

Для цитирования: *Рябая О.О., Прокофьева А.А., Хоченков Д.А., Акасов Р.А., Буров С.В., Марквичева Е.А., Степанова Е.В.* Роль эпителиально-мезенхимального перехода и аутофагии в противоопухолевом ответе клеточных линий меланомы на таргетное ингибирование MEK и mTOR киназ. *Сибирский онкологический журнал.* 2019; 18(3): 54–63. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-3-54-63.

For citation: *Ryabaya O.O., Prokofieva A.A., Khochenkov D.A., Akasov R.A., Burov S.V., Markvicheva E.A., Stepanova E.V.* The role of epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy in antitumoral response of melanoma cell lines to target inhibition of MEK and mTOR kinases. *Siberian Journal of Oncology.* 2019; 18(3): 54–63. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-3-54-63.

РОЛЬ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА И АУТОФАГИИ В ПРОТИВООПУХОЛЕВОМ ОТВЕТЕ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ МЕЛАНОМЫ НА ТАРГЕТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ MEK и mTOR КИНАЗ

О.О. Рябая¹, А.А. Прокофьева¹, Д.А. Хоченков¹, Р.А. Акасов^{2,4,5}, С.В. Буров³, Е.А. Марквичева⁴, Е.В. Степанова¹

Научно-исследовательский институт экспериментальной диагностики и терапии опухолей, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва, Россия¹

Россия, Москва, 115478, Каширское шоссе, 24. E-mail: oxa2601@yandex.ru¹

Институт молекулярной медицины, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, г. Москва, Россия²

Россия, Москва, 119991, ул. Трубецкая, 8/2²

Медико-биологический научно-производственный комплекс «Цитомед», г. Санкт-Петербург, Россия³

Россия, г. Санкт-Петербург, 199004, 4-я линия Васильевского острова, 11³

Отдел биоматериалов и бионанотехнологий, Институт биоорганической химии имени академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, Россия⁴

Россия, г. Москва, 117997, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10⁴

Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН, г. Москва, Россия⁵

Россия, г. Москва, 117997, ул. Бутлерова, 17а⁵

Аннотация

Введение. Возникновение резистентности и дальнейшая опухолевая прогрессия остаются актуальной проблемой в лечении меланомы кожи. Процесс аутофагии и эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) тесно связаны между собой и играют ключевую роль в опухолевой прогрессии. Таргетное ко-ингибирование MEK и mTOR киназ является потенциальной мишенью для терапии меланомы, нацеленной на блокирование ЭМП. **Цель работы** – изучение влияния ко-ингибирования MEK и mTOR киназ на выживаемость, возможность формирования 3D-сфероидов и миграционные способности клеточных линий меланомы, а также взаимосвязь этих изменений с маркерами ЭМП и аутофагии. **Материал и методы.** Работа проведена на клеточных линиях меланомы Mel Z и Mel MTP, полученных от пациентов, проходивших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Оценку антипролиферативной активности биниметиниба и/или рапамицина исследовали МТТ-тестом. 3D-сфероиды получали на основе RGD-пептидов, миграционную способность и инвазивность оценивали в камере Бойдена и базальном матриксе. Изменения экспрессии маркеров аутофагии и ЭМП исследованы иммуноцитохимически или иммуноблоттингом. **Результаты.** Рапамицин усиливал цитотоксичность биниметиниба как в 2D-, так и в 3D-культурах клеточных линий меланомы. При этом биниметиниб и рапамицин снижали инвазию, но не миграцию клеток меланомы *in vitro*. Эффективность комбинации связана со снижением маркеров ЭМП N-кадгерина и β-катенина и аутофагии в клетках меланомы – Беклин 1, p62/SQSTM1 и LC3BII. **Заключение.** Инактивация аутофагии и ЭМП позволяет преодолевать резистентность к существующей терапии и может быть рассмотрена как перспективная мишень для терапии меланомы.

Ключевые слова: меланома, аутофагия, эпителиально-мезенхимальный переход, 3D-сфероиды, экспериментальная терапия, рапамицин.

