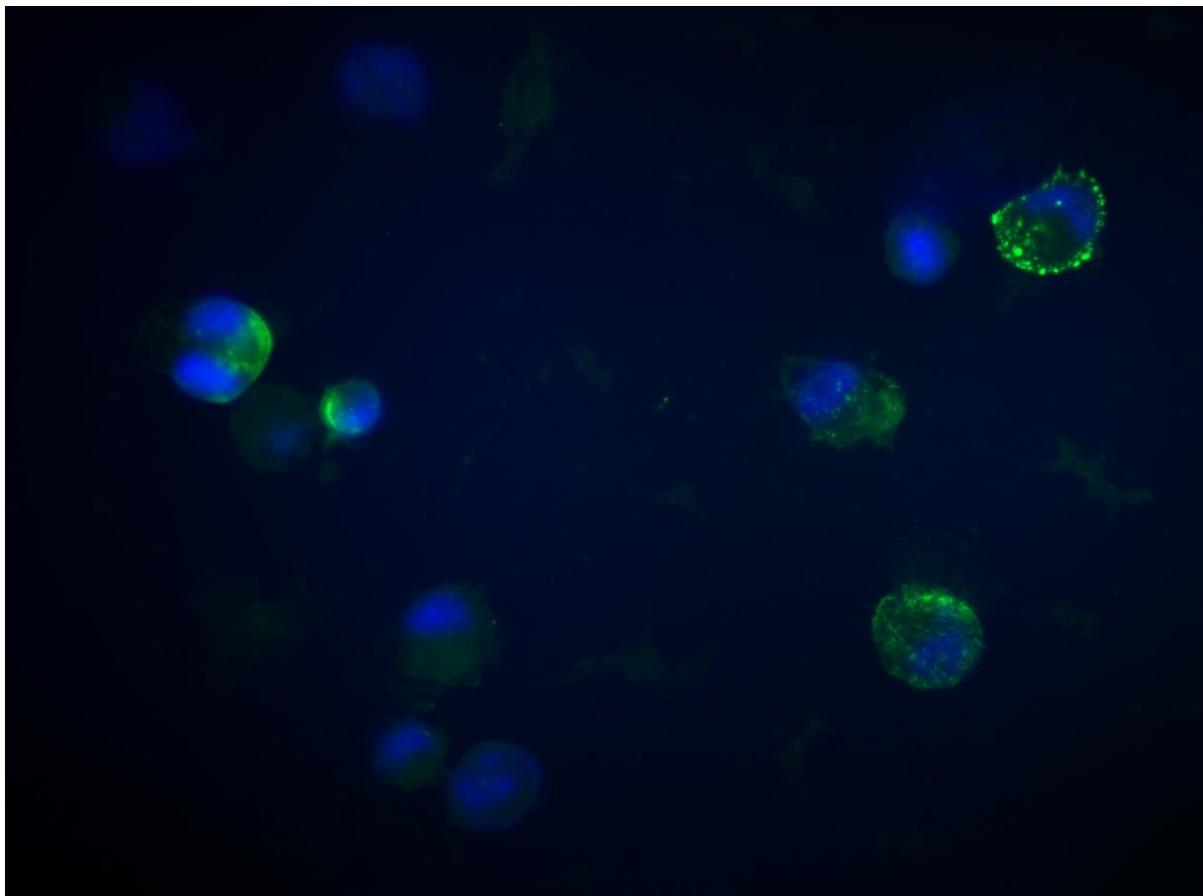


Рисунок 40 – Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel Me, увеличение X40.

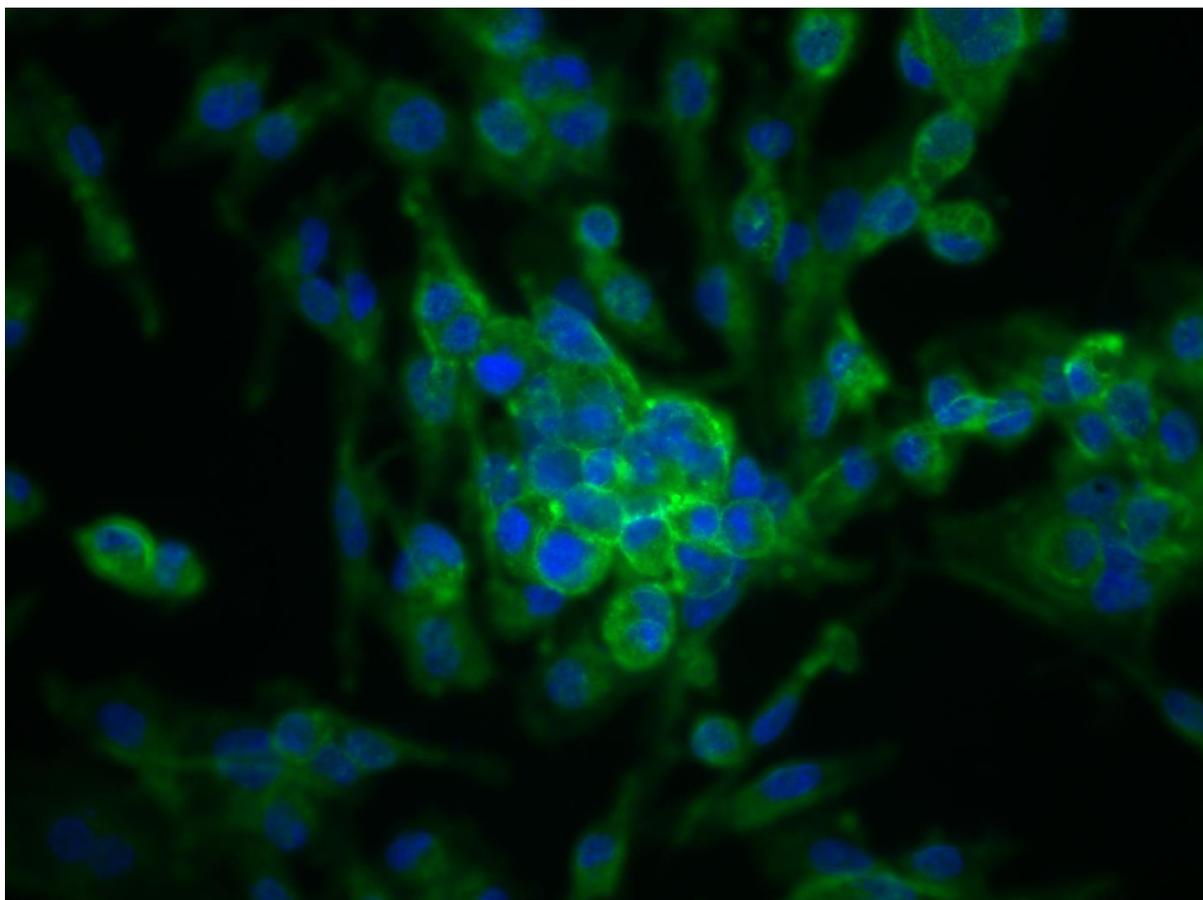


Рисунок 41 – Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel II, увеличение X40.

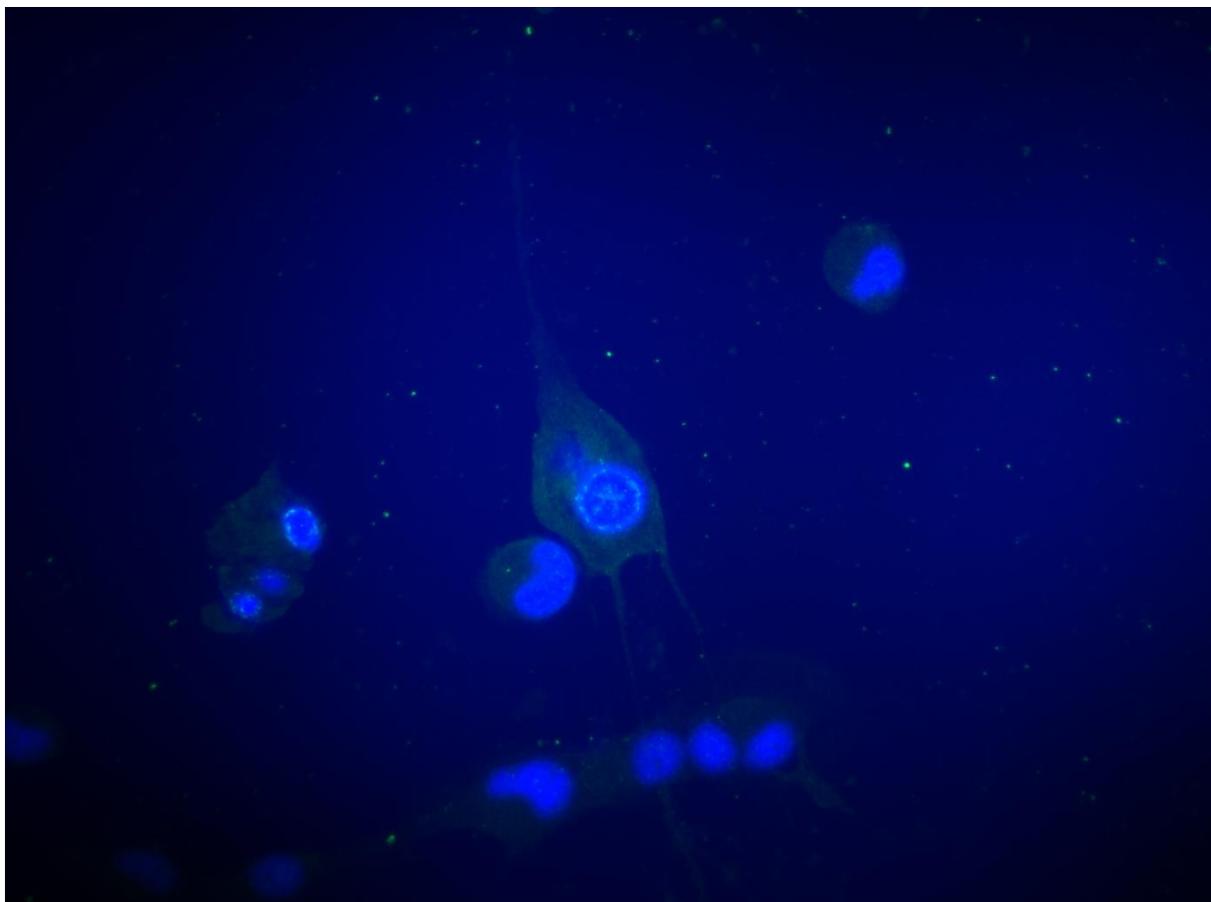


Рисунок 42– Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel R, увеличение X40.

