

Резистентные к вемурафенибу клетки меланомы приобретают свойства мезенхимальных стволовых клеток

А. А. Варгания¹, О. С. Булова¹, Х. С. Вишнякова², И. В. Самойленко¹,
В. А. Мисюрин¹, Е. Е. Егоров², О. О. Рябая¹, М. А. Барышникова¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН»; Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32

Контакты: Амалия Арташевна Варгания zhivotov57@mail.ru

Введение. Мутация в онкогене *BRAF* приводит к конститутивной активации *BRAF*-киназы и обеспечивает независимость пролиферации клеток меланомы от присутствия лиганда. Ингибиторы *BRAF*-киназы заметно увеличивают общую выживаемость больных метастатической меланомой, однако у половины больных через 6–8 мес приема препарата наступает резистентность. **Цель исследования** — получение культуры клеток меланомы из опухолей больных, которые перестали отвечать на терапию вемурафенибом, а также изучение механизмов, вовлеченных в возникновение этой резистентности.

Материалы и методы. Были использованы двухмерное культивирование опухолевых клеток, включая получение культуры клеток из опухолевого материала больных, иммуноцитохимический анализ, иммунофлуоресцентный анализ, полимеразная цепная реакция в реальном времени, модели дифференцировки клеток.

Результаты. Из опухолевого материала больных меланомой кожи с мутацией *BRAF*^{V600E}, резистентной к вемурафенибу, были получены 2 клеточные линии меланомы — *Mel Ki* и *Mel F1702*. Клетки имели типичную для меланом веретеноподобную форму. Значения *IC*₅₀ для *Mel Ki* и *Mel F1702* составляли 4,7 и 6,3 мкМ вемурафениба соответственно. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов практически отсутствовала в обеих линиях клеток. Иммунофенотипический профиль клеток выявил высокую экспрессию маркеров мезенхимальных стволовых клеток, таких как *CD90*, *CD105* и *CD44*. Обе клеточные линии меланомы обладали способностью дифференцироваться *in vitro* в остеобластоподобные и адипоцитоподобные клетки.

Заключение. Полученные результаты указывают на фенотипическую транзигацию резистентных к вемурафенибу клеток меланомы в мезенхимальноподобные стволовые клетки.

Ключевые слова: меланома, *BRAF*^{V600E}, вемурафениб, резистентность, мезенхимальная стволовая клетка

Для цитирования: Варгания А. А., Булова О. С., Вишнякова Х. С. и др. Резистентные к вемурафенибу клетки меланомы приобретают свойства мезенхимальных стволовых клеток. *Успехи молекулярной онкологии* 2019;6(4):47–57.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-4-47-57

Vemurafenib resistant melanoma cells acquire mesenchymal stem cell-like properties

A. A. Vartanian¹, O. S. Burova¹, Kh. S. Vishnyakova², I. V. Samoylenko¹,
V. A. Misyurin¹, E. E. Egorov², O. O. Ryabaya¹, M. A. Baryshnikova¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 32 Vavilova St., Moscow 119991, Russia

Background. Activating mutations in the *BRAF* gene leads to a constitutive activation of the MAPK signaling. The highly selective *BRAF*^{V600E} inhibitor, vemurafenib, improves the overall survival of *BRAF*-mutant melanoma patients. However, despite the excellent results of response rate, the average duration of the response was short and acquired resistance develops in most *BRAF* mutated melanoma patients within a few months.

Objective: to derive melanoma cell lines from surgical species of patients with *BRAF* mutant melanomas resistant to vemurafenib and to elucidate the mechanisms involved in acquired drug resistance.

Materials and methods. *Mel Ki* and *Mel F1702* melanoma cells were obtained from metastases of disseminated melanoma patients with *BRAF*^{V600E} mutation. 2D tumor cell culture, MTT test, immunocytochemistry, flow cytometry, real-time polymerase chain reaction and osteogenic and adipocytic differentiation were used in the study.

Results. We have derived two melanoma cell lines *Mel Ki* and *Mel F1702* from tumor samples of patients with *BRAF*^{V600E} mutation resistant to vemurafenib. These cells were homogenous and had fibroblastic morphology. The *IC*₅₀ values for *Mel Ki* and *Mel F1702* were 4.7 and 6.3 μM, respectively. The expression of cancer-testis antigens was not detected in both types of cells suggesting the stemness of *Mel Ki* and *Mel F1702* melanoma cells. The immunophenotypic profile of the vemurafenib resistant melanoma cells showed the expression of typical mesenchymal stem cells markers such as *CD90*, *CD105* and *CD44*. In addition, we found that the melanoma cell lines derived from tumor resistant to vemurafenib differentiated into osteoblast- and adipocyte-like cells.

Conclusion. *In this study we are offering an experimental evidence of the phenotypic transition of the vemurafenib-resistant melanoma cells into mesenchymal stem-like cells.*

Key words: *melanoma, BRAF^{V600E}, vemurafenib, resistance, mesenchymal stem cell*

For citation: *Vartanian A. A., Burova O. S., Vishnyakova Kh. S. et al. Vemurafenib resistant melanoma cells acquire mesenchymal stem cell-like properties. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2019;6(4):47–57. (In Russ.).*

Введение

Меланома, симптомы которой проявляются у пациентов в любом возрасте, — чрезвычайно злокачественное новообразование. Это уникальная опухоль, поскольку ее можно легко обнаружить на поверхности кожи (визуально), при этом весьма коварная. Поддающаяся лечению в горизонтальной фазе роста, меланома становится резистентной к противоопухолевой терапии в вертикальной фазе роста [1]. Так, 5-летняя выживаемость отмечается в 97,9% случаев, если размер опухоли <0,76 см, и снижается до 57,5% при размере опухоли >3 см [2]. Эффективность лечения метастазирующей меланомы даже в ведущих клиниках мира крайне низка. Классические подходы, такие как химиотерапия и радиотерапия, в случае меланомы дают менее выраженные эффекты, чем при других опухолях. Агрессивное распространение заболевания на ранних стадиях и резистентность меланомы к обычным методам лечения объясняют высокие показатели летальности при меланоме.

За последние 50 лет эффективность лечения диссеминированной меланомы практически не изменилась. Ситуация несколько улучшилась после обнаружения у части больных мутаций в киназе BRAF. Было показано, что некоторые из этих мутаций выполняют онкогенную функцию и приводят к конститутивной активации сигнального пути митогенактивируемой протеинкиназы (MAPK) [3]. У больных меланомами, которые несут мутацию BRAF^{V600E}, прогноз менее благоприятный по сравнению с больными с BRAF дикого типа [4]. Несмотря на то что селективные ингибиторы мутантной киназы увеличивают безрецидивную и общую выживаемость больных меланомой с BRAF-мутацией, у половины больных через 6–8 мес лечения развивается резистентность [5].

Для прохождения всех этапов метастазирования опухолевая клетка должна приобрести ряд свойств, обеспечивающих высокий инвазивный потенциал. В качестве одного из возможных механизмов его приобретения в последние годы активно изучается эпителиально — мезенхимальный переход (ЭМП). Под этим термином подразумевают обратимый процесс приобретения эпителиальными клетками ряда морфологических признаков и функциональных свойств мезенхимальных клеток [6]. ЭМП необходим опухолевым клеткам для успешного отделения от первичного узла, инвазии в окружающие ткани или переноса в другие органы. ЭМП считается одним из ранних процессов, ведущих к диссеминации

опухоли [7]. Помимо облегчения процессов метастазирования программа ЭМП играет важную роль и в возникновении лекарственной резистентности и рецидивов заболевания [8].