THE ROLE OF EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION AND AUTOPHAGY IN ANTITUMORAL RESPONSE OF MELANOMA CELL LINES TO TARGET INHIBITION OF MEK AND mTOR KINASES

O.O. Ryabaya¹, A.A. Prokofieva¹, D.A. Khochenkov¹, R.A. Akasov^{2,4,5}, S.V. Burov³, E.A. Markvicheva⁴, E.V. Stepanova¹

Department of Experimental Diagnostic and Tumor Therapy, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia¹

24, Kashirskoe shosse, 115478-Moscow, Russia. E-mail: oxa2601@yandex.ru¹

Institute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia²

82, Trubetskaya Street, 119991-Moscow, Russia²

Cytomed J.S.Co, St. Petersburg, Russia³

11, 4th line of Vasilyevsky Island, 199004-St. Petersburg, Russia³

Department of Biomaterials and Biotechnologies, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic

Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia⁴

16/10, Miklukho-Maklaya Street, GSP-7, 117997-Moscow, Russia⁴

Federal Scientific Research Center «Crystallography and Photonics» Russian Academy of Sciences,

Moscow, Russia⁵

17a, Butlerova Street, 117997-Moscow, Russia⁵

Abstract

Introduction. Cutaneous melanoma is a challenge to treat due to rapid progression of disease and acquired resistance to therapy. Autophagy and the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) are closely interrelated and play a key role in tumor progression. Targeted co-inhibition of MEK and mTOR kinases is a potential target for melanoma therapy by downregulation of the EMT. **Objective:** to study the effect of MEK and mTOR co-inhibition on cell viability, ability to form 3D-spheroids and migratory capacity of melanoma cell lines, and correlation of these changes with EMT- and autophagy-related markers. **Material and Methods.** Melanoma cell lines Mel Z and Mel MTP were derived from patients, who were treated at the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. The antiproliferative effect of binimetinib and/or rapamycin was studied by the MTT-test. 3D spheroids were formed using RGD peptides. Cell migration and invasion were assessed by a Boyden chamber migration assay. The expression levels of autophagy and EMT markers were investigated by immunocytochemistry or immunoblotting. **Results.** Rapamycin increased cytotoxicity of binimetinib in both 2D and 3D melanoma cell line cultures. At the same time, binimetinib and rapamycin reduced invasion, but not migration capacity of melanoma cells *in vitro*. The effectiveness of the combination was associated with a decrease in the EMT markers (N-cadherin and β -catenin) and autophagy markers (Beclin 1, p62/SQSTM1 and LC3BII) in melanoma cells. **Conclusion.** Inactivation of autophagy and EMT leads to overcoming the resistance to current anti-melanoma therapy and can be considered as a promising target for the treatment of melanoma.

Key words: melanoma, autophagy, epithelial-to-mesenchymal transition, 3D spheroids, experimental therapy.

Введение

Несмотря на достигнутые успехи в лечении меланомы, проблема возникновения резистентности и дальнейшей опухолевой прогрессии остается актуальной. Опухолевая прогрессия может быть рассмотрена как многоступенчатый эволюционный процесс, который позволяет опухолевым клеткам на разных этапах преодолевать неблагоприятные условия и физиологические барьеры, сдерживающие рост, за счет приобретения новых функций. Этот процесс адаптации включает в себя изменение клеточных функций и взаимодействие между несколькими клеточными путями. Предполагается, что аутофагия и эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) тесно связаны между собой и

играют ключевую роль в опухолевой прогрессии, являясь основными биологическими процессами в опухоли. Аутофагия – эволюционно сложившийся процесс лизосомальной утилизации белков и органелл для поддержания своего гомеостаза и жизнедеятельности при неблагоприятных условиях окружающей среды или нехватке питательных веществ и энергии в клетках, предотвращая накопление токсинов внутри клетки [1]. В последнее время участие ЭМП и аутофагии и их взаимосвязь в опухолевой прогрессии активно изучаются [2]. ЭМП является ведущим механизмом инвазии и метастазирования опухолей, в результате которого эпителиальные клетки теряют апикально-базальную полярность и межклеточные контакты