Таблица 8 – Экспрессия ABCB5 на клеточных линиях меланомы

Клеточные линии	ABCB5+	ABCB5–
из опухолевого материала пациентов, не получавших лекарственной терапии	mel H mel Rac	mel Z mel Bgf mel Ksen mel Mtp
Клеточные линии из опухолевого материала пациентов, получавших иммунотерапию и химиотерапию	mel Si mel P mel Hn mel Kor mel Ibr mel Cher mel Gus mel Gi mel Ch	mel Is*
Нет данных о лечении	mel Me mel Il	mel R

*пациент получал только иммунотерапию до удаления метастаза, из которого получена клеточная линия

Гиперэкспрессия ABCB5 говорит о лекарственной устойчивости клеток, так как этот белок участвует в выбросе из клетки всех токсичных для нее веществ, в том числе противоопухолевых препаратов. На клеточных линиях, полученных из опухолевого материала больных, проходивших ранее противоопухолевую лекарственную терапию, ABCB5 экспрессировался клетками 9 из 10 линий (рис. 25–38), а на клеточных линиях, полученных из материала больных, которые ранее подвергались только хирургическому лечению опухоли, ABCB5 был экспрессирован только 2 из 6 линий (рис. 19–24). Важно отметить, что ABCB5-отрицательная клеточная линия mel Is, отнесенная в группу больных, получавших лекарственную противоопухолевую терапию, была получена из опухолевого

материала пациента, который до удаления метастаза получал только иммунотерапию.

В статистическом анализе при сравнении качественного признака экспрессии белка ABCB5 в группах образцов, полученных от больных прошедших или не прошедших терапию, найдены различия. В клеточных линиях, выделенных из опухолевого материала больных, предварительно получивших лечение, экспрессия ABCB5 наблюдается значимо чаще ($p=0,0433$).

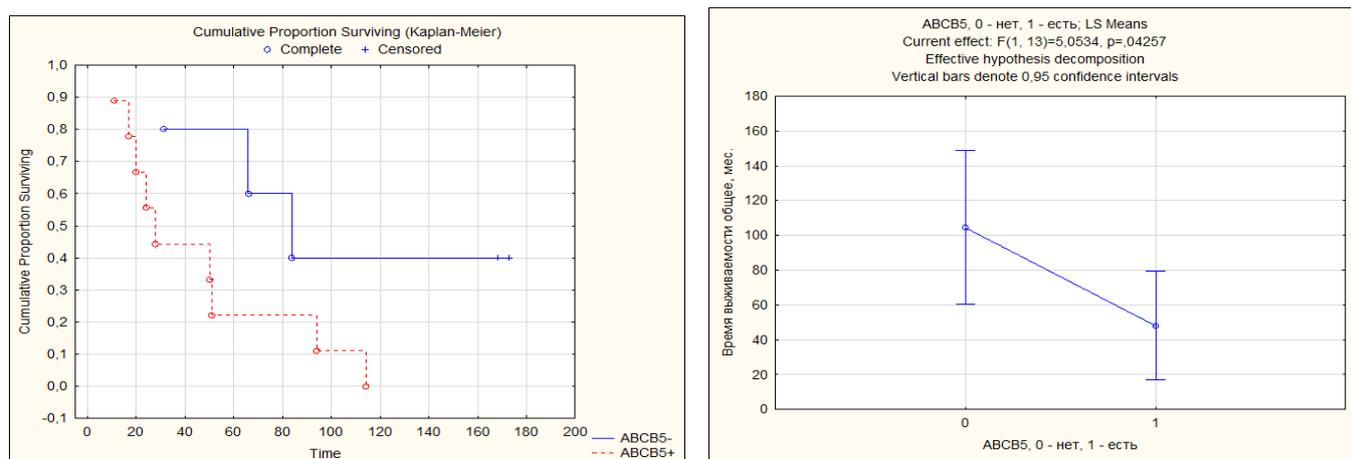


Рисунок 43—Время общей выживаемости больных в зависимости от экспрессии ABCB5.

Анализируя полученные результаты, можно отметить, что высокодифференцированные линии mel Si и mel Me обладают схожим фенотипом: отсутствует экспрессия CD90, CD133, присутствуют небольшой процент CD117-положительных клеток (6,8% и 5,2% соответственно), процент CD114-положительных клеток (11,3% и 15,6 % соответственно), и высокий процент клеток, экспрессирующих CD271 (68,% и 76,1 % соответственно), обе линии экспрессируют ABCB5.

Умеренно дифференцированные и низкодифференцированные клеточные линии имеют более гетерогенную экспрессию маркеров СКО. Однако, низкодифференцированные клеточные линии экспрессируют в сумме больше маркеров СКО. Клеточные линии, полученные из метастазов больных, проходивших ранее химиотерапевтическое лечение, экспрессировали суммарно

большее число маркеров СКМ, по сравнению с клеточными линиями пациентов, которым было проведено только хирургическое лечение. В клеточных линиях, полученных от больных, получивших противоопухолевую лекарственную терапию, более высокий уровень экспрессии CD133 ($p=0,028$), по сравнению с клеточными линиями, полученными от больных, не получавших системного лечения.

Экспрессия антигенов CD90, CD117 и CD133, выявлена только на клеточных линиях из опухолей больных, получавших химиотерапию, что может свидетельствовать о наличии признака СКО. Экспрессия ABCB5 присутствовала на всех клеточных линиях из материала больных, получавших химиотерапию.

3.2. Выделение из клеточных линий меланомы клонов клеток с высокой экспрессией маркеров СКО, их характеристика

Мы обнаружили, что внутри одной линии одновременно существуют несколько популяций, несущих на себе разные маркеры. Клетки, экспрессирующие СКО-ассоциированные антигены могут быть представителями небольшой популяции, так называемой «side population», СКО. Для подтверждения этой гипотезы мы изучили экспрессию маркеров СКО на двух клеточных линиях, клонированных из клеточных линий mel Ibr и mel Cher.

Получение клеточных линий mel Ibr ЕЕМС и mel Cher ЕЕ описано в главе " Материалы и методы".

3.2.1 Иммунологический фенотип клеточной линии mel Ibr ЕЕМС

Исследована экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, в полученной клеточной линии меланомы кожи человека mel Ibr ЕЕМС.

Все клетки линии mel Ibr ЕЕМС экспрессировали CD133 100 %, тогда как в материнской линии mel Ibr было только 8,5% CD133-положительных клеток (рис. 38, таблица 9).

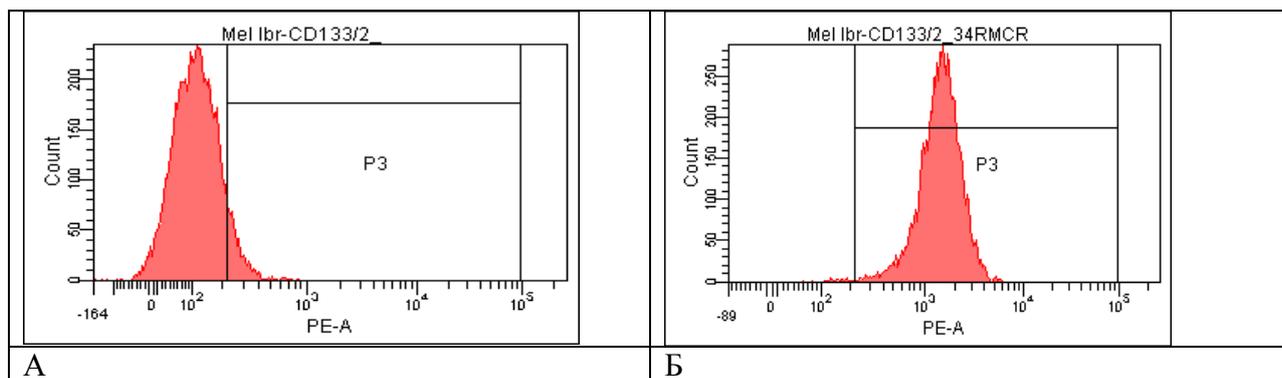


Рисунок 44 – Сравнение экспрессии CD133 на клеточных линиях mel Ibr (А) и mel Ibr EEMC (Б)

Таблица 9 – Сравнение экспрессии маркеров СКМ на клеточных линиях mel Ibr и mel Ibr EEMC

Название линии	Антиген-положительные клетки, %						
	CD133	CD114	CD271	Oct-4	SOX-2	ABCB5	Nestin
mel Ibr	8,5	8,9	68,8	0	0	+	–
mel Ibr EEMC	100	19,2	20,1	8,4	10,5	+	+

Кроме того, в клеточной линии mel Ibr EEMC по сравнению с mel Ibr изменилась экспрессия других маркеров, ассоциированных с СКМ. Повысился процент CD114-положительных клеток, но снизился процент CD271-положительных клеток (рис. 39, таблица 9)

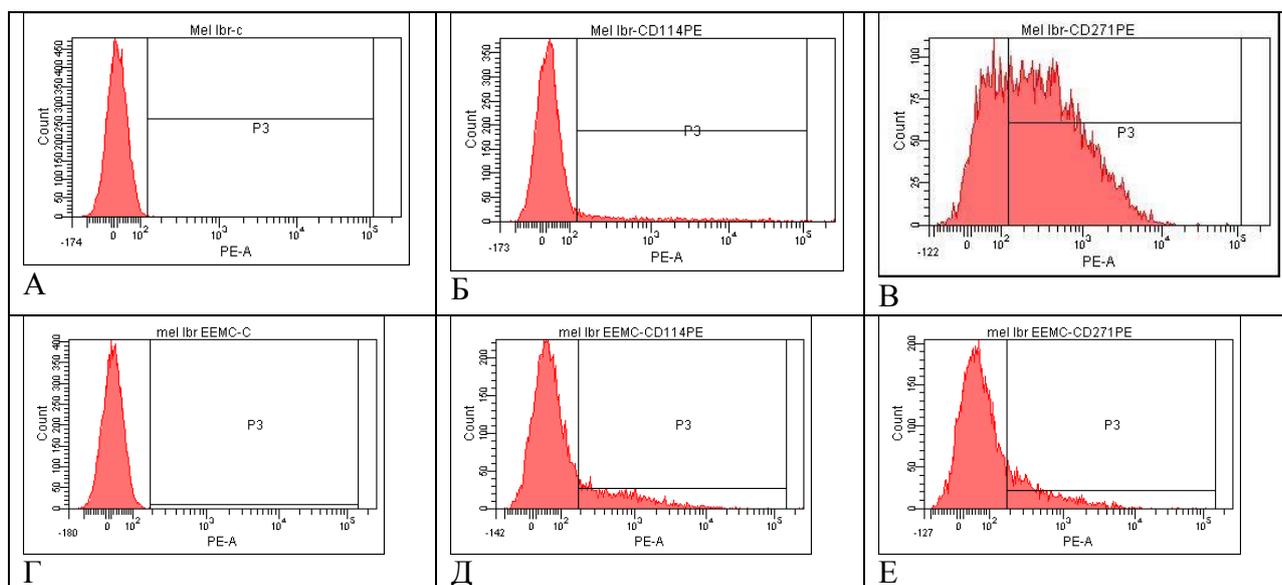


Рисунок 45 – Сравнение экспрессия антигенов CD114, CD271 на клетках mel Ibr (А, Б, В) и mel Ibr RMCR (Г, Д, Е): А, Г – негативный контроль; Б, Д – CD114-PE; В, Е – CD271-PE.