Цель исследования — получение культуры клеток меланомы из опухолевого материала больных меланомой, резистентной к вемурафенибу, и изучение механизмов приобретенной резистентности.

Материалы и методы

Реактивы. Первичные анти-CD20, анти-CD24, анти-CD44, анти-CD54, анти-CD90, анти-CD105, анти-CD114, моноклональные антитела анти-CD117 и анти-CD133 были получены от Miltenyi Biotec (Тетероу, Германия). Антитела анти-CD63 и анти-CD271 были приобретены у Serotec AbD (Палег, США), анти-HLA-DR, анти-HLA-ABC, анти-CD31, анти-CD34, анти-CD45 антитела получены от Chemicon International, Inc (Темекула, США). Моноклональные антитела анти-Melan-A приобретены у Cell Margue (США), коллагеназа — у Sigma Aldrich (Ирвин, Великобритания). Dispase и Alexa Fluor 488-конъюгированные вторичные антитела получены от GIBCO/Invitrogen Life Technologies (Карлсбад, США), моноклональные антитела против E-кадгерина (clone NCH-38), N-кадгерина (clone 6G11) и виментина (clone V9) — от DAKO A/S (Глоstrup, Дания).

Дексаметазон, 3-изобутил-1-метил-ксантин и Sudan 4 приобретены у Sigma-Aldrich (Ирвин, Великобритания), β-глицерофосфат — у Calbiochem-Merck (Германия) и L-аскорбиновая кислота 2-фосфат — у Wako Chemicals GmbH (Германия).

Исходный материал. Из опухолевого материала больных метастатической меланомой с мутацией BRAF^{V600E}, резистентной к вемурафенибу, выведены 2 клеточные линии меланомы — Mel Ki и Mel F1702.

У больной 1, 55 лет, с метастатической злокачественной меланомой кожи живота с синхронными метастазами в лимфатические узлы левого пахового отдела выявлена мутация BRAF^{V600E}. Терапию ингибитором BRAF-киназы начали с дозы 960 мг вемурафениба и 2 мг траметиниба. Данные компьютерной томографии подтвердили частичный ответ на лечение через 8 нед. Из-за очень плохой переносимости доза вемурафениба была снижена до 720 мг, затем — до 480 мг. Этот режим был продолжен в течение 4 мес, прежде чем был остановлен из-за прогрессирования заболевания. Клетки меланомы были получены из метастазов кожи.

У больной 2, 71 года, с метастатической злокачественной меланомой правой стопы с множественными внутрикожными (транзиторными) метастазами выявлена мутация BRAF^{V600E}. Терапия вемурафенибом начата с дозы 960 мг, траметинибом – 2 мг. В течение 4 нед после начала приема вемурафениба наблюдалось значительное уменьшение кожных поражений. Полная доза вемурафениба плохо переносилась, вызывая токсичность, поэтому была снижена до 720 мг. Токсичность продолжалась, и прием вемурафениба был остановлен на 2 нед. Через 2 нед больная продолжила лечение вемурафенибом в дозе 480 мг в течение 4 мес. Лечение прекратили из-за кожной токсичности и снижения массы тела. Данные компьютерной томографии не выявили ответа.

Полученные образцы меланомы промывали и измельчали в фосфатно-солевом буфере (PBS) до размера 2–4 мм. Диссоциацию опухолевых клеток проводили ферментативной обработкой 0,1% коллагеназой и диспазой 50 Ед/мл. Далее клетки ресуспендировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 5 мМ глутамина и гентамицина. Клетки высевали в культуральные флаконы 25 см² и растили при температуре 37 °С в присутствии 5% CO₂.

Иммуноцитохимия. Клетки выращивали на стекле до 70–80% монослоя. Далее клетки промывали PBS и фиксировали в ледяном ацетоне 10 мин. Неспецифическая абсорбция антител была минимизирована путем блокирования 1% BSA в PBS в течение 10 мин. Затем клетки инкубировали с первичными антителами в течение 45 мин и промывали PBS 3 раза по 5 мин. Для визуализации реакции антиген – антитело использовали соответствующие Alexa Fluor 488-конъюгированные вторичные антитела. Ядра клеток окрашивали гематоксилином. Флуоресценцию определяли на флуоресцентном микроскопе IN Cell Analyzer (GE Healthcare, США).

Анализ экспрессии антигенов клеточной поверхности методом проточной цитофлуориметрии. Фенотипирование антигенов клеточной поверхности проводили в реакции прямой иммунофлуоресценции. Трехжды промывали 1×10^5 клеток PBS (pH 7,5) и ресуспендировали в PBS. В каждую пробирку добавляли моноклональные антитела, меченные FITC или PE, и инкубировали 30 мин при температуре 4 °С. Клетки дважды отмывали от не связавшихся антител и ресуспендировали в 200 мкл PBS, содержащем 1% формалин. Экспрессию антигенов CD20, CD24, CD31, CD34, CD44, CD45, CD54, CD63, CD90, CD105 и CD117 на клеточной поверхности оценивали на проточном цитофлуориметре FACS CantoII (Becton Dickinson, США). В каждой пробе анализировали до 10 тыс. событий. Анализируемый гейт устанавливали на основании комбинации прямого и бокового рассеивания.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени. Тотальную РНК выделяли из клеток Mel Ki и Mel F1702 с использованием набора RNeasy (Qiagen) в соответствии с инструкцией производителя. Обратную транскрипцию осуществляли с использованием набора для полимеразной цепной реакции GeneAmp RNA (Applied Biosystems, США). Количественную оценку матричных РНК раковотестикулярных антигенов (РТА) проводили с помощью системы детектирования последовательностей ABI PRISM 310 (Perkin Elmer, США) комплементарной ДНК. Ген-специфические олигонуклеотидные праймеры и зонды для РТА человека, а также эндогенная контрольная РНК ABL были получены от Eurogene (Москва, Россия). Детали праймеров приведены в табл. 1. Реакционная смесь содержала 25 мкл TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, США) и 2,5 мкл специфического праймера в конечном объеме 50 мкл. Условия реакции: 60 мин при 45 °С, 10 мин при 70 °С, 5 мин при 4 °С, 10 мин при 95 °С, 40 циклов в течение 15 с при 95 °С, 1 мин при 60 °С и инкубация 5 мин при 25 °С.