с последующей реорганизацией цитоскелета [3]. Ключевым событием в процессе ЭМП является утрата центральной молекулы межклеточных адгезионных контактов – E-кадгерина. При ЭМП также происходит так называемое переключение кадхеринов, «cadherin switch» – снижение экспрессии E-кадгерина и повышение уровня N-кадгерина, характерного для мезенхимальных клеток, виментина, фибронектина, матриксных металлопротеиназ, а также высвобождение β -катенина, его ядерная транслокация, что, собственно, способствует эпителиально-мезенхимальной трансформации [3–5].

Белок RAS представляет собой небольшую ГТФазу, которая регулирует последующую активацию сигнальных путей, включая MAPK и PI3K и, следовательно, вовлечена в прогрессирование меланомы [6, 7]. Изоформа NRAS мутирована примерно у 15–25 % пациентов с меланомой [6]. Наиболее распространенными мутациями являются замены лизина или аргинина на глутамин [8]. Нижестоящий белок BRAF представлен мутантной формой в 50–70 % случаев меланомы. BRAF-активация может индуцировать подвижность клеток меланомы, его активация связана с увеличением экспрессии Twist1 и Zeb1, что приводит к большей инвазии меланомных клеток [5]. Кроме того, мутация BRAF потенцирует путь NF κ B, который, в свою очередь, стимулирует экспрессию MMP, увеличивая миграционную способность, и индуцирует экспрессию SNAIL, известного драйвера метастазирования [9, 10].

Митоген-активированная протеинкиназа (MEK) является нисходящим эффектором BRAF и потенциальной мишенью для терапии меланомы [11]. Однако недавние данные свидетельствуют о том, что ингибирование MEK может фактически увеличить инвазивный потенциал в меланоме [12]. Известно, что PI3K/AKT/mTOR-сигнальный путь играет значительную роль в ЭМП при меланоме. Структурная активация PI3K/AKT приводит к последующей экспрессии мезенхимальных белков, репрессии E-кадгерина и усиленной миграции клеток меланомы [13, 14]. Активация PI3K/AKT-пути регулируется белком PTEN. Стоит отметить, что PTEN часто мутирован при меланоме, и потеря его функций ведет к резистентности к лекарственной терапии и плохому прогнозу [15]. Дальнейшая активация комплекса mTOR-mTORC1 индуцирует ЭМП путем активации p70S6 киназы 1 (S6K1). Таким образом, mTOR-путь является потенциальной мишенью для терапии меланомы, нацеленной на блокирование ЭМП.

Целью исследования явилось изучение влияния ко-ингибирования MEK и mTOR на выживаемость, возможность формирования 3D-сфероидов и миграционные способности клеточных линий меланомы, а также взаимосвязь этих изменений с маркерами ЭМП и аутофагии.

Материал и методы

Клеточные линии

Клетки метастатической меланомы Mel MTP и Mel Z были получены из опухолевого материала пациентов, проходивших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина [16]. Клеточные линии культивировали в RPMI-1640 (Gibco, США) с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС, HyClone, США), 2 mM L-глутамин (Sigma, США), 10 МЕ/мл пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, Россия) при 37 °C в атмосфере с 5 % CO₂. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня.

Оценка цитотоксичности

Клеточные линии (8×10^4 кл/лунка) вносили в 96-луночный планшет. Через 24 ч заменяли среду и добавляли рамнамицин и/или биниметиниб и инкубировали в течение 48 ч при 37 °C и 5 % CO₂. Затем вносили раствор МТТ (3- [4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолийбромид, Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 0,5 мг/мл. Образовавшиеся кристаллы диформаза элюировали с клеточных мембран ДМСО (200 мкл/лунка). Результат оценивался спектрофотометрически при длине волны 570 нм на анализаторе Multiscan FC (Thermo Scientific, США). Выживаемость клеток рассчитывали по формуле: (OD экспериментальной группы – OD контрольной группы) / OD контрольной группы \times 100 %.