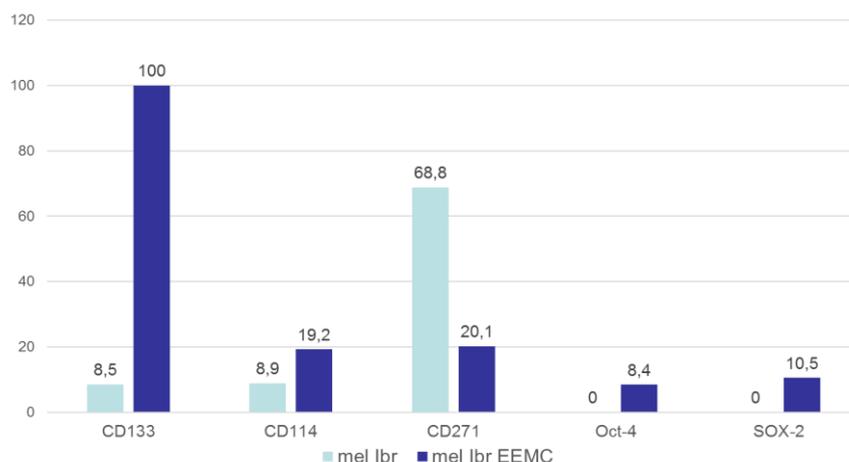


Рисунок 46— Экспрессия маркеров, ассоциированных со стволовыми опухолевыми клетками, на клеточной линии mel Ibr EEMC в сравнении с исходной клеточной линией mel Ibr.

На клеточной линии mel Ibr EEMC появилась экспрессия Oct-4 и SOX-2, транскрипционных факторов, характерных для эмбриональных стволовых клеток (рис. 40, таблица 9). Маркеры Oct-4 и SOX-2 экспрессируются СКО меланомы.

Иммуноцитохимическим окрашиванием на клеточной линии mel Ibr EEMC показана экспрессия ABCB5 и Нестина (рис. 40 и 41). Нестин является маркером нейральных стволовых клеток, его экспрессия на клетках меланомы, считается маркером плохого прогноза заболевания.

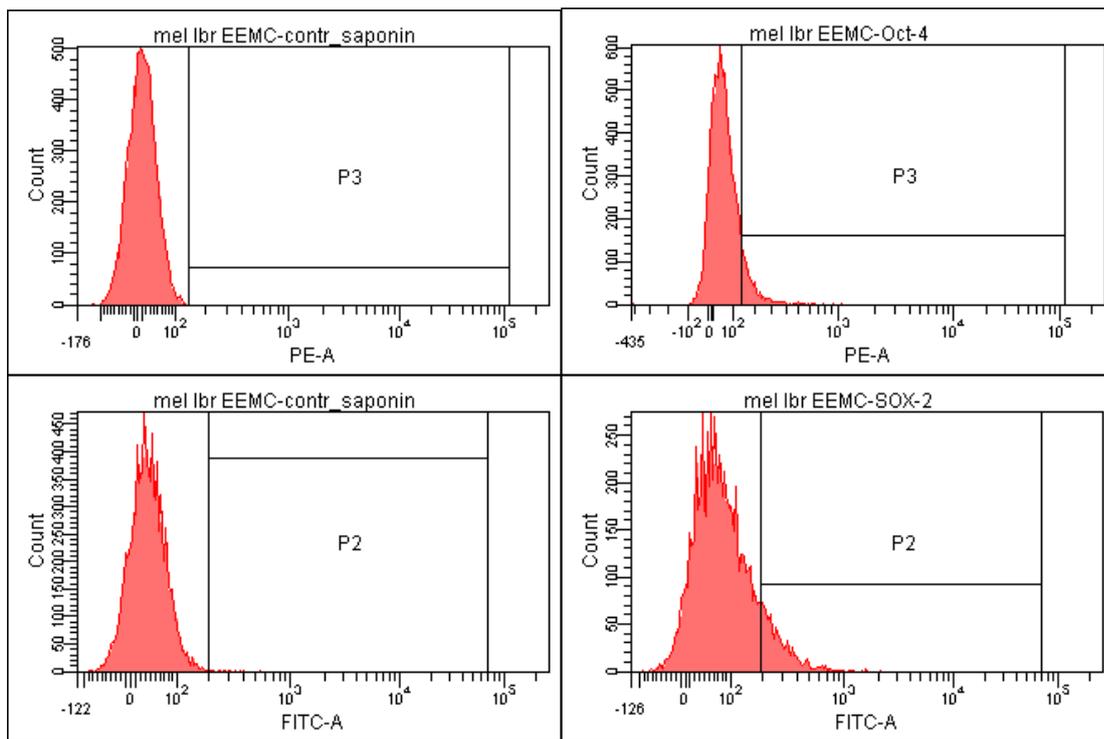


Рисунок 47 – Экспрессия антигенов эмбриональных СК на клеточной линии mel Ibr EEMC: А, В – негативный контроль; Б – SOX2; Г – Oct4.

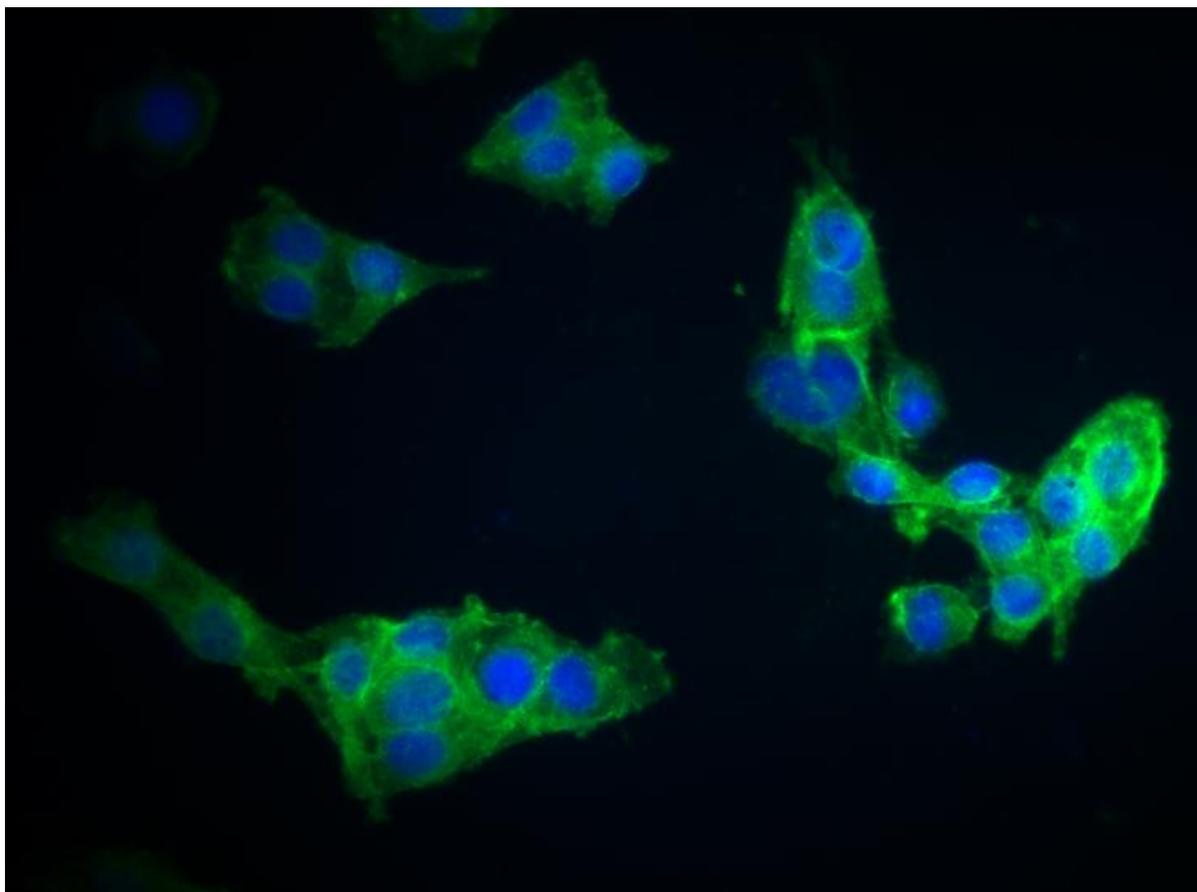


Рисунок 48 – Экспрессия ABC5 на клеточной линии mel Ibr EEMC

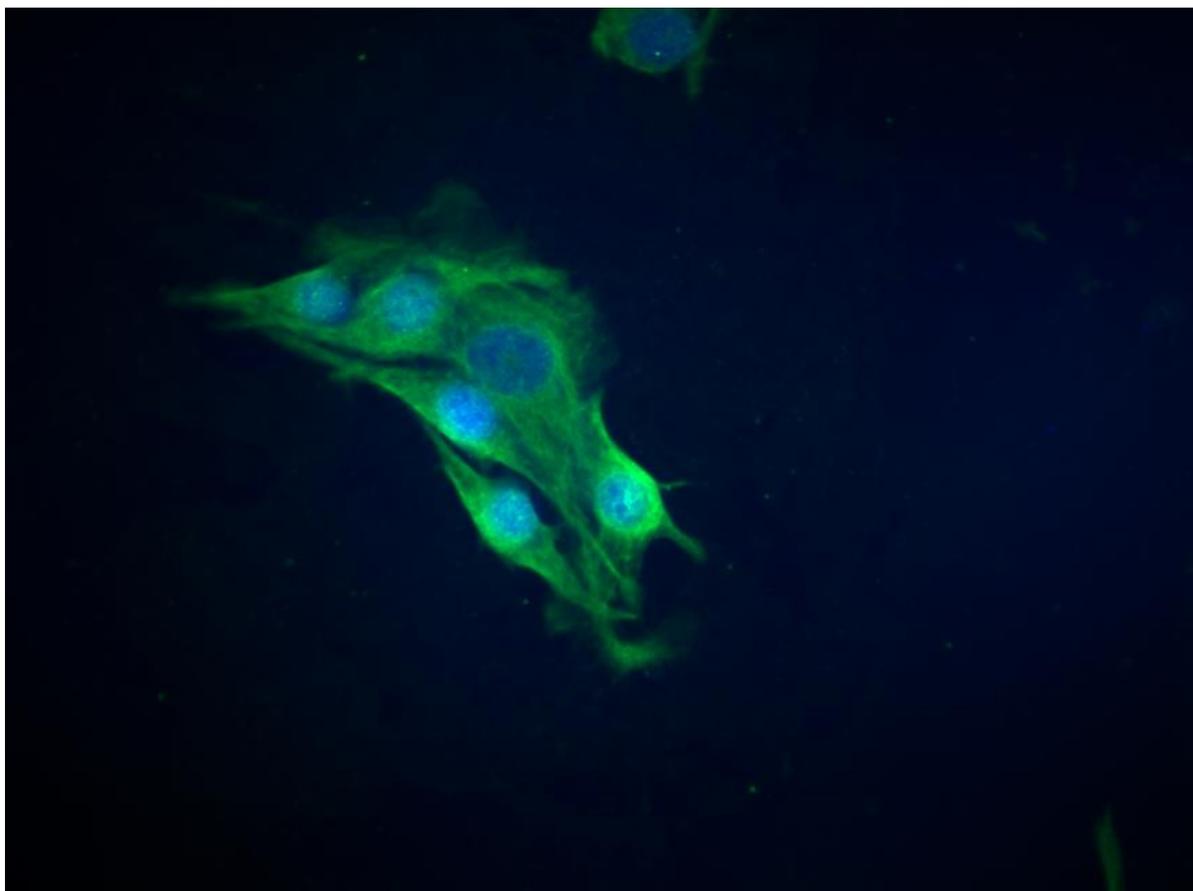


Рисунок 49 – Экспрессия Nestin на клеточной линии mel 1br EEMC

Таким образом, клеточная линия mel 1br EEMC содержит большой процент маркеров стволовой клетки опухоли, по сравнению с материнской линией mel 1br.