Таблица 1. Праймеры, использованные для определения раковотестикулярных антигенов

Table 1. Primers used for identification of cancer/testis antigens

Ген Gene	Праймеры и зонды (прямой праймер, обратный праймер, зонд) Primers and probes (forward primer; reverse primer; probe)
GAGE	5'-AGCTGCTCAGGAGGGAGAGGAT-3' 5'-GGTGACCCTGTTCTGGCTA-3' 5'-(R6G)-CATCTGCAGGTCAAGGGCCGAAGCCTGAA-(BHQ1)-3'
HAGE	5'-GCCACAAGTGCCATGTCAAA-3' 5'-CCTCAAGTCATCCACGTT-3' 5'-(R6G)-AGCAGATAGTTGGAGGAAAGAAAATTTTAA-(BHQ1)-3'
MAGEA1	5'-GAAGGAACCTGACCCAGGCT-3' 5'-AATCCTGTCCTCTGGGTTGG-3' 5'-(R6G)-TGTGAGGAGGCAAGGTTTTTCAGGGGAC-(BHQ1)-3'
NY-ESO-1	5'-TCTGAAGGAGTTCACTGTGT-3' 5'-AGACAGGAGCTGATGGAGAG-3' 5'-(R6G)-AACATACTGACTATCCGACTGACTGCTGCA-(BHQ1)-3'

Окончание табл. 1

End of table 1

Ген Gene	Праймеры и зонды (прямой праймер, обратный праймер, зонд) Primers and probes (forward primer; reverse primer; probe)
<i>PASD1</i>	5'-GTGGGAAATGTTTGCATTCT-3' 5'-AGCTTCATCACTGACTGCCT-3' 5'-(R6G)-TCAGTCTCTGCAGCAACTTTACACTTC-(BHQ1)-3'
<i>SCP1</i>	5'-AAAAGGAACAGAACAAGAAC-3' 5'-TGTGGTAATGGCAGTTAACT-3' 5'-(R6G)-CCAAGCCAGAGAGAAAGAAGTACATGATTT-(BHQ1)-3'
<i>SEMG1</i>	5'-TCCTCATCTTGGAGAAGCAA-3' 5'-TGGGAAAATTCACCTTGGTAA-3' 5'-(R6G)-ATGGGACAAAAGGTGGATCAAAAGGCC-(BHQ1)-3'
<i>SLLP1</i>	5'-ACTTCGGGCTGGACGGATAC-3' 5'-GCGTTGAAACCGCTTGTGAA-3' 5'-(R6G)-ATACAGCTGGCTGACTGGGTCTGCCCTTGCTTA-(BHQ1)-3'
<i>SPANXA1</i>	5'-GAGGAGCGTCCCCTGTGATT-3' 5'-AGCAGTTTGC GG TCTGAGT-3' 5'-(R6G)-AGGCCAACGAGATGATGCCGGAGACCCCAA-(BHQ1)-3'
<i>SSX1</i>	5'-GTATATGAAGAGAACTATAAGG-3' 5'-TATTACACATGAAAGGTGGG-3' 5'-(R6G)-ATGACTAACTAGGTTTCAAAGTCACC-(BHQ1)-3'
<i>PRAME</i>	5'-TCTTCCTACATTTCCCCGGA-3' 5'-GCACTGCAGACTGAGGAACTGA-3' 5'-(FAM)-AAGGAAGAGCAGTATATCGCCCAGTTCACC-(TAMRA)-3'

В качестве положительных контролей использовали клетки Mel P и Mel II, выведенные в клеточную линию из меланом с мутацией BRAF, не леченных вемурафенибом [9]. Происхождение и источники этих клеточных линий были описаны ранее [10].

Остеогенная дифференцировка клеток. Клетки высеивали при плотности 10 000/см² в среде для индукции остеодифференцировки, содержащей DMEM с 10% FBS, 10 мМ β-глицерофосфата, 50 мкг/мл L-аскорбиновой кислоты 2-фосфата и 10 нМ дексаметазона. Среду меняли каждые 3 дня. Отложение кальция на 28-й день дифференцировки было идентифицировано окрашиванием ализариновым красным (AR-S). Остеобласты фиксировали 70% ледяным этанолом в течение 1 ч при температуре -20 °С перед добавлением AR-S, растворенного в дистиллированной воде (рН 4,2). Клетки окрашивали в течение 10 мин при комнатной температуре. Морфологию клеток оценивали с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Diaphot (Nikon, Япония).

Адипогенная дифференцировка. Адипогенную дифференцировку проводили на клетках, высеянных с плотностью 10 000/см². Когда клетки достигали 75–80% конfluence, среду заменяли средой для индукции дифференцировки, которую меняли каждые 3 дня. Культуральная среда для адипогенной дифференцировки содержала: 10 мкг/мл инсулина,

1 мкМ дексаметазона и 100 мкг/мл 3-изобутил-1-метил-ксантина в DMEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Через 21 день клетки фиксировали 4% формальдегидом и окрашивали насыщенным раствором красителя Sudan 4. Морфологию клеток оценивали с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Diaphot (Nikon, Япония).

Заявление об этике. Исследования проводили после утверждения этическим комитетом НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (CA184-089) с письменного согласия пациентов. Протоколы по получению клеток меланомы Mel Ki и Mel F1702 были одобрены этическим комитетом.

Статистический анализ. Все эксперименты выполняли 3 раза независимо друг от друга. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Все статистические анализы проведены с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, США).

Результаты

Получение клеточных линий меланомы Mel Ki и Mel F1702. Первичные клеточные культуры, полученные из мутантных меланом, устойчивых к вемурафенибу и растущих в среде, были гомогенными и имели веретеноподобную форму. Клетки росли медленно, со

значительной задержкой во времени удвоения популяции, и оставались стабильными до 8–9 дней без смены среды.

Статус меланомы был подтвержден экспрессией меланоцит-ассоциированных антигенов, — CD63 и Melan-A/MART-1. На обеих клеточных линиях, Mel Ki и Mel F1702, наблюдалась низкая экспрессия CD63 (18 ± 2 и $16 \pm 2\%$ соответственно) (рис. 1, см. табл. 3). Иммуноцитохимический анализ выявил незначительную экспрессию также меланоцит-ассоциированного антигена — Melan-A/MART-1 (см. рис. 1). При этом экспрессия Melan-A не претерпевала значительных изменений с 5-го по 18-й пассажи (данные не представлены). Обе клеточные линии меланомы были отрицательными по тирозиназе (данные не представлены). Низкая экспрессия обоих антигенов хорошо согласуется с данными литературы: по мере прогрессии в фазу более агрессивного роста клетки меланомы сбрасывают тканеспецифические антигены [1].

Цитотоксичность действия вемурафениба в клеточных линиях меланомы, устойчивых к этому препарату, была рассчитана на основе кривых доза — эффект в МТТ-тестах (IC_{50} через 48 ч). Значения IC_{50} для Mel Ki и Mel F1702 составили 4,7 и 6,3 мкМ соответственно. Согласно данным литературы значение IC_{50} чувствительных к вемурафенибу клеток меланомы с мутацией BRAF^{V600E} варьирует от 20 нМ до 1 мкМ [11]. Таким образом, обе клеточные линии были резистентны к вемурафенибу, что подтверждало клинические данные.

Экспрессия E- и N-кадгерина в резистентных к вемурафенибу клетках меланомы. Несмотря на то что клетки меланомы происходят не из эпителиальных клеток, а из меланоцитов, в литературе накапливаются сообщения о переключении фенотипа клеток меланомы, сходной с программой ЭМП (EMT-like) [12, 13]. Одними из ключевых событий, способствующих переходу меланомы в метастатическую фазу роста, являются потеря клетками E-кадгерина, участвующей в формировании плотных контактов между клетками, и уси-

ление экспрессии N-кадгерина, запускающей реорганизацию актина и увеличивающей подвижность клетки [7]. Мы предположили, что изменения в экспрессии кадгеринов могли бы внести свой вклад в возникновение резистентности к вемурафенибу. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток Mel Ki на экспрессию E- и N-кадгеринов выявило, что экспрессия E-кадгерина в этих клетках сильно подавлена, в то время как экспрессия N-кадгерина значительно повышена (рис. 2а, б), что указывало на мезенхимальный фенотип резистентных клеток. Высокая экспрессия виментина — маркера мезодермальной ткани — подтверждала мезенхимальный характер клеток Mel Ki (рис. 2в).