Иммуноблоттинг

Клетки (2×10^6) лизировали в буфере, содержащем 50 mM Трис-HCl, 1 mM ЭДТА, 0,5 % дезоксихолата натрия, 0,1 % SDS, 10 мкл/мл ингибирующего коктейля, 1 mM PMSF, 100 мкмоль/л ДТТ (pH 7,5) в течение 40 мин при +4 °C, центрифугировали при 13 400 об/мин 15 мин при +4 °C. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда (Sigma-Aldrich, США) на спектрофлуориметре Multiscan FC (595 нм). Электрофорез образцов, содержащих по 40–60 мкг белка, проводили в 10 % SDS-полиакриламидном геле, белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Bio-Rad, США) методом полусухого электропереноса в системе Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, США) при 1A и 25B в течение 30 мин. Для предотвращения неспецифической сорбции нитроцеллюлозную мембрану обрабатывали 5 % раствором сухого молока («Applichem», Германия) в TBS-T Мембрану инкубировали с первичными антителами LC3B (Novus Biologicals, Великобритания), p62/SQSTM1 (Cell Signaling, США), Беклин 1 (Cell Signaling, США), E-кадгерин (Dako, Дания), N-кадгерин (Dako, Дания), β -катенин (NeoMarkers, Великобритания), Виментин (Dako, Дания) и β -актином (Sigma, США) в течение ночи при +4 °C, отмывали раствором TBS-T при комнатной

температуре, инкубировали 1,5 ч с вторичными антивидовыми антителами, конъюгированными пероксидазой хрена (Amersham, США). Затем добавляли хемиллюминесцентный субстрат Clarity ECL (Bio-Rad, США). Хемиллюминесцентную реакцию регистрировали на ChemiDoc Touch (Bio-Rad, США). Денситометрический анализ проводился с помощью программы ImageJ (NIH, США).

Иммуноцитохимическое исследование

Клетки наращивали на стеклах до 80 % монослоя, далее фиксировали в спирте и ацетоне, инкубировали с первичными антителами к E-кадхерину (Dako, Дания), N-кадхерину (Dako, Дания), β -катенину (NeoMarkers, Великобритания), Виментину (Dako, Дания), матриксным металлопротеиназам 2 (Abcam, Великобритания) и 9 (Santa Cruz, США) при 4 °C в течение 18 ч. Клетки промывали и инкубировали с вторичными антивидовыми антителами, мечеными флуорохромом AlexaFluor®488 (Life Technologies, США), а затем с Хекстом 33258 (ПанЭко, США). Клетки заключали под покровные стекла с использованием полимерной среды Fluorescent mounting medium (Dako, Дания). Интенсивность окрашивания оценивали на клеточном анализаторе InCell Analyzer 6000 с использованием программного обеспечения InCell Investigator.

Формирование сфероидов с использованием RGD-пептида

Формирование сфероидов проводили, как описано ранее [17]. Стоковый раствор cyclo-RGDfK(TPP) пептида (400 мкМ) готовили растворением лиофилизированного порошка в питательной среде RPMI-1640 без сыворотки и последующей стерилизацией через одноразовый фильтр (Millipore, 0,22 мкм), стоковый раствор хранили в морозильной камере при -20 °C не более трех месяцев. Клетки рассеивали на 96-луночные планшеты в концентрации 2×10^4 клеток на лунку в 100 мкл питательной среды RPMI-1640 + 10 % ТЭС и помещали в CO₂-инкубатор. Через 2–4 ч из лунок удаляли старую питательную среду и вносили 100 мкл полной среды, содержащей 10–100 мкМ пептида, и вновь помещали в CO₂-инкубатор. За изменениями в характере роста и морфологии клеток наблюдали с помощью оптического микроскопа.