3.3 Иммунологический фенотип клеточной линии mel Cher EE

Также мы исследовали изменения маркеров стволовой клетки на клоне клеточной линии mel Cher, названном mel Cher EE, полученном Морозовой Л.Ф. и соавт. в лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБНУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Результаты представлены на рисунке 42 и в таблице 10.

Мы изучили экспрессию маркеров СКО на клеточной линии mel Cher EE и обнаружили, что по сравнению с материнской линией mel Cher отмечается увеличение количества CD133-положительных клеток (с 8,4 % до 49,8%).

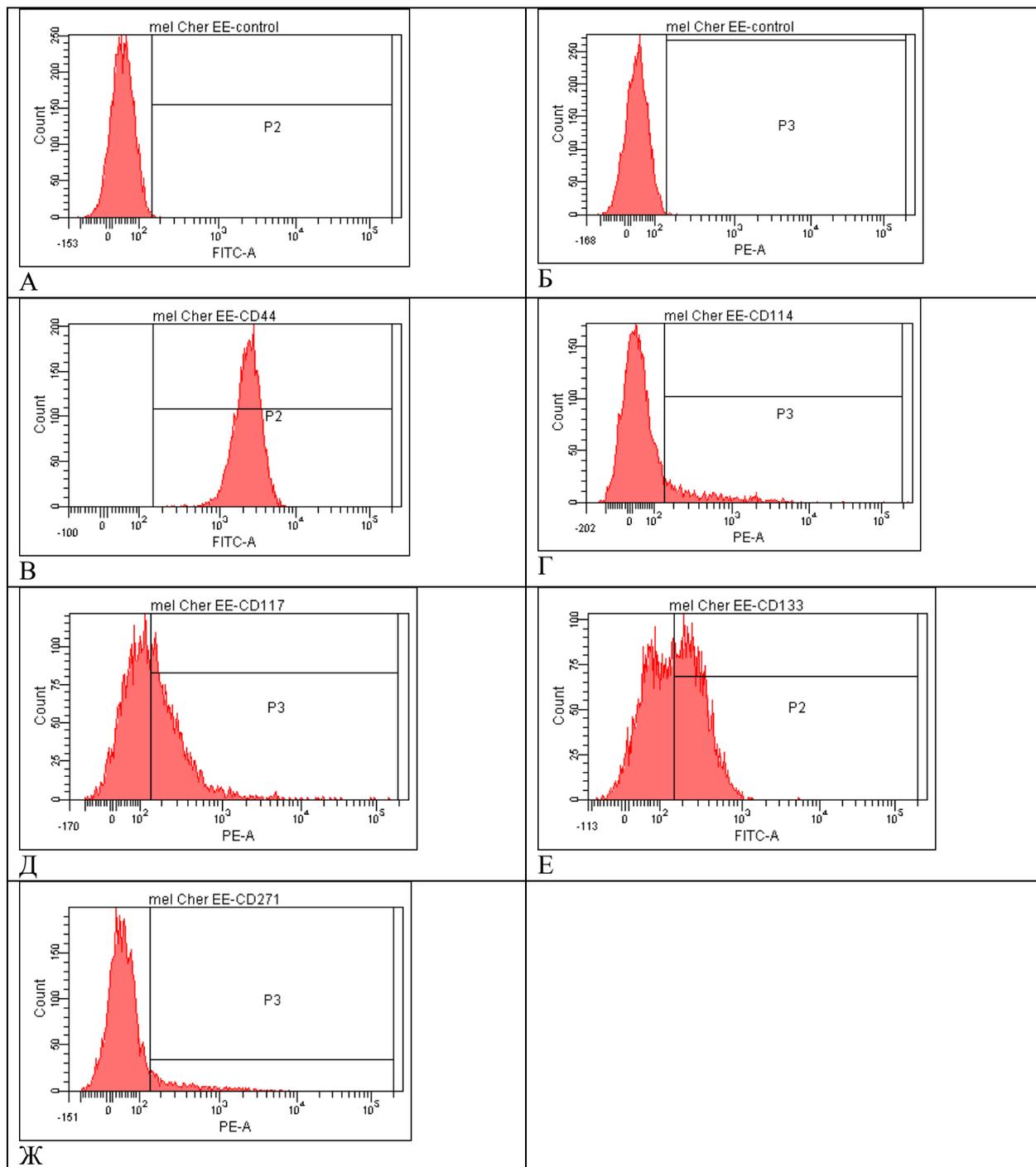


Рисунок 50— Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клетках mel Chcr EE: А, Б – негативный контроль; В – CD44-FITC; Г – CD114-PE; Д – CD117-PE; Е – CD133-PE; Ж – CD271-PE.

Кроме того, увеличилось число CD44-положительных клеток до 100%, а также появилось 44,2% CD117-положительных клеток. Снизилось количество CD271-положительных клеток с 68,6% до 9,3% и CD114 с 26,5 до 12% (табл. 10, рис. 42).

Таблица 10 – Сравнение экспрессии маркеров СКМ на клеточных линиях mel Cher и mel Cher EE

Клеточная линия	Антиген-положительные клетки, %					
	CD44	CD133	CD114	CD117	CD271	ABCB5
Mel Cher	76,2	8,4	26,5	3,7	68,6	+
Mel Cher EE	100	50	12	40,0	9,3	+

В иммуноцитохимическом окрашивании показана экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel Cher EE (рис. 43).

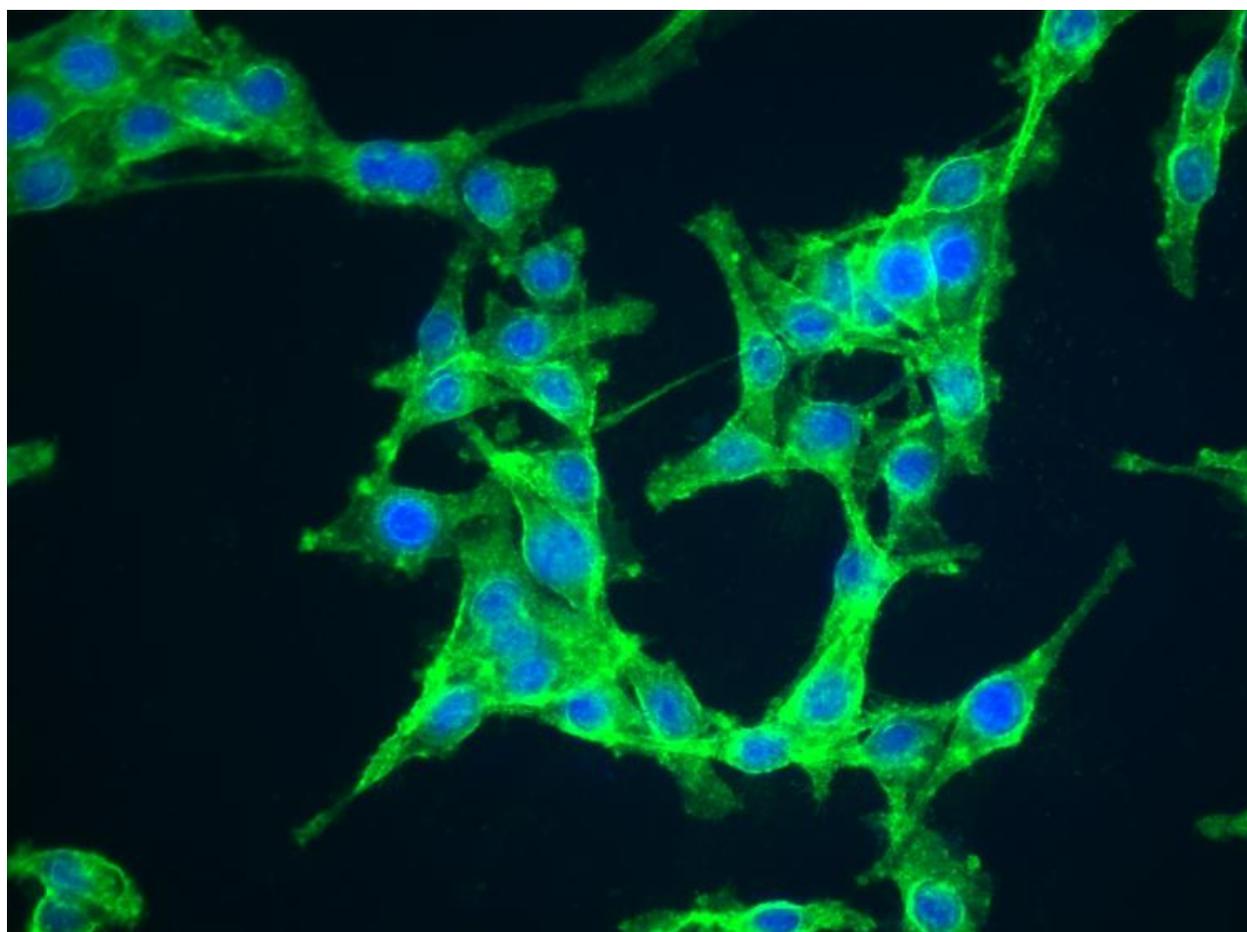


Рисунок 51 – Экспрессия ABCB5 на клеточной линии mel Cher EEMC

Таким образом, из клеточных линий метастатической меланомы человека можно выделить популяции клеток, содержащие большой процент клеток, экспрессирующих антигены, ассоциированные с СКО (опухоль-инициирующей популяцией клеток).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Идентификация клеток, способных вызывать и поддерживать рост опухоли, является одним из актуальных направлений фундаментальных исследований в онкологии. Согласно многочисленным публикациям последних лет по данной тематике, такими клетками могут быть стволовые клетки опухоли [51,52,59,73]. Происхождение этих клеток пока еще не до конца понятно. По-видимому, СКО могут появляться из нормальных стволовых клеток или их прямых потомков. Согласно определению American Association of Cancer Research, "стволовыми" считаются клетки внутри опухоли, способные к самообновлению, а также к поддержанию гетерогенности опухоли. СКО обладают неограниченным потенциалом деления и высокой туморогенностью [47]. Известно, что стволовые клетки опухоли тканеспецифичны: в литературе описаны стволовые клетки рака легкого, рака молочной железы, рака толстой кишки и практически все других злокачественных новообразований. Иммунофенотип этих клеток различен, он определяется коэкспрессией нескольких маркеров. Например, при раке легкого на СКО экспрессируются CD133, CD44 и ALDH, при раке яичника – CD44+/CD24–, CD133, ALDH, CD117. Для меланомы описан фенотип CD133, CD271, ABCB5, CD 114.

Поиск маркеров, специфичных именно для СКО, дает возможность выделять популяцию СКО для изучения их свойств при культивировании *in vitro* и при трансплантации иммунодефицитным мышам.