Контрольные клетки Mel II с мутацией BRAF, полученные из опухолевого материала большой диссеминированной меланомой, не получавшей вемурафениб, также экспрессировали E- и N-кадгерины. Однако экспрессия E-кадгерина была в 2 раза выше, а экспрессия N-кадгерина и виментина существенно не менялась по сравнению с экспрессией этих белков клетками Mel Ki (рис. 2г). Полученные результаты позволяют предположить, что лечение вемурафенибом облегчает разрушение плотных межклеточных контактов, но на дальнейшую реорганизацию актина и повышение подвижности клетки существенно не влияет, следовательно, незначительным будет и вклад в приобретение клеткой способности к метастазированию и ассоциированной с метастазированием лекарственной резистентностью.

Экспрессия РТА в вемурафениб-резистентных клетках меланомы. РТА в норме экспрессируются в семенниках, участвуя в блокировании дифференцировки и способствуя созреванию половых клеток. В последние годы появляется все больше работ, указывающих на то, что РТА экспрессируются и в опухолевых клетках [14, 15] и их появление в опухоли коррелирует с резистентностью к терапии и короткой безрецидивной выживаемостью больных [16]. Мы предположили, что следующей мишенью, способной инициировать резистентность клеток Mel Ki к вемурафенибу,

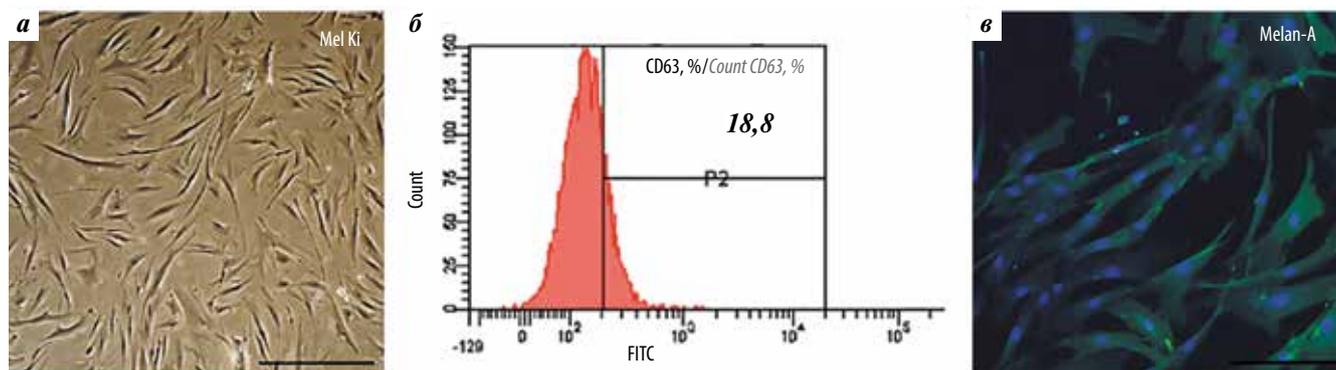


Рис. 1. Подтверждение статуса меланомы: а — клетки Mel Ki, фазово-контрастное изображение; б — экспрессия CD63, определенная проточной цитофлуориметрией; в — флуоресцентное окрашивание клеток Mel Ki на антиген Melan-A (масштаб 200 мкм)

Fig. 1. Confirmation of melanoma status: а — Mel Ki cells, phase-contrast imaging; б — CD63 expression determined by flow cytometry; в — fluorescent staining of Mel Ki cells for Melan-A antigen (scale 200 μm)

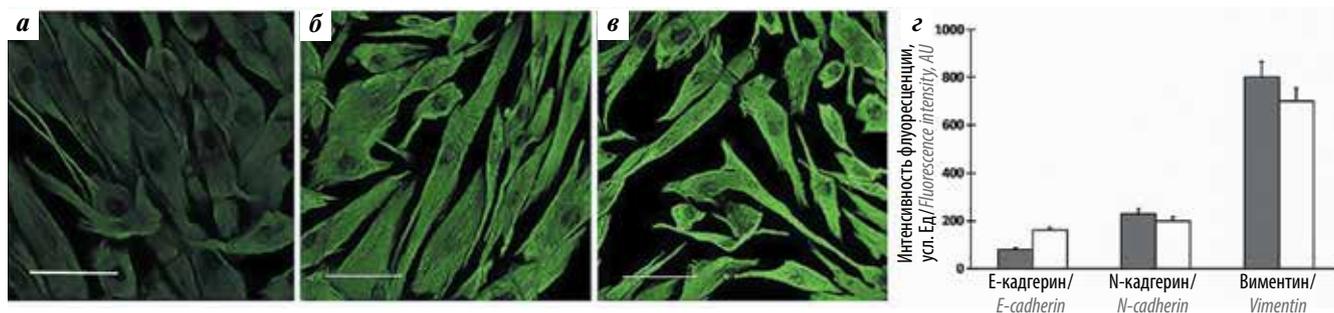


Рис. 2. Экспрессия маркеров эпителиально-мезенхимального перехода. Иммунофлуоресцентное окрашивание на E-, N-кадгерине (а, б) и виментине (в) в клетках Mel Ki (масштаб 200 мкм). Изменение интенсивности флуоресценции маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (г) в контрольных клетках Mel II (белые столбцы) и Mel Ki (черные столбцы)

Fig. 2. Expression of epithelial-mesenchymal transition markers. Immunofluorescent staining of E-, N-cadherin (a, б) and vimentin (в) in Mel Ki cells (scale 200 μ m). Changes in fluorescence intensity of epithelial-mesenchymal transition markers (г) in control Mel II (white columns) and Mel Ki (black columns) cells

могла бы стать экспрессия РТА. Мы выбрали панель из 11 РТА (табл. 2), экспрессирующихся при меланоме [16]. В качестве положительных контролей использовали 2 клеточные линии меланомы: Mel P с мутацией BRAF^{V600E} и Mel II с мутацией BRAF^{V600K}. В табл. 2 обобщены результаты полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией экспрессии РТА в клетках меланомы.

В обоих контролях, полученных из опухолей больной, не леченной вемурафенибом, наблюдалась высокая экспрессия PRAME (4850,20 и 114,87%), одного из основных представителей РТА. Клетки Mel P с мутацией BRAF^{V600E} также были положительными в отношении GAGE, HAGE и SLLP. Наблюдалась высокая экспрессия SLLP, SCP, SPAN и SSX в клетках Mel II с мутацией BRAF^{V600K} и практически нулевая экспрессия всех 11 РТА в клетках Mel Ki. Аналогичная закономерность отмечена и во 2-й клеточной линии, резистентной к вемурафенибу, — Mel F1702.