Оценка инвазии сфероидов в Матригель

Сфероиды клеточной линии Mel Z, полученные на основе RGD-пептидов, собирали в 15 мл пробирку и откручивали в течение 10 мин при 1500 об/мин. Далее отбирали супернатант, к осадку клеток добавляли 1 мл Матригеля (BD Bioscience, Бельгия), аккуратно ресуспендировали и добавляли по 50 мкл в охлажденный 96-лучный планшет. Планшет инкубировали при 37 °C 10 мин для полимеризации Матригеля, а затем добавляли 100 мкл полной питательной среды, содержащей

рапамицин (250 нМ) и/или биниметиниб (2,5 мМ) или оставляли интактными. Инвазия клеток в Матригель оценивалась через 2–3 дня с помощью светового микроскопа.

Оценка миграционной способности клеток в камере Бойдена

Клетки меланомы ($2,5 \times 10^5$ /мл) прединкубировали с рапамицином (250 нМ) и/или биниметинибом (2 мМ) в течение 4 ч, затем переносили в камеру Бойдена в 300 мкл бессывороточной среды, содержащей химиопрепараты, помещали в 24-луночный планшет, содержащий 750 мкл среды с 10 % ТЭС для создания условий для миграции клеток через поры камеры Бойдена, и оставляли на 24 ч при 37 °C в атмосфере с 5 % CO₂. Затем мембрану фиксировали 3 % формальдегидом в течение 5 мин с последующей фиксацией в метаноле, после чего клетки окрашивали 0,5 % раствором кристаллического фиолетового в течение 30 мин. Количество мигрировавших клеток с нижней стороны мембраны камеры Бойдена считали в 5 различных полях ($\times 40$) под световым микроскопом Nikon 80i.

Статистический анализ

Все эксперименты были выполнены в трех повторях. Статистический анализ и графический интерфейс представлены с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v.5.0. (GraphPad, США). Для достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента. Значение $p \leq 0,05$ считалось статистически достоверным.

Результаты

Изучение экспрессии маркеров ЭМП на клеточных линиях меланомы Mel Z и Mel MTP

Изначально мы изучили базальную экспрессию E-кадхерина, N-кадхерина, β -катенина, виментина, MMP2 и MMP9 на 2 клеточных линиях метастатической меланомы Mel Z, несущей мутацию в гене *BRAF*, и линии с мутантным *NRAS* – Mel MTP. Установлено, что обе клеточные линии отличаются более высоким базальным уровнем маркеров мезенхимальности: виментина, N-кадхерина и MMP2 по сравнению с эпителиальным маркером E-кадхерином. Уровень экспрессии β -катенина и MMP9 был заметно ниже (рис. 1).

Ранее нами был изучен уровень базальной аутофагии по уровню экспрессии Беклин 1 в исследованных клеточных линиях [18]. Было показано, что клеточная линия Mel Z имела низкий уровень базальной аутофагии, а Mel MTP – высокий. Таким образом, на уровне базальной экспрессии корреляции между уровнем аутофагии и ЭМП не отмечено.