В нашей работе мы исследовали иммунофенотип клеточных линий метастатической меланомы человека, изучив экспрессию антигенов, ассоциированных со стволовой клеткой меланомы (CD133, CD271, ABCB5, CD114) и со СК других опухолей (CD24, CD44, CD90, CD117).

Девятнадцать клеточных линий метастатической меланомы человека, использованных в исследовании, были получены в НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и охарактеризованы по степени дифференцировки [3].

В начале работы мы изучили архивную информацию по историям болезни пациентов, из опухолевого материала которых были получены клеточные линии метастатической меланомы. Оказалось, что 6 пациентов до удаления метастазов, из которых выделены клеточные линии, не подвергались никакому лечению, кроме хирургического, а 10 пациентам проводились химио- и иммунотерапию (один пациент из этой группы получал только иммунотерапию). Два пациента из группы, в которой было только хирургическое удаление опухолей, живы (на момент сбора данных - декабрь 2016г.) Один пациент прожил 7 мес, второй – 1,5 года, по двум пациентам- нет информации. Пациенты, которые получали химио- и иммунотерапевтическое лечение до момента удаления метастаза, из которого получена клеточная линия, погибли в срок от 2 месяцев до 1 года (средняя выживаемость 7,1 мес).

Экспрессия антигенов, ассоциированных с СКО, на клеточных линиях метастатической меланомы была гетерогенной. Антигены, относящиеся к маркерам СКО, по литературным данным коррелируют с плохим прогнозом заболевания и со сниженной выживаемостью пациентов [89].

Мы обнаружили, что по сравнению с клеточными линиями, полученными из метастазов пациентов после иммуно- и химиотерапии, клеточные линии, полученные из опухолевого материала больных, не получавших химиотерапевтическое лечение до момента удаления метастаза, содержали меньший процент клеток, экспрессирующих маркеры СКО. Это клеточные линии mel Z, mel Ksen, mel Mtp, mel Bgf, mel Rac, mel H. Некоторые маркеры, характерные для СКО, не экспрессировались на клетках этих линий (это CD133, CD117, CD90). Пациенты, из метастазов которых получены две умеренно дифференцированные клеточные линии mel Z и mel Ksen, живы по состоянию на декабрь 2016г. (14 и 16 лет соответственно с даты получения материала). Клетки линии mel Z экспрессируют только антиген CD271 (19,4%), а mel Ksen CD271 (61,5%). На этих клеточных линиях отсутствует экспрессия ABCB5- белка-транспортера, обеспечивающего множественную лекарственную устойчивость

опухоли, согласно многим исследованиям [56,103,70]. С одной стороны, это можно объяснить тем, что пациенты ранее не получали химиотерапию, и данный защитный механизм не успел развиться в клетках опухоли. С другой стороны, пациенты впоследствии прошли химиотерапевтическое лечение, которое оказалось успешным как раз, возможно, из-за отсутствия на клетках опухоли маркера ABCB5.

Клеточные линии метастатической меланомы, полученные из материала пациентов, получавших только хирургическое лечение, по степени дифференцировки относятся к умеренно- и низкодифференцированным. Умеренно дифференцированные клеточные линии из группы, не получавшей лечение – mel Z, mel Ksen и mel Bgf. Пациент, из опухолевого материала которого получена клеточная линия mel Bgf, прожил 2,5 года с момента удаления метастаза. Клеточная линия mel Bgf также не экспрессировала ABCB5. Но, в отличие от mel Z и mel Kor, клеточная линия mel Bgf содержала популяцию CD114-положительных клеток (9,5%).

Остальные три клеточные линии из материала больных, не получавших лекарственную противоопухолевую терапию, относятся к низкодифференцированным. Это линии mel Mtp, Mel Rac, mel H.

Интересно, что на клетках линии mel Mtp не выявлено экспрессии никаких маркеров из исследуемых, в том числе и ABCB5. Но пациент, из материала которого получена данная клеточная линия, умер через 7 месяцев после забора материала вследствие прогрессирования меланомы, несмотря на проводимое лечение.

Клеточные линии mel Rac и mel H экспрессируют CD114 (5,5% и 11,1% соответственно), CD271 (42,8% и 44,0%), ABCB5. Пациент, из опухолевого материала которого получена клеточная линия mel Rac, прожил 1,5 года с момента удаления метастаза. Полной информации о пациенте, из опухоли которого получена клеточная линия mel H, мы не нашли.

Также не удалось найти информацию о лечении трех пациентов, из метастазов которых получены высокодифференцированная клеточная линия mel Me и две умеренно дифференцированные линии mel II и mel R.

Десять пациентов, из опухолевого материала которых получены клеточные линии mel Si, mel P, mel Hn, mel Kor, mel Ibr, mel Cher, mel Gus, mel Gi, mel Ch, mel Is получали иммуно- и химиотерапию до удаления у них метастаза, послужившего материалом для создания клеточной линии.

Из архивных материалов мы узнали, что пациент, из метастаза которого получена низкодифференцированная клеточная линия mel Is, получал только иммунотерапию интроном А сразу же после удаления первичной опухоли в 1998 году, то есть за 5 лет до удаления опухоли, из которой получена клеточная линия. На клетках mel Is отсутствовала экспрессия ABCB5.

Статистический анализ при сравнении качественного признака экспрессии белка ABCB5 в группах образцов, полученных от больных прошедших или не прошедших терапию, найдены различия. В клеточных линиях, выделенных из опухолевого материала больных, предварительно получивших лечение, экспрессия ABCB5 наблюдается значимо чаще ($p=0,0433$).

Также статистически значимые результаты получены относительно экспрессии антигена CD133. Этот маркер редко экспрессировался на исследованных нами клеточных линиях, он обнаружен на 3 клеточных линиях из материала больных, ранее получавших химиотерапию: умеренно дифференцированной mel P (6,2%) и низкодифференцированных mel Ibr (8,5%), mel Cher (8,4%). Антиген CD133 присутствует на стволовых опухолевых клетках многих солидных опухолей и является одним из самых значимых маркеров плохого прогноза заболевания.

CD114 экспрессировался клетками 13 линий из 19, но небольшим процентом клеток. Небольшую CD114-популяцию клеток содержала половина клеточных линий, из материала больных, не получавших химиотерапию: умеренно-дифференцированная линия mel Bgf (9,5%) и две низкодифференцированные линии mel Rac (5,2%), mel H (11,0%). 8 из 10 линий из

материала больных после химиотерапевтического лечения экспрессировали CD114: mel Si (15,3%), mel P (10,0%), mel Kor (19,2%), mel Ibr (8,9%), mel Cher (26,5%), mel Is (6,0%), mel Gus (5,3%), mel Ch (15,7%). CD114 чаще экспрессировался клетками низкодифференцированных линий и линий, полученных из опухолевого материала больных после химио- и иммунотерапии.

Наиболее часто на клеточных линиях метастатической меланомы нами была выявлена экспрессия антигена CD271 (16 из 19 клеточных линий). В половине клеточных линий из метастазов больных, получавших противоопухолевую терапию, наблюдалась экспрессия CD271 в большом проценте клеток: mel Gi (80,5%); mel Ch (71,4%); mel Si (68,6%), mel Ibr (68,8%), mel Cher (68,6%), mel Hn (55,6%), тогда как на большинстве клеточных линий от больных, не получавших терапию, экспрессия его была значительно ниже, однако статистической разницы не получено. Это может быть связано с явлением возрастания резистентности СКО после воздействия химио- и/или иммунотерапии, и отсутствие данных свойств у клеточных линий, которые были выделены от пациентов, проходивших только хирургическое лечение. В современной литературе стволовые клетки меланомы чаще всего описаны как CD271-положительные, но этот маркер не является специфичным только для стволовой клетки. Клетки, экспрессирующие CD271, обладают способностью к инвазии и миграции. В первичных опухолях CD271-положительный фенотип встречается в 2,5 – 41% клеток опухоли [34]

Все исследованные клеточные линии метастатической меланомы имели фенотип CD24⁻/CD44⁺, описанный в литературе как характерный для стволовых клеток некоторых видов опухолей, но не меланомы.

Мы исследовали экспрессию еще одного маркера, не характерного для СКО меланомы – антигена CD90, и обнаружили его экспрессию на 2 клеточных линиях: mel Ibr (59,6%) и mel R (77,2%)

Среди 19 исследованных нами клеточных линий метастатической меланомы CD117 экспрессировали 4: две высокодифференцированные линии (mel Me и mel Si) характеризовались небольшим процентом CD117-положительных клеток (5,2% и 6,8% соответственно), на умереннодифференцированной линии mel П

выявлено 81,7%, на низкокодифференцированной линии mel Kor – 99,6% CD117-положительных клеток.

Высокодифференцированные линии mel Si и mel Me обладают схожим фенотипом: отсутствует экспрессия CD90, CD133, присутствуют небольшой процент CD117-положительных клеток (6,8% и 5,2% соответственно), и CD114-положительных клеток (11,3% и 15,6 % соответственно), а также высокий процент клеток, экспрессирующих CD271 (68,% и 76,1 % соответственно); кроме того обе линии экспрессируют ABCB5. Но поскольку всего две линии из 19 были высококодифференцированные, сложно сделать заключение касательно этих результатов.

Умеренно дифференцированные и низкокодифференцированные клеточные линии имеют более гетерогенную экспрессию маркеров СКО. Низкодифференцированные клеточные линии экспрессируют в сумме больше маркеров СКО.

Клеточные линии, полученные из метастазов больных, проходивших ранее химиотерапевтическое лечение, экспрессировали суммарно большее число маркеров СКМ, по сравнению с клеточными линиями пациентов, которым проводилась системная противоопухолевая терапия. В клеточных линиях, полученных от больных, получивших противоопухолевую терапию, отмечался более высокий уровень экспрессии CD133 ($p=0,028$), по сравнению с клеточными линиями, из материала больных, не получавших терапию.

Экспрессия антигенов CD90, CD117 и CD133 выявлена только на опухолевых клеточных линиях больных, получавших химиотерапию. Также наличие антигена ABCB5 отмечено на всех клеточных линиях пациентов, получавших химиотерапию.

В результате нашей работы удалось выделить из клеточной линии mel Ibr, содержащей 8,4% CD133-положительных клеток, популяцию со 100% экспрессией данного антигена. В клонированной клеточной линии mel Ibr ЕЕМС также отмечалось повышение уровня CD114-положительных клеток до 19% и снижения процента CD271-положительных клеток. На клеточной линии mel Ibr

ЕЕМС появилась экспрессия маркеров стволовых клеток Oct-4, SOX-2, Nestin, отсутствовавших на материнской линии mel Ibr, однако эти антигены экспрессируют все клетки линии mel Ibr ЕЕМС.

На другом клоне – mel Cher ЕЕ, полученном из клеточной линии mel Cher, также увеличен процент CD133-позитивных клеток (с 8,4% до 49,8 %). Кроме того, в клонированной линии увеличилось число CD44-положительных клеток до 100%, появилось 44,2% CD117-положительных клеток. Снизилось количество CD271-положительных клеток с 68,6% до 9,3% и CD114 с 26,5 до 12%.