Иммунофенотипический профиль клеток меланомы Mel Ki и Mel F1702. Чрезвычайно интересным нам представлялось проследить изменения в экспрессии маркеров стволовой клетки меланомы в резистентных

к вемурафенибу клетках меланомы. До недавнего времени предполагалось, что все клетки опухоли обладают одинаковой способностью инициировать опухоль и формировать метастазы. Сегодня достоверно показано, что такими свойствами обладает небольшая популяция особых, самообновляющихся клеток опухоли, называемых стволовыми. Именно эта клеточная популяция опухоли наиболее агрессивна и устойчива практически ко всем видам противоопухолевой терапии. На сегодняшний день обнаружено и охарактеризовано несколько поверхностных маркеров стволовой клетки меланомы: CD20, CD133, CD271 и ABCB5 [17]. Ни клетки Mel Ki, ни клетки Mel F1702 не экспрессировали эти антигены (табл. 3).

Поскольку экспрессия поверхностных антигенов в клетках меланомы с мутацией в BRAF, устойчивых к вемурафенибу, слабо изучена, мы решили проследить и за экспрессией других антигенов. Всего лишь 3,5% клеток Mel Ki экспрессировали CD54, или ICAM-1, участвующем в интегрин-опосредованных коммуникациях клеток [18]. Отсутствие CD24 и низкая экспрессия рецепторов CD117 (см. табл. 3) указывали на высокозлокачественный фенотип клеток Mel Ki

Таблица 2. Профиль экспрессии раковотестикулярных антигенов в клетках меланомы — Mel H1702 и Mel Ki. Уровень экспрессии генов дается как процент по отношению к экспрессии контрольного гена Abl ($p < 0,05$)

Table 2. Expression profile of cancer–testis antigens in Mel H1702 and Mel Ki melanoma cell lines. The expression levels are given in percentage relative to the expression level of the control gene Abl ($p < 0.05$)

Клеточная линия Cell line	GAGE	HAGE	NY-ESO1	MAGE1	PASD	SCP	SEMG	SLLP	SPANX	SSX	PRAME
Mel F1702	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,12
Mel Ki	0,03	0,13	0	0	0	0	0,01	0	0	0,04	0,07
Mel P	2,72	2,92	0	0	0,03	0	0	4,74	0	0,01	4850,29
Mel IL	75,79	0	0	0	0	35,36	0	35,36	4,12	2,06	114,87

Таблица 3. Анализ экспрессии поверхностных антигенов клеток Mel Ki и Mel F1702 методом проточной цитометрии

Table 3. Flow cytometric analysis of Mel Ki and Mel F1702 melanoma cell surface antigens expression

Антиген Antigen	Антиген-позитивные клетки, % Antigen-positive cells, %	
	Mel Ki	Mel F1702
HLA-ABC	90 ± 2	72 ± 2
HLA-DR	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,1
CD63	18 ± 2	16 ± 2
CD54	3,5 ± 0,1	1 ± 0,1
CD24	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1
CD44	99 ± 1,0	98 ± 1,0
CD31	0,80 ± 0,05	0,4 ± 0,1
CD34	0,50 ± 0,05	0,60 ± 0,1
CD45	0,30 ± 0,05	0,30 ± 0,05
CD90	99,2 ± 2	97 ± 3
CD105	98 ± 5	60 ± 3
CD20	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,05
CD117	7,5 ± 0,5	11 ± 1,0
CD133	0,20 ± 0,05	0,20 ± 0,05
CD271	0,10 ± 0,05	0,10 ± 0,05
CD114	4,50 ± 0,05	1,00 ± 0,05

и Mel F1702. Совершенно неожиданно FACS-анализ выявил, что более 99% клеток меланомы Mel Ki экспрессируют типичные маркеры мезенхимальной стволовой клетки (МСК): CD90, CD105 и CD44 (рис. 3, см. табл. 1) [19]. Подобно МСК клетки Mel Ki не экспрессировали ни HLA-DR, ни CD45, ни CD31 или CD34 (см. табл. 3). Иммунофенотипический профиль экспрессии поверхностных антигенов на клетках Mel F1702 оказался тот же: маркеры стволовой клетки меланомы не экспрессируются, наблюдается высокая экспрессия маркеров МСК. В целом наши данные демонстрируют уникальный состав антигенов клеточной поверхности, сходный с МСК, на клетках меланомы, полученных из мутантных меланом, устойчивых к вемурафенибу.

Адиогенная и остеогенная дифференцировка клеток Mel Ki. Основываясь на высокой экспрессии молекулярных маркеров МСК на резистентных к вемурафенибу клетках меланомы, мы предположили, что эти клетки, как и МСК, должны дифференцироваться в клетки мезодермальной линии. Гистологическое окрашивание липидов Sudan 4

в культурах адиогенной дифференцировки выявило, что клетки меланомы к 21-му дню накапливают внутриклеточные липидные пузырьки — характеристики адипоцитов (рис. 4).

Остеогенная дифференцировка клеток меланом, резистентных к вемурафенибу, также прошла успешно. Окрашивание AR-S подтвердило наличие соединений кальция (см. рис. 4). Клетки обеих линий формировали типичные костные узелки. По сравнению с дифференцировкой человеческих МСК, адиогенная и остеогенная дифференцировка культур меланом занимала больше времени, и доля дифференцированных клеток была меньше, хотя и несущественно.

Обсуждение

В основе летальности от меланомы лежит высокая изменчивость клеток опухоли. Многообразие генетических и эпигенетических поломок наследственного аппарата клетки, тем не менее, позволило сформулировать несколько подтипов этого заболевания на основе гиперактивации того или иного сигнального пути [1]. После открытия мутаций в кодоне 600 гена *BRAF* начались активные поиски веществ, воздействующих на мутантный белок. Вемурафениб был фактически первым таргетным препаратом, который стали использовать для лечения метастатической, неоперабельной меланомы [20]. Ингибиторы BRAF-киназы заметно снижали показатели смертности больных метастатической меланомой, однако у половины пациентов через 6–8 мес приема препарата наступала резистентность. Целью нашей работы было получить культуры клеток меланом из опухолей больных, которые перестали отвечать на терапию вемурафенибом, и исследовать механизмы, вовлеченные в возникновение этой резистентности.

Эпителиально-мезенхимальный переход необходим опухолевым клеткам для успешного отделения от первичного узла, инвазии в окружающие ткани или перехода в другие органы. Помимо облегчения процессов метастазирования программа ЭМП играет важную роль и в возникновении лекарственной резистентности. Несмотря на то что клетки меланомы происходят не из эпителиальных клеток, а из меланоцитов, в литературе накапливаются сообщения, связывающие изменения в экспрессии кадгеринов с метастатическим фенотипом клетки [6, 8]. Результаты иммуноцитохимического окрашивания клеток Mel Ki на экспрессию E- и N-кадгеринов показали крайне низкую экспрессию E-кадгерина и высокую экспрессию N-кадгерина и виментина (см. рис. 2a–в), что ассоциируется с переходом резистентных к вемурафенибу клеток в мезенхимальный фенотип. Клетки меланомы, выжившие после таргетной терапии, должны адаптироваться к ингибированию BRAF-киназы, и эта адаптация, по-видимому,