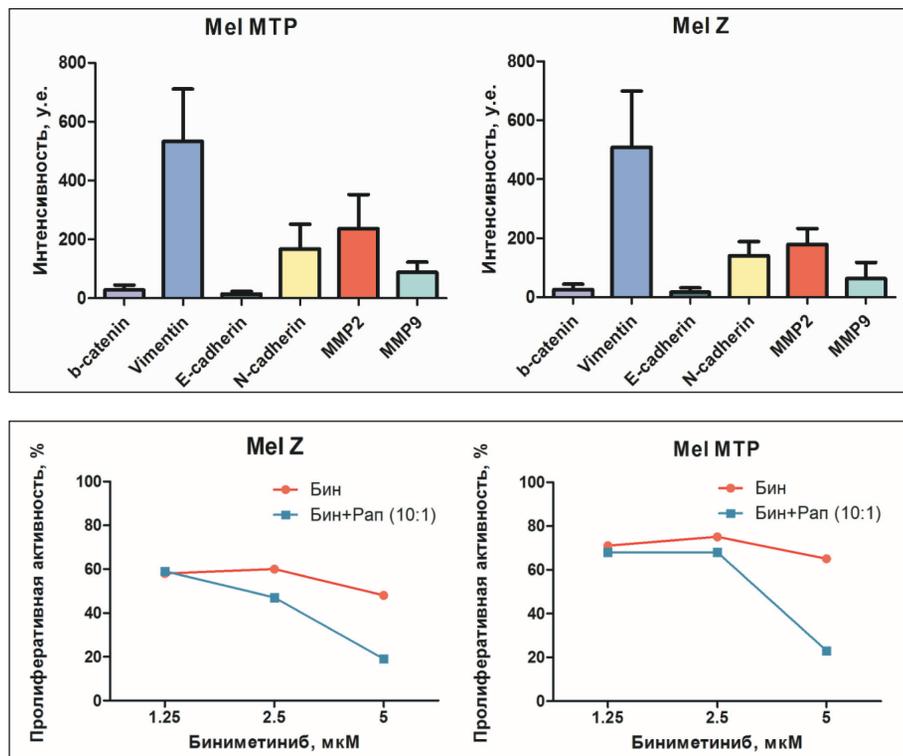


Рис. 1. Иммуноцитохимическое исследование экспрессии маркеров ЭМП на клеточных линиях меланомы Mel MTP и Mel Z

Рис. 2. Изменение цитотоксичности биниметиниба в присутствии или отсутствии рапамицина на клеточных линиях меланомы Mel Z и Mel MTP определено методом МТТ после 48-часовой инкубации с препаратами (p<0,05)

Цитотоксичность комбинации биниметиниба и рапамицина

Далее мы изучили действие биниметиниба и/или рапамицина на выживаемость клеточных линий меланомы. Величина IC₅₀ биниметиниба составила 3,8 ± 0,2 μM для линии Mel Z и 10,2 ± 0,4 μM – для Mel MTP (p<0,05), величина IC₅₀ рапамицина составила 300 ± 15 нМ для обеих клеточных линий (p<0,05). Для изучения действия комбинации препаратов на выживаемость клеток меланомы биниметиниб и рапамицин брали в соотношении 10:1. Все комбинации демонстрировали усиленный антипролиферативный эффект по сравнению с монорежимами рапамицина и биниметиниба, однако синергизм действия 2 препаратов, определяемый по комбинационному индексу (КИ) методом Chou-Talalay [19], отмечался только при концентрациях 5 μM биниметиниба и 0,5 μM рапамицина и 2,5 μM биниметиниба и

0,25 μM рапамицина (таблица, рис. 2). При более низких концентрациях отмечалась незначительная аддитивность взаимодействия препаратов (данные не представлены). Для дальнейших исследований брали биниметиниб и рапамицин в концентрациях 2,5 μM и 250 нМ, которые приводили к 10–15 % ингибированию роста по сравнению с биниметинибом в монорежиме.

Цитотоксичность комбинации биниметиниба и рапамицина в 3D-сфероидах

Опираясь на данные о цитотоксичности препаратов в монослойной культуре (2D-культуре), мы исследовали эффективность комбинации в 3D-сфероидах, которые представляют собой более близкую к *in vivo* клеточную модель. Клетки Mel Z формировали плотные сфероиды с диаметром в среднем 100 μm, клетки Mel MTP имели

Таблица

Антипролиферативная активность (% от контроля) биниметиниба, рапамицина или их комбинации в соотношении 10:1, КИ – комбинационный индекс, посчитанный по методу Chou-Talalay (КИ<1 – антагонизм, >1 – антагонизм, =1 – аддитивность)

		Mel Z				Mel MTP					
Биниметиниб		Рапамицин		Биниметиниб + рапамицин		Биниметиниб		Рапамицин		Биниметиниб + рапамицин	
Концентрация, мкМ	Выживаемость	Концентрация, нМ	Выживаемость	Выживаемость	КИ	Концентрация, мкМ	Выживаемость	Концентрация, нМ	Выживаемость	Выживаемость	КИ
5	48 %	500	16 %	19 %	0,95	5	67 %	500	28 %	23 %	0,99
2,5	60 %	250	80 %	47 %	0,45	2,5	75 %	250	77 %	68 %	0,8
1,25	58 %	125	95 %	59 %	0,97	1,25	71 %	125	98 %	68 %	1,25