Таким образом, из клеточных линий метастатической меланомы человека можно выделить популяции клеток, содержащие больший процент клеток с экспрессией СКО-ассоциированных антигенов. Однако 100% экспрессия какого-либо из маркеров, ассоциированных со СКО, не является показателем того, что эта клеточная линия содержит 100% СКО.

Для характеристики популяции клеток, возможно иницирующих опухоль целесообразна одномоментная оценка нескольких антигенов.

Изучение маркеров, характеризующих aberrантный иммунофенотип опухоли, можно использовать для развития новых подходов к прогнозу болезни и лечению злокачественных новообразований.

ВЫВОДЫ

1. Клеточные линии метастатической меланомы, полученные из опухолевого материала больных в различные периоды лечения, имеют фенотип CD24-/CD44+ и характеризуются гетерогенной по числу экспрессией маркеров CD90, CD114, CD117, CD133, CD271, ABCB5.

2. При сравнении клеточных линий метастатической меланомы из материала пациентов, в зависимости от наличия или отсутствия у них химиотерапии, более высокий уровень экспрессии CD 133 ($p=0,028$) и большая частота экспрессии ABCB5 ($p=0,0433$), низкая степень дифференцировки и присутствие маркеров CD90, CD117 наблюдалось у пациентов при лечении цитостатиками.

3. Умеренно и низкодифференцированные клеточные линии меланомы человека на большем проценте клеток экспрессируют антигены CD114 (от 4,8 до 26,5 %), CD117(от 8,4 до 99%), CD133 (8,5%), CD271 (4,6 до 76,1 %) и белок ABCB5 (положительный на 13 из 19 клеточных линий), ассоциированные со стволовой опухолевой клеткой.

4. Высокодифференцированные клеточные линии обладают схожим фенотипом: для них характерна высокая экспрессия CD271 (68,6 – 76,1 %), наличие небольшого процента CD117- и CD114 положительных клеток (5,2–6,8 % и 11,3–15,6% соответственно) и отсутствие CD133 и CD90.

5. Получены 2 дочерние клеточные линии, обогащенные клетками с экспрессией маркеров стволовой опухолевой клетки CD133 (от 50% до 100%), CD117 (40%), Oct-4 (8,5%), SOX-2(10,5%), Nestin (+), ABCB5(+), и с утратой экспрессии антигена CD271, из клеточных линий метастатической меланомы при культивировании в среде Methocult-GI H4434.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ABC-транспортеры (Adenosine triphosphate-binding cassette transporters) – семейство АТФ-зависимых транспортных белков

AACR – American Association of Cancer Research (Американская ассоциация по исследованию рака)

ALDH – aldehyde dehydrogenase (альдегид-дегидрогеназа)

HIF1 α – hypoxia-inducible factor 1 α (фактор индуцирующий гипоксию)

IL-2 – interleukin 2 (интерлейкин 2)

LeX – Lewis X antigen (Льюис X антиген)

МАРК – Mitogen-Activated Protein Kinase (митоген-активированная протеинкиназа)

MDR1 – Multiple Drug Resistance 1 (ген множественной лекарственной устойчивости 1)

MHC Class 1 – Major Histocompatibility Complex (главный комплекс гистосовместимости 1-го класса)

ММР – матриксные металлопротеиназы

НМКРЛ- немелкоклеточный рак легкого

PD-1 – Programmed Cell Death 1 Receptor (рецептор программированной смерти клетки 1)

PE – phycoerythrin (фикоэритрин)

RANK – Receptor Activator of Nuclear Factor (рецептор-активатор ядерного фактора)

ЗНО- злокачественные новообразования

СК – стволовые клетки

СКМ – стволовые клетки меланомы

СКО – стволовые клетки опухоли

SSEA-1 – Stage-specific embryonic antigen 1 (стадия-специфический эмбриональный антиген 1)

STAT3 – signal transducer and activator of transcription 3 (сигнальный передатчик и активатор транскрипции 3)

TAP – transporter associated with antigen processing (транспортер, ассоциированный с представлением антигена)

TRAIL – Tumor Necrosis Factor related apoptosis inducing ligand (апоптоз-индуцирующий TNF-лиганд)

ТЭС – телячья эмбриональная сыворотка;

VEGF – Vascular Endothelium Growth Factor (фактор роста эндотелия сосудов)

VEGF-R2 – Vascular Endothelium Growth Factor Receptor 2 (рецептор 2 фактора роста эндотелия сосудов)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барышников, А.Ю. Иммунологический фенотип ранних гемопоэтических клеток – предшественников человека / А.Ю. Барышников // Экспериментальная онкология. – 1993. – Т. 15, №6. – С. 3-7.
2. Бережной, А.Е. Анализ экспрессии молекул HLA-E в клетках меланомы человека / А.Е. Бережной, И.Р. Закеева, А.В. Кибардин, А.Д. Чернышева, В.М. Моисеенко, А.О. Данилов, Л.В. Демидов, А.Ю. Барышников, Н.В. Гнучев, Г.П. Георгиев, С.С. Ларин // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, №3. – С. 66-71.
3. Бурова, О.С. Получение и характеристика клеточных линий меланомы человека для создания противоопухолевых вакцин: Автореф. Дис. ... канд. биол. наук: 14.01.12 / О.С. Бурова. – М., 2010. – 26 с.
4. Кадагидзе, З.Г. Иммунофенотипические и функциональные особенности стволовых клеточных лейкозов / З.Г. Кадагидзе, Н.Н. Тупицын, Т.Н. Заботина, О.В. Короткова, А.В. Соколов, Г.Ш. Овумян, И.С. Петерсон, М.А. Френкель, А.Ю. Барышников // Российский онкологический журнал. – 1996. – №1. – С. 43-48.
5. Лисяный, Н.И. Стволовые опухолевые клетки злокачественных глиальных опухолей мозга / Н.И. Лисяный, А.Н. Лисяный // Онкология. – 2010. – Т. 12, №3. – С. 229-236.
6. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Киселев С.Л., Бурова О.С. Морозова Л.Ф. Патент на изобретение «Клеточная линия меланомы человека Mel Mtp, используемая для получения противоопухолевых вакцин». №2360963. Российский патент июнь 2009.
7. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Киселев С.Л., Бурова О.С. Морозова Л.Ф., Самойленко И.В. Патент на изобретение «Клеточная линия меланомы человека Mel Z, используемая для получения противоопухолевых вакцин». №2390556. Российский патент 27 мая 2010.
8. 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. Патент на изобретение «клеточной линии Mel Kor». №2287578. Российский патент июнь 2006.

9. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Морозова Л.Ф., Бережной А.Е., Козлов А.М., Ларин С.С., Георгиев Г.П., Ворожцов Г.Н., Гнучев Н.В. Патент на изобретение «Клеточная линия меланомы человека Mel Ibr, используемая для получения противоопухолевых вакцин». №2287576. Российский патент 20 ноября 2006.

10. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Морозова Л.Ф., Бурова О.С., Демидов Л.В., Палкина Т.Н., Козлов А.М., Ларин С.С., Георгиев Г.П., Ворожцов Г.Н., Гнучев Н.В. Патент на изобретение «Клеточная линия mel P». №2287575. Российский патент июнь 2006.

11. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Киселев С.Л., Бурова О.С., Морозова Л.Ф. Патент на изобретение «Клеточная линия меланомы mel Cher, используемая для получения противоопухолевых вакцин». №2364624. Российский патент 20 августа 2009.

12. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Киселев С.Л., Бурова О.С. Морозова Л.Ф., Самойленко И.В. Патент на изобретение «Клеточная линия меланомы человека mel Vgf, используемая для получения противоопухолевых вакцин». №2390557. Российский патент 27 мая 2010.

13. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Киселев С.Л., Бурова О.С. Морозова Л.Ф. Патент на изобретение «Клеточная линия меланомы человека Mel Si, используемая для получения противоопухолевых вакцин». №2363734. Российский патент 10 августа 2009.

14. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Киселев С.Л., Бурова О.С. Морозова Л.Ф. Патент на изобретение «Клеточная линия меланомы человека Mel Gus, используемая для получения противоопухолевых вакцин». №2373280. Российский патент 20 ноября 2009.

15. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Киселев С.Л., Бурова О.С. Морозова Л.Ф., Барышников К.А. Патент на изобретение «Клеточная линия

меланомы человека Mel Ksen, используемая для получения противоопухолевых вакцин». №2008151673. Российский патент 20 июня 2010.

16. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Киселев С.Л., Бурова О.С. Морозова Л.Ф. Патент на изобретение «Клеточная линия меланомы человека Mel Ch, используемая для получения противоопухолевых вакцин». №2373279. Российский патент 20 ноября 2009.

17. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Морозова Л.Ф., Бурова О.С., Демидов Л.В., Лукашина М.И., Ларин С.С., Георгиев Г.П., Ворожцов Г.Н., Гнучев Н.В. Патент на изобретение «Клеточная линия Mel П». №2287577. Российский патент июнь 2006.

18. Михайлова, И.Н. Раково-тестикулярные антигены как потенциальные мишени для вакцинотерапии опухолей / И.Н. Михайлова, Р.Ш. Бибилашвили, Д.А. Ковалевский // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, №4. – С. 17-26.

19. Михайлова, И.Н. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов в клетках меланомы человека / И.Н. Михайлова, Д.А. Ковалевский, О.С. Бурова, В.А. Голубева, Л.Ф. Морозова, Е.С. Воронина, И.А. Утяшев, Г.С. Аллахвердян, С. Субраманиан, Т.Т. Кондратьева, Е.А. Черемушкин, С.Л. Киселев, Л.В. Демидов, А.Ю. Барышников, Р.Ш. Бибилашвили // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – Т. 37, №1. – С. 29-39.

20. Михайлова, И.Н. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин / И.Н. Михайлова, М.И. Лукашина, А.Ю. Барышников и др. // Вестник РАМН. – 2005. – №7. – С. 37-40.

21. Туркина, А.Г. "Примитивный" вариант бластного криза хронического миелолейкоза / А.Г. Туркина, И.Н. Моисеевкова, Е.А. Фролова и др. // Терапевтический архив. – 1995. – Т. 67, №7. – С. 22-25.

22. Abdullah, L.N. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells / L.N. Abdullah, E.K. Chow // Clin Transl Med. – 2013. – 17. – P. 3-14.