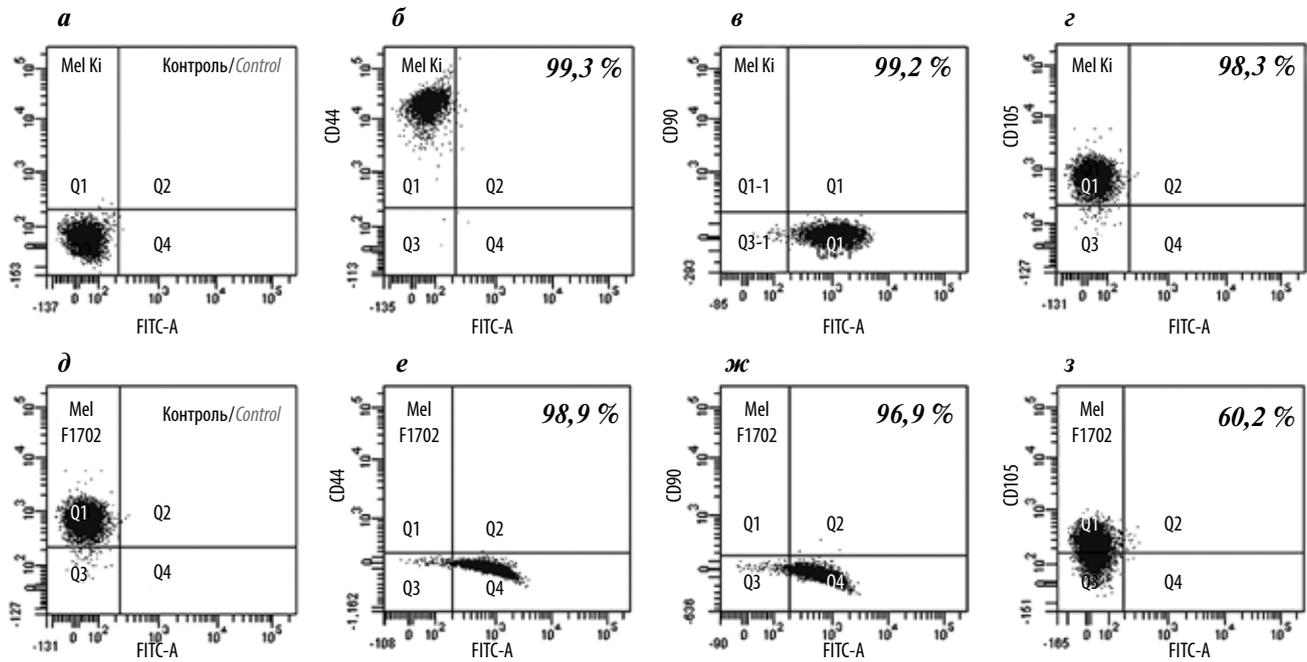


Рис. 3. Иммунофенотипирование клеток меланомы Mel Ki и Mel F1702 проточной цитофлуориметрией: а, д — контрольные клетки Mel Ki и Mel F1702; б—г — окрашивание клеток Mel Ki на CD44, CD90 и CD105; е—з — окрашивание клеток Mel F1702 на CD44, CD90 и CD105

Fig. 3. Immunophenotyping of Mel Ki and Mel F1702 melanoma cells by using flow cytometry: а, д — control, an unstained sample; б—г, е—з — the staining for CD44, CD90 and CD10

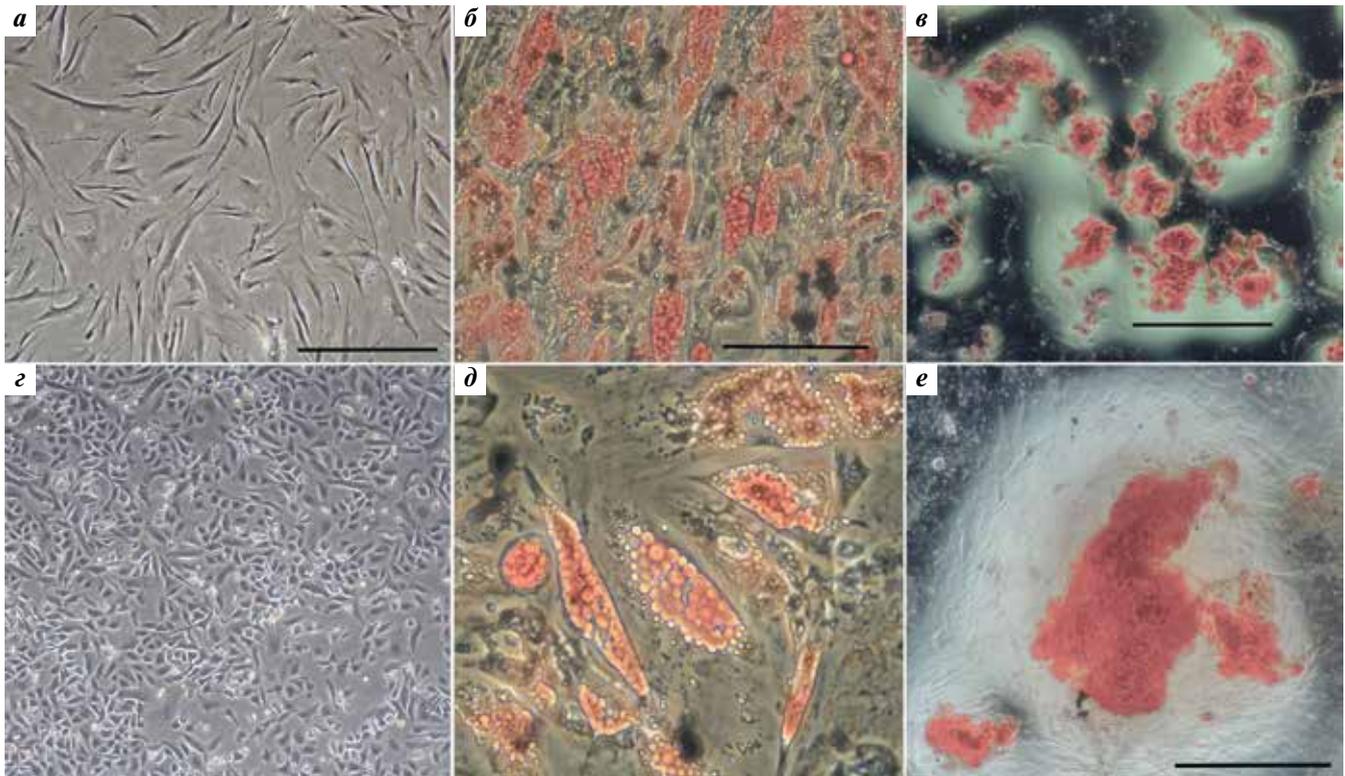


Рис. 4. Дифференцировка вемурафениб-резистентных клеток: а—в — клетки Mel Ki; z—e — клетки Mel F1702; а, z — контрольные клетки (фазово-контрастное изображение); б, д — адипогенная дифференцировка (фазово-контрастное изображение); в, е — остеогенная дифференцировка (темнопольная микроскопия с цифровым контрастированием). Масштаб а, в, z, е — 500 мкм; б, д — 100 мкм

Fig. 4. Differentiation of vemurafenib-resistant cells: а—в — Mel Ki cells; z—e — Mel F1702 cells; а, z — control cells (phase-contrast imaging); б, д — adipogenic differentiation (phase-contrast imaging); в, е — osteogenic differentiation (dark field microscopy with digital contrast). Scale in а, в, z, е — 500 μm ; б, д — 100 μm

становится возможной благодаря приобретению клетками меланомы некоторых характеристик МСК. Недавно было показано, что передача сигналов RAS/RAF/MEK/ERK способствует экспрессии мезенхимальных белков [21].

Следующей мишенью, способной инициировать резистентность клеток Mel Ki к вемурафенибу, была экспрессия РТА. Недавно было показано, что экспрессия РТА коррелирует с короткой безрецидивной выживаемостью больных метастатической меланомой [16]. В обеих контрольных линиях клеток, полученных из опухолей пациентов, не леченных вемурафенибом, наблюдались высокая экспрессия PRAME и некоторых других РТА и практически нулевая экспрессия всех 11 РТА в клетках Mel Ki (см. табл. 2). Результаты недавних наблюдений продемонстрировали, что снижение экспрессии PRAME подавляло дифференцировку соматических/половых клеток в первичных половых клетках, опухолевых клетках яичка и семиномах [22]. Поэтому мы предположили, что чрезвычайно низкий уровень РТА может поддерживать полипотентность клеток меланомы Mel Ki. Тогда единственно разумным объяснением полученных результатов является допущение, что вемурафениб индуцирует дедифференцировку клеток меланомы до стволовой клетки и резистентность к вемурафенибу появляется, по всей видимости как результат обогащения клеток меланомы стволовыми клетками опухоли. Однако анализ экспрессии маркеров стволовой клетки меланомы выявил, что клетки Mel Ki не экспрессируют ни один из этих маркеров (см. табл. 3). Иммунофенотипический анализ поверхностных антигенов клеток Mel Ki неожиданно обнаружил, что более 99% клеток экспрессировали типичные маркеры МСК: CD90, CD44 и CD105 (см. рис. 3). С началом кровоснабжения опухоль секретирует специфические факторы, способствующие миграции МСК из костного мозга в опухоль [23], где они дифференцируются в клетки соединительной и жировой тканей, а также в перicytes, способствуя формированию стромы опухоли. Для того чтобы подтвердить, что МСК-подобная дедифференцировка резистентных к вемурафенибу клеток меланомы — не уникальное свойство одной клеточной линии, нами была получена 2-я клеточная линия — Mel F1702 — из опухоли другой больной также с мутантной меланомой BRAF^{V600E}, устойчивой к вемурафенибу. FACS-анализ подтвердил ту же тенденцию: нет экспрессии маркеров стволовой клетки меланомы, и более 90% клеток меланомы экспрессируют типичные маркеры МСК (см. табл. 3). В этих клетках также не наблюдалась экспрессия РТА (см. табл. 2). Полученные нами результаты предполагают, что резистентность к вемурафенибу сопровождается приобретением клетками меланомы некоторых характеристик МСК. Эти свойства МСК могут иметь первостепенное значение

для поддержания злокачественной прогрессии меланомы. Недавно маркер МСК CD90 был идентифицирован как маркер прогноза течения болезни для первичных меланом, а экспрессия антигена CD44 была выше в меланомах с идентифицированными метастазами, чем у больных, у которых отсутствовали метастазы [24, 25]. Экспрессию эндоглина (CD105) в меланоме, метастазировавшей в мозг, также связывают с плохим прогнозом [26].

Полипотентность клеток Mel Ki и Mel F1702, полученных из меланом, устойчивых к вемурафенибу, была подтверждена их дифференцировкой в адипоцит- и остеобластоподобные клетки. Дифференцировка в адипоцитоподобные клетки клеток рака молочной железы, полученной из опухоли, резистентной к терапии, была показана С. Garulli и соавт. [27]. Позднее L. F. Pavan и соавт. подтвердили этот феномен на глиобластоме [28]. По-видимому, мы стоим у самых истоков ранее не описанного в онкологии процесса — фенотипической трансформации резистентных к терапии опухолевых клеток в мезенхимальноподобные стволовые клетки.

К сожалению, ожидания от применения таргетных препаратов на основе ингибиторов мутантной BRAF-киназы оправдались не в полной мере в связи с обнаружением резистентности [29]. В большинстве случаев эта резистентность связана с реактивацией сигнального пути MAPK [30, 31]. Около 20% устойчивых к ингибиторам BRAF-киназы меланом демонстрируют усиление ERK-независимого механизма устойчивости [32]. Кроме этого, известно, что меланомы имеют сложные мутационные профили и скрытые параллельные изменения во многих генах [33, 34]. Как эти гены модулируют ответ на ингибиторы BRAF, пока неясно. Полученные нами результаты обосновывают еще один механизм резистентности к вемурафенибу — приобретение резистентными к терапии опухолевыми клетками некоторых характеристик МСК. Существование такого количества потенциальных механизмов резистентности потребует специфических для каждого больного подходов к лечению меланомы.

Заключение

Мы показали, что клетки меланомы, полученные из опухолей больных, прогрессирующих на фоне лечения вемурафенибом, экспрессируют ряд поверхностных маркеров, характерных для МСК, и дифференцируются в адипоцит- или остеобластоподобные клетки. Очевидно, что полученные нами данные потребуют внесения поправок в курсы терапии больных меланомой, имеющих мутацию в гене *BRAF*, однако для этого необходимо проведение дополнительных исследований.