23. Akunuru, S. Non-small cell lung cancer stem/progenitor cells are enriched in multiple distinct phenotypic subpopulations and exhibit plasticity / S. Akunuru, Q.J. Zhai, Y. Zheng // *Cell death & disease*. – 2012. – T. 3, №7. – P. e352.
24. Alamodi, A.A. Cancer stem cell as therapeutic target for melanoma treatment / A.A Alamodi, A.M Eshaq, S.Y Hassan et al. // *Histol Histopathol*. – 2016. – T. 31, №12. – P. 1291-1301.
25. Al-Hajj, M. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells / M. Al-Hajj, M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – T. 100, №7. – P. 3983-3988.
26. Anido, J. TGF- β receptor inhibitors target the CD44 high/Id1 high glioma-initiating cell population in human glioblastoma / J. Anido, A. Saez-Borderiaz, A. Gonzalez-Junca et al. // *Cancer cell*. – 2010. – T. 18, №6. – P. 655-668.
27. Aptsiauri, N. Role of altered expression of HLA class I molecules in cancer progression / N. Aptsiauri, T. Cabrera, R. Mendez et al. // *Adv. Exp. Med. Biol*. – 2007. – P. 123-131.
28. Bao, S. Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth / S. Bao, Q. Wu, Z. Li et al. // *Cancer research*. – 2008. – T. 68, №15. – P. 6043-6048.
29. Bao S., Park J.M., Kim J. et al. L1 expression as a marker for poor prognosis, tumor progression, and short survival in patients with colorectal cancer // *Ann Surg Oncol*.- 2007.- 14.- 5.- P1703 – 1711
30. Barnhill, R.L. Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study / R.L. Barnhill, J.A. Fine, G.C. Roush et al. // *Cancer*. – 1996. – T. 78, №3. – P. 427-432.
31. Beier, D. CD133+ and CD133–glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles / D. Beier, P. Hau, M. Proeschold et al. // *Cancer research*. – 2007. – T. 67, №9. – P. 4010-4015.
32. Bidlingmaier, S. The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells / S. Bidlingmaier, X. Zhu, B. Liu // *Journal of molecular medicine*. – 2008. – T. 86, №9. – P. 1025-1032.

33.Blanpain, C. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche / C. Blainpain, W.E. Lowry, A. Geoghegan et al. // Cell. – 2004. – T. 118, №5. – P. 635-648.

34.Boiko, A.D. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271 / A.D. Boiko, O.V. Razorenova, M. van de Rijn et al. // Nature. – 2010. – T. 466, №7302. – P. 133-137.

35.Bonnet, D. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell / D. Bonnet, D. Dick // Nature Med. – 1997. – T. 3. – P. 730-737.

36.Boo, Y.J. L1 expression as a marker for poor prognosis, tumor progression, and short survival in patients with colorectal cancer / Y.J. Boo, J.M. Park, J. Kim, Y.S. Chae, B.W. Min, J.W. Um, H.Y. Moon // Annals of surgical oncology. – 2007. – T. 14, №5. – P. 1703-1711.

37.Boonyaratanakornkit, J.B. Selection of tumorigenic melanoma cells using ALDH / J.B. Boonyaratanakornkit, L. Yue, L.R. Strachan et al. // Journal of Investigative Dermatology. – 2010. – T. 130, №12. – P. 2799-2808.

38.Brescia, P. Current strategies for identification of glioma stem cells: adequate or unsatisfactory? / P. Brescia, C. Richichi, G. Pelicci // Journal of oncology. – 2012. – T. 2012.

39. Bu, Y. The origin of cancer stem cells / Y. Bu, D. Cao // Front Biosci. – 2012. – 4. – P. 819-830.

40.Cabuk, D. The distribution of CD44+/CD24-cancer stem cells in breast cancer and its relationship with prognostic factors / D. Cabuk, E. Yetimoglu, T. Simsek, G. Gacar, C. Subasi, Z. Canturk, C. Ercin, E. Karaoz, K. Uygun // Journal of BU ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology. – 2016. – T. 21, №5. – P. 1121-1128.

41.Calvani, M. Etoposide-Bevacizumab a new strategy against human melanoma cells expressing stem-like traits / M. Calvani, F. Bianchini, M.L. Taddei et al. // Oncotarget. – 2016. – T. 7, №32. – P. 51138.

42.Capper, D. Stem-cell-like glioma cells are resistant to TRAIL/Apo2L and exhibit down-regulation of caspase-8 by promoter methylation / D. Capper, T. Cairer, C. Hartman et al. // *Acta neuropathologica*. – 2009. – T. 117, №4. – P. 445-456.

43. Carretro, R. Analysis of HLA class I expression in progressing and regressing metastatic melanoma lesions after immunotherapy / R. Carretro, J.M. Romero, F. Ruiz-Cabello et al. // *Immunogenetics*. – 2008. – 60. – P. 439-447.

44.Chang, C.C. Recent translational research: stem cells as the roots of breast cancer / C.C. Chang // *Breast Cancer Research*. – 2006. – T. 8, №1. – P. 1.

45.Chen, Y.C. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer CD133-positive cells / Y.C. Chen, H.S. Hsu, Y.W. Chen et al. // *PloS One*. – 2008. – 3. – e2637.

46.Chene, G. Expression of stem cell markers in preinvasive tubal lesions of ovarian carcinoma / G. Chene, V. Ouellet, K. Rahimi, V. Barres, L. Meunier, M. De Ladurantaye, D. Provencher, A.M. Mes-Masson // *Hindawi. BioMed Research International*. – 2015. – Article ID 808531.

47.Clarke, M.F. Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells / M.F. Clarke, J.E. Dick, P.B. Dirks et al. // *Cancer Res*. – 2006. – 66. – P. 9339-9344.

48.Clarke, M.F. Stem cells and cancer: two faces of eve / M.F.Clarke, M. Fuller // *Cell*. – 2006. – T. 124, №6. – P. 1111-1115.

49.Le Coz, V. IGF-1 contributes to the expansion of melanoma-initiating cells through an epithelial-mesenchymal transition process / V. Le Coz, C. Zhu, A. Devocelle, A. Vazquez, C. Boucheix, S. Azzi, C. Gallerne, P. Eid, S. Lecourt, J. Giron-Michel // *Oncotarget*. – 2016. – T.7, №50. – P. 82511-82527.

50.Dahl, C. KIT is a frequent target for epigenetic silencing in cutaneous melanoma / C. Dahl, C. Abildgaard, R. Riber-Hansen et al. // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2015. – T. 135, №2. – P. 516-524.

51.Dean, M. Tumour stem cells and drug resistance / M. Dean, T. Fojo, S. Bates // *Nature Reviews Cancer*. – 2005. – T. 5, №4. – P. 275-284.

52.Eaves, C.J. Cancer stem cells: here, there, everywhere? / C.J. Eaves // Nature. – 2008. – 456 (7222). – P. 581-582.

53.Eramo, A. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population / A. Eramo, F. Lotti, G. Sette et al. // Cell Death Differ. – 2008. – 15. – P. 504-514.

54.Fang, D. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas / D. Fang, T.K. Nguyen, K. Leishear et al. // Cancer research. – 2005. – T. 65, №20. – P. 9328-9337.

55.Frank, N.Y. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma / N.Y. Frank, A. Margaryan, Y. Huang et al. // Cancer research. – 2005. – T. 65, №10. – P. 4320-4333.

56.Frank, N.Y. Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter / N.Y. Frank, S.S. Pendse, P.H. Lapchak et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – T. 278, №47. – C. 47156-47165.

57.Frank, N.Y. VEGFR-1 expressed by malignant melanoma-initiating cells is required for tumor growth / N.Y. Frank, T. Schatton, S. Kim et al. // Cancer research. – 2011. – 71. – P. 1474-1485.

58.Fukuda, S. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues / S. Fukuda, L.M. Pelus // Mol Cancer Ther. – 2006. – 5(5). – P. 1087-1098.

59.Fulawka, L. Cancer stem cells – the current status of an old concept: literature review and clinical approaches / L. Fulawka, P. Donizy, A. Halon // Biol Res. – 2014. – 47(1). – P. 66-75.

60.Gupta, T. Stem cell niche irradiation in glioblastoma: providing a ray of hope? / T. Gupta, V. Nair, R. Jalali // CNS Oncol. – 2014. – 3(5). – P. 367-376.

61.Hall, P.E. Laminin enhances the growth of human neural stem cells in defined culture media / P.E. Hall, J.D. Lathia, M.A. Caldwell, C. French-Constant // BMC neuroscience. – 2008. – T. 9, №1. – P. 71.

62.Held, M.A. Characterization of melanoma cells capable of propagating tumors from a single cell / M.A. Held, D.P. Curley, D. Dancort et al. // Cancer research. – 2010. – T. 70, №1. – P. 388-397.

63.Hibe, W. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer / W. Hibe, S. Dirnhofer, F. Oberwasserlecher et al. // *J Clin Pathol.* – 2004. – 57. – P. 965- 969.

64. Hoek, K.S. Cancer stem cells versus phenotype – switching in melanoma / K.S. Hoek, C.R. Goding // *Pigment cell & melanoma research.* – 2010. – T. 23, №6. – P. 746-759.

65.van Houlدت, I.S. Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I expression / I.S. van Houlدت, B.J. Sluijter, L.M. Moesbergen et al. // *Int. J. Cancer.* – 2008. – 123. – P. 609-615.

66.Hsu, M.Y. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host / M.Y. Hsu, F. Meier, M. Herlyn // *Differentiation.* – 2002. – T. 70, №9 - 10. – P. 522-536.

67.Joo, K.M. Clinical and biological implication of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas / K.M. Joo, S.Y. Kim, X. Jin et al. // *Laboratory investigation.* – 2008. – T. 88, №8. – P. 808-815.

68.Kartal-Yandim, M. Molecular mechanisms of drug resistance and its reversal in cancer / M. Kartal-Yandim, A. Adan-Gokbulut, Y. Baran // *Crit Rev Biotechnol.* – 2015. – 1. – P. 11-18.

69.Kasai, T. Cancer stem cells converted from pluripotent stem cells and the cancerous niche / T. Kasai, L. Chen, A. Mizutani et al. // *Stem Cells Regen Med.* – 2014. – 10(1). – P. 2-7.

70.Kathawala, R.J. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade / R.J. Kathawala, P. Gupta, C.R. Ashby, Z.S. Chen // *Drug Resistance Updates.* – 2015. – T. 18. – P. 1-17.

71.Kim, Y.J. The DNA aptamer binds stemness – enriched cancer cells in pancreatic cancer / Y.J. Kim, H.S. Lee, D.E. Jung, J.M. Kim, S.Y. Song // *Journal of Molecular Recognition.* – 2016.

72.Klein, C.A. Parallel progression of primary tumours and metastases / C.A. Klein // *Nature Reviews Cancer.* – 2009. – T. 9, №4. – P. 302-312.

73.Kozovska, Z. Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells / Z. Kozovska, V. Gabrisova, L. Kucerova // *NEOPLASMA*. – 2016. – T. 63, №4. – P. 510-517.

74.Kumar, D. Notch1-MAPK Signaling Axis Regulates CD133+ Cancer Stem Cell-Mediated Melanoma Growth and Angiogenesis / D. Kumar, M. Gorain et al. // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2016. – T. 136, №12. – P. 2462-2474.

75.Kupas, V. RANK is expressed in metastatic melanoma and highly upregulated on melanoma-initiating cells / V. Kupas, C. Weishaupt, D. Siepmann et al. // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2011. – T. 131, №4. – P. 944-955.

76.Lang, D. Melanocytes, melanocyte stem cells, and melanoma stem cells / D. Lang, J.B. Mascarenhas, C.R. Shea // *Clin Dermatol*. – 2013. – 31(2). – P. 166-178.

77.Lebron, M.B. A human monoclonal antibody targeting the stem cell factor receptor (c-Kit) blocks tumor cell signaling and inhibits tumor growth / M.B. Lebron, L. Brennan, C.B. Damoci // *Cancer biology & therapy*. – 2014. – T. 15, №9. – P. 1208-1218.

78.Lee, P.P. Characterization of circulating T-cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients / P.P. Lee, C. Yee, P.A. Savage et al. // *Nat Med*. – 1999. – 5. – P. 677-685.