Открытым остается вопрос, для чего опухолевой клетке с высокзлокачественным фенотипом свойства стволовой клетки.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Trotter M.J. Melanoma margin assessment. *Clin Lab Med* 2011;31(2): 289–300. DOI: 10.1016/j.cll.2011.03.006.
2. Millet A., Martin A.R., Ronco C. et al. metastatic melanoma: insights into the evolution of the treatments and future challenges. *Med Res Rev* 2017;37(1):98–148. DOI: 10.1002/med.21404.
3. Davies H., Bignell G.R., Cox C. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949–54. DOI: 10.1038/nature00766.
4. Long G.V., Menzies A.M., Nagrial A.M. et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic braf in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2011;29(10):1239–46. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.4327.
5. Flaherty K.T., Puzanov I., Kim K.B. et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363(9):809–19. DOI: 10.1056/NEJMoa1002011.
6. Zhang Y., Weinberg R.A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Front Med* 2018;12(4):361–73. DOI: 10.1007/s11684-018-0656-6.
7. Škovierová H., Okajčeková T., Strnádel J. et al. Molecular regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in tumorigenesis. *Int J Mol Med* 2017;41(3):1187–200. DOI: 10.3892/ijmm.2017.3320.
8. Yan S., Holderness B.M., Li Z. et al. Epithelial-mesenchymal expression phenotype of primary melanoma and matched metastases and relationship with overall survival. *Anticancer Res* 2016;36(12):6449–56. DOI: 10.21873/anticancerres.11243.
9. Ryabaya O.O., Tsyganova I.V., Sidorova T.A. et al. Effect of B-RAFV600 activating gene mutations on the ability of melanoma cells to autophagy. *Soft Tissue Sarcoma and Skin Cancer (Russ)* 2013;3:68–72.
10. Mikhailova I.N., Lukashina M.I., Baryshnikov A.Yu. et al. Melanoma cell lines as the basis for antitumor vaccine preparation. *Vest Ross Akad Med Nauk* 2005;7:37–40.
11. Garbe C., Eigentler T.K. Vemurafenib. *Recent Results Cancer Res* 2018;211:77–89. DOI: 10.1007/978-3-319-91442-8_6.
12. Nakamura M., Tokura Y. Epithelial-mesenchymal transition in the skin. *J Dermatol Sci* 2011;61(1):7–13. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2010.11.015.
13. Li F.Z., Dhillon A.S., Anderson R.L. et al. Phenotype switching in melanoma: implications for progression and therapy. *Front Oncol* 2015;5:31. DOI: 10.3389/fonc.2015.00031.
14. Whitehurst A.W. Cause and consequence of cancer/testis antigen activation in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2014;54:251–72. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140326.
15. Hermes N., Kewitz S., Staeger M.S. Preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) and the PRAME family of leucine-rich repeat proteins. *Curr Cancer Drug Targets* 2016;16(5):400–14. DOI: 10.2174/1568009616666151222151818.
16. Svobodová S., Browning J., MacGregor D. et al. Cancer-testis antigen expression in primary cutaneous melanoma has independent prognostic value comparable to that of Breslow thickness, ulceration and mitotic rate. *Eur J Cancer* 2001;47(3):460–9. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.09.042.
17. Girouard S.D., Murphy G.F. Melanoma stem cells: not rare, but well done. *Lab Invest* 2011;91(5):647–64. DOI: 10.1038/labinvest.2011.50.
18. Weishaupt C., Munoz K.N., Buzney E. et al. T-cell distribution and adhesion receptor expression in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2007;13(9):2549–56. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2450.
19. Lv F.J., Tuan R.S., Cheung K.M. et al. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2014;32(6):1408–19. DOI: 10.1002/stem.1681.
20. Bollag G., Tsai J., Zhang J. et al. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat Rev Drug Dis* 2012;11(11):873–86. DOI: 10.1038/nrd3847.
21. Caramel J., Papadogeorgakis E., Hill L. et al. A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell* 2013;24(4):466–80. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.08.018.
22. Nettersheim D., Arndt I., Sharma R. et al. The cancer/testis-antigen PRAME supports the pluripotency network and represses somatic and germ cell differentiation programs in seminomas. *Br J Cancer* 2016;115(4):454–64. DOI: 10.1038/bjc.2016.187.
23. Reagan M.R., Kaplan D.L. Concise review: Mesenchymal stem cell tumor-homing: detection methods in disease model systems. *Stem Cell* 2011;29(6):920–7. DOI: 10.1002/stem.645.
24. Sviatoha V., Tani E., Kleina R. et al. Immunohistochemical analysis of the S100A1, S100B, CD44 and Bcl-2 antigens and the rate of cell proliferation assessed by Ki-67 antibody in benign and malignant melanocytic tumours. *Melanoma Res* 2010;20(2):118–25. DOI: 10.1097/CMR.0b013e3283350554.
25. Herrera-Molina R., Valdivia A., Kong M. et al. Thy-1-interacting molecules and cellular signaling in cis and trans. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013;306:163–216. DOI: 10.1016/B978-0-12-407695-2.00004-4.
26. Salgado K.B., Toscani N.V., Silva L.L. et al. Immunoexpression of endoglin in brain metastasis secondary to malignant melanoma: evaluation of angiogenesis and comparison with brain metastasis secondary to breast and lung carcinomas. *Clin Exp Metastasis* 2007;24(6):403–10. DOI: 10.1007/s10585-007-9077-7.
27. Garulli C., Kalogris C., Pietrella L. et al. Dorsomorphin reverses the mesenchymal phenotype of breast cancer initiating cells by inhibition of bone morphogenetic protein signaling. *Cell Signal* 2014;26(2):352–62. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.11.022.
28. Pavon L.F., Sibov T.T., de Oliveira R.C. et al. Mesenchymal stem cell-like properties of CD133 glioblastoma initiating cells. *Oncotarget* 2016;7(26):40546–57. DOI: 10.18632/oncotarget.9658.
29. Dhillon S. dabrafenib plus trametinib: a review in advanced melanoma with a BRAF (V600) mutation. *Target Oncol* 2016;11(3):417–28. DOI: 10.1007/s11523-016-0443-8.
30. Nazarian R., Shi H., Wang Q. et al. Melanomas acquire resistance to BRAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 2010;4:973–7.
31. Jiang C.C., Lai F., Thorne R.F. et al. MEK-Independent Survival of BRAFV600E Melanoma Cells Selected for Resistance to Apoptosis Induced by the RAF Inhibitor PLX4720. *Clin Cancer Res* 2010;17(4):721–30.
32. Corcoran R.B., Dias-Santagata D., Bergethon K. et al. BRAF gene amplification can promote acquired resistance to MEK inhibitors in cancer cells harboring the BRAF V600E mutation. *Sci Signal* 2010;3(149):ra84. DOI: 10.1126/scisignal.2001148.
33. Nathanson K.L., Martin A.M., Wubbenhorst B. et al. Tumor genetic analyses of patients with metastatic melanoma treated with the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436). *Clin Cancer Res* 2013;19(17):4868–78. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0827.
34. Wagle N., Emery C., Berger M.F. et al. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol* 2011;29(22):3085–96. DOI: 10.1200/JCO.2010.33.2312.

Вклад авторов

А. А. Вартамян: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи;
О. С. Бурова: получение культуры клеток из опухолевого материала, изучение экспрессии маркеров методом проточной цитометрии;
Х. С. Вишнякова, Е. Е. Егоров: адипогенная и остеогенная *in vitro* дифференцировка;
И. В. Самойленко: получение операционного материала для исследований, верификация диагноза;
В. А. Мисюрин: изучение экспрессии раковотестикулярных антигенов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени;
О. О. Рябая: иммунофлуоресцентная окраска клеток;
М. А. Барышникова: обсуждение результатов, редактирование текста рукописи.

Authors' contributions

A. A. Vartanian: study design, article writing;
O. S. Burova: growth of cell culture from tumor material, flow cytometry study of marker expression;
Kh. S. Vishnyakova, E. E. Egorov: adipogenic and osteogenic *in vitro* differentiation;
I. V. Samoilenko: extraction of surgical material for the study, diagnosis verification;
V. A. Misyurin: real-time polymerase chain reaction study of cancer/testis antigen expression;
O. O. Ryabaya: immunofluorescent cell staining;
M. A. Baryshnikova: results discussion, manuscript editing.

ORCID авторов/ORCID of authors

А. А. Вартамян/A. A. Vartanian: <https://orcid.org/0000-0001-9342-5523>
О. С. Бурова/O. S. Burova: <https://orcid.org/0000-0001-8897-0172>
В. А. Мисюрин/V. A. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0003-1349-2879>
О. О. Рябая/O. O. Ryabaya: <https://orcid.org/0000-0001-6295-3497>
М. А. Барышникова/M. A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-35-00107) и Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (тема № 01201363823).

Financing. The study was supported by the Russian Scientific Foundation (grant No. 14-35-00107) and the Program for Basic Research at State Academies of Sciences in 2013–2020 (topic No. 01201363823).

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 17.11.2019. **Принята к публикации:** 25.11.2019.

Article submitted: 17.11.2019. **Accepted for publication:** 25.11.2019.