79.Leung, E.L. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties / E.L. Leung, R.R. Fiscus, J.W. Tung et al. // *PloS one*. – 2010. – T. 5, №11. – P. e14062.

80.Li, A. The biology of melanocyte and melanocyte stem cell / A. Li // *Acta Biochim Biophys Sin*. – 2014. – 46(4). – P. 255-260.

81.Liao, W.T. Metastatic cancer stem cells: from the concept to therapeutics / W.T. Liao, Y.P. Ye, Y.J. Deng et al. // *Am J Stem Cells*. – 2014. – 3(2). – P. 46-62.

82.Lin, J. The prognostic role of the cancer stem cell marker CD44 in ovarian cancer: a meta-analysis / J. Lin, D. Ding // *Cancer Cell International*. – 2017. – T. 17, №1. – P. 8.

83.Lukenda, A. Expression and prognostic value of putative cancer stem cell markers CD117 and CD15 in choroidal and ciliary body melanoma / A. Lukenda, S.

Dotlic, N. Vukojevic et al. // *Journal of clinical pathology*. – 2016. – T. 69, №3. – P. 234-239.

84.Magnoni, C. Stem cell properties in cell cultures from different stage of melanoma progression / C. Magnoni, S. Giudice, G. Pellacani et al. // *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. – 2014. – T. 22, №3. – P. 171-181.

85.Martello, G. The nature of embryonic stem cells / G. Martello, A. Smith // *Annu Rev Cell Dev Biol*. – 2014. – 30. – P. 647-75.

86.Meng, X. Both CD133+ and CD133-subpopulations of A549 and H446 cells contain cancer-initiating cells / X. Meng, M. Li, X. Wang et al. // *Cancer Sci*. – 2009. – 100. – P. 1040-1046.

87.Mihatsch, J. Selection of radioresistant tumour cells and presence ALDH1 activity in vitro / J. Mihatsch, M. Toulany, P.M. Bareiss et al. // *Radiother Oncol*. – 2011. – 99. – P. 300-306.

88.Mizugaki, H. CD133 expression: a potential prognostic marker for non-small cell lung cancers / H. Mizugaki, J. Sakakibara-Konishi, J. Kikuchi et al. // *Int J Clin Oncol*. – 2014. – 19. – P. 254-259.

89.Mohamed, A. Tumor stem cells (CD271, c-kit, SOX10) in Melanomas: prognostic and outcome implications / A. Mohamed, R.S Gonzalez, D. Lawson et al. // *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. – 2014. – T. 22, №2. – P. 142-145.

90.Monzani, E. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential / E. Monzani, F. Facchetti, E. Galmozzi et al. // *European journal of cancer*. – 2007. – T. 43, №5. – P. 935-946.

91.Moreb, J.S. ALDH isoximes downregulation affects cell growth, cell mobility and gene expression in lung cancer cells / J.S. Moreb, H.V. Baker, L.J. Chang et al. // *Molecular cancer*. – 2008. – T. 7, №1. – P. 1.

92.Nguyen, D.X. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization / D.X. Nguyen, P.D. Bos, J. Massagué // *Nat Rev Cancer*. – 2009 – 9(4). – P. 274-284.

93.Okudela, K. Expression of the potential cancer stem markers CD133, CD44, ALDH, and beta-catenin, in primary lung adenocarcinoma – the prognosis significance / K. Okudela, T. Woo, H. Mitsui et al. // *Pathol Int.* – 2012. – 62. – P. 791-801.

94.Patel, M. ALDH1A1 and ALDH3A1 expression in lung cancers: correlation with histologic type and potential precursors / M. Patel, L. Lu, D.S. Zanger et al. // *Lung Cancer.* – 2008. – 59. – P. 340-349.

95.Penno, M.B. Expression of CD44 in human lung tumors / M.B. Penno, J.T. August, S.B. Baylin et al. // *Cancer Res.* – 1994. – 54. – P. 1381-1387.

96.Pinc, A. Targeting CD20 in melanoma patients at high risk of disease recurrence / A. Pinc, R. Somasurdam, C. Wagner et al. // *Molecular Therapy.* – 2012. – 20(5). – P. 1056-1062.

97.Plaks, V. The Cancer Stem Cell Niche: How Essential Is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells? / V. Plaks, N. Kong, Z. Werb // *Cell Stem Cell.* – 2015. – 16(3). – P. 225-238.

98.Quintana, E. Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized / E. Quintana, M. Shackleton, H.R. Foster et al. // *Cancer Cell.* – 2010. – 18. – P. 510–523.

99.Rappa, G. The Stem Cell - Associated Antigen CD133 (Prominin - 1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma / G. Rappa, O. Fodstad, A. Loricco // *Stem Cells.* – 2008. – T. 26, №12. – P. 3008-3017.

100.Regad, T. Molecular and cellular pathogenesis of melanoma initiation and progression / T. Regad // *Cellular and molecular life sciences.* – 2013. – T. 70, №21. – P. 4055-4065.

101.Salnikov, A.V. CD133 is indicated for a resistance phenotype but not represent as prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients / A.V. Salnikov, J. Gladkich, G. Moldenhauer et al. // *Int J Cancer.* – 2010. – 126. – P. 950-958.

102.Scadden, D.T. Nice neighborhood: emerging concepts of the stem cell niche / D.T. Scadden // *Cell.* – 2014. – 157(1). – P. 41-50.

- 103.Schatton, T. Identification of cells initiating human melanomas / T. Schatton, G.F. Murphy, N.Y. Frank et al. // *Nature*. – 2008. – 451. – P. 345–349.
- 104.Schatton, T. Antitumor immunity and cancer stem cells / T. Schatton, M.H. Frank // *Ann NY Acad Sci*. – 2009. – 1176. – P. 154-169.
- 105.Schatton, T. Cancer stem cells and human malignant melanoma / T. Schatton, M.H. Frank // *Pigment cell & melanoma research*. – 2008. – T. 21, №1. – P. 39-55.
- 106.Schatton, T. Modulation of T-cell activation by malignant melanoma initiating cells / T. Schatton, U. Schutte, N.Y. Frank et al. // *Cancer Res*. – 2010. – P. 697-798.
- 107.Sebastian, C. Tracking down the origin of cancer: metabolic reprogramming as a driver of stemness and tumorigenesis / C. Sebastian // *Crit Rev Oncog*. – 2014. – 19(5). – P. 363-382.
- 108.Sharom, F.J. The P-glycoprotein multidrug transporter / F.J. Sharom // *Essays in biochemistry*. – 2011. – T. 50. – P. 161-178.
- 109.Singh, S.K. Identification of a cancer stem cells in human braun tumors / S.K. Singh, I.D. Clarke, M. Terasaki et al. // *Cancer research*. – 2003. – T. 63, №18. – P. 5821-5828.
- 110.Singh, S.K. Identification of human brain tumour initiating cells / S.K. Singh, C. Hawkins, I.D. Clarke et al. // *Nature*. – 2004. – T. 432, №7015. – P. 396-401.
- 111.Šitum, M. Melanoma – Clinical, Dermatoscopic, and Histopathological Morphological Characteristics / M. Situm, M. Buljan, M. Kolić et al. // *Acta Dermatovenerologica Croatica*. – 2014. – T. 22, №1. – P. 1-12.
- 112.Skvortsov, S. Crosstalk between DNA repair and cancer stem cell (CSC) associated intercellular pathways / S. Skvortsov, P. Debbage, P. Lukas, I. Skvortsova // *Semin Cancer Biol*. – 2015. – 31. – P. 36-42.
- 113.Son, M.J. SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma / M.J. Son, K. Woolard, D.H. Nam et al. // *Cell stem cell*. – 2009. – T. 4, №5. – P. 440-452.

114.Sullivan, J.P. Aldehyde dehydrogenase activity selects for long adenocarcinoma stem cells dependent on notch signaling / J.P. Sullivan, M. Spinola, M. Dodge et al. // Cancer research. – 2010. – T. 70, №23. – P. 9937-9948.

115.Tang, M.R. CD24 expression predicts poor prognosis for patients with cutaneous malignant melanoma / M.R. Tang, Y.X. Wang, S. Guo, S.Y. Han, H.H. Li, S.F. Jin // International journal of clinical and experimental medicine. – 2014. – T.7, №11. – P. 4337-4341.

116.Templeton, A.K. Cancer stem cells: progress and challenges in lung cancer / A.K. Templeton, S. Miyamoto, A. Babu et al. // Stem Cell Investigation. – 2014. – T. 1, №4.

117.Thomson, J.A. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts / J.A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro et al. // Science. – 1998. – 282. – P. 1145–1147.

118.Tomasetti, C. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions / C. Tomasetti, B. Vogelstein // Science. – 2015. – 347(6217). – P. 78-81.

119.Tomasetti, C. Half or more of the somatic mutations in cancers of self-renewing tissues originate prior to tumor initiation / C. Tomasetti, B. Vogelstein, G. Parmigiani // Proc Natl Acad Sci USA. – 2013. – 110(6). – P. 1999-2004.

120.Touil, Y. The PI3K/AKT signaling pathway controls the quiescence of the low - Rhodamine123 - retention cell compartment enriched for melanoma stem cell activity / Y. Touil, T. Zuliani, I. Wolowczuk et al. // Stem Cells. – 2013. – T. 31, №4. – P. 641-651.

121.Valyi-Nagy, K. Stem cell marker CD271 is expressed by vasculogenic mimicry-forming uveal melanoma cells in three-dimensional cultures / K. Valyi-Nagy, B. Kormos, M. Ali et al. // Molecular Vision. 2012. – 18. – P. 588-592.

122.Wang, J. c-Myc is required for maintenance of glioma cancer stem cells / J. Wang, H. Wang, Z. Li et al. // PloS one. – 2008. – T. 3, №11. – P. 3769-3776.

123.Wang, K. Redox homeostasis: the linchpin in stem cell self-renewal and differentiation / K. Wang, T. Zhang, Q. Dong et al. // Cell death & disease. – 2013. – T. 4, №3. – P. e537.

124.Woo, T. Prognostic value of CD133 expression in stage I lung adenocarcinomas / T. Woo, K. Okudela, H. Mitsui et al. // Int J Clin Exp Pathol. – 2010. – 4. – P. 32-42.

125.Zage, P.E. CD114: A new member of the neural crest - derived cancer stem cell marker family / P.E. Zage, S.B. Whittle, J.M. Shohet // Journal of Cellular Biochemistry. – 2017. – T. 118, №2. – P. 221-231.

126.Zeppernick, F. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients / F. Zeppernick, R. Ahmadi, B. Campos et al. // Clinical Cancer Research. – 2008. – T. 14, №1. – P. 123 – 129.

127.Zhang, J. CD133 expression associated with poor prognosis in ovarian cancer / J. Zhang, X. Guo, D.V. Chang et al. // Med Phatol. – 2012. – 25. – P. 456-466.

128.Zheng, J. NDRG2 inhibits hepatocellular carcinoma adhesion, migration and invasion by regulating CD24 expression / J. Zheng, Y. Li, J. Yang et al. // BMC cancer. – 2011. – T. 11, №1. – P. 1.