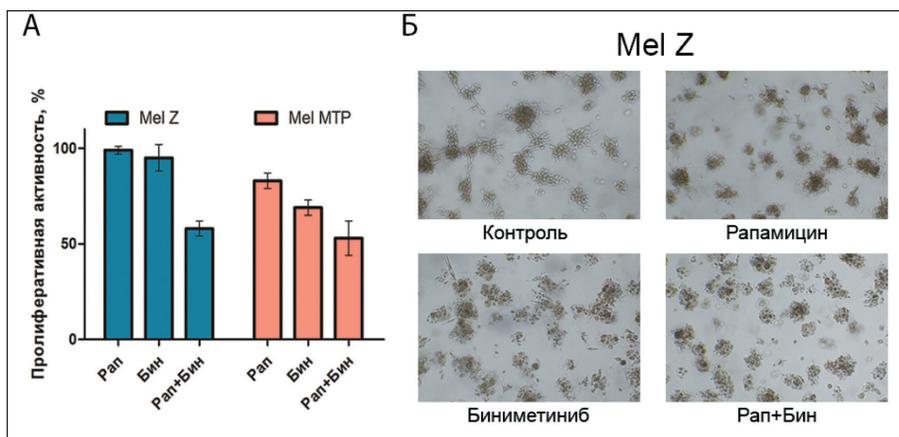


Рис. 3. Влияние комбинации биниметиниба и/или рапамицина на 3D-клеточные линии меланомы: А – антипролиферативная активность биниметиниба, рапамицина или их комбинации в 3D-сфероиде клеточных линий Mel MTP и Mel Z методом МТТ после 48 ч инкубации с препаратами; Б – изучение инвазивности 3D-сфероидов клеток Mel Z, имплантированных в Матригель, через 48 ч после воздействия биниметиниба и/или рапамицина

гроздевидную форму. Минимальное количество *сусло-RGDfK(PPP)* пептида для формирования сфероидов составило 100 μ M для Mel Z и 50 μ M для Mel MTP. Неожиданным оказался тот факт, что биниметиниб в монорегиме был нетоксичным для клеток линии Mel Z по сравнению с монослойной культурой (95 % выживаемость в 3D-сфероиде против 60 % в 2D-культуре), при этом в Mel MTP токсичность биниметиниба была сопоставима с 2D-культурой (75 и 69 % соответственно). При комбинации с рапамицином в клеточной линии Mel Z сохранялся усиленный антипролиферативный эффект по сравнению с биниметинибом, а в линии Mel MTP отмечалось усиление токсичности на 20 % (рис. 3А).

Биниметиниб и рапамицин снижают инвазию, но не миграцию клеток меланомы *in vitro*

Мы изучили способность биниметиниба и/или рапамицина к уменьшению инвазии клеток на 3D-сфероиде, имплантированных в Матригель, для чего клетки линии Mel Z были преинкубированы с биниметинибом (2,5 μ M) и/или рапамицином (250 нM) в течение 48 ч. Рапамицин и биниметиниб в монорегиме снижали инвазию Mel Z в Матригель. Более того, комбинированное действие препаратов приводило к более значительному ингибированию инвазии по сравнению с биниметинибом и рапамицином отдельно (рис. 3Б).

Влияние комбинации биниметиниба и рапамицина на миграционную способность клеток меланомы было изучено по способности клеток проходить 8 μ M мембрану камеры Бойдена. Клетки преинкубировали с препаратами в течение 4 ч, после чего их вносили в камеру Бойдена в бесывороточной среде с 2,5 μ M биниметинибом и/или 250 нM рапамицином. Через 24 ч получали изображения мигрировавших через камеру Бойдена клеток и подсчитывали количество промигрировавших клеток в присутствии препаратов под световым микроскопом в 5 полях (рис. 4). Снижение миграционной активности под действием препаратов относительно контроля было более значительным в клетках линии Mel Z по сравнению с Mel MTP. Однако не выявлено различий в миграционной способности под действием биниметиниба, рапамицина и их комбинации ни в одной из двух клеточных линий. Более того, ко-инкубация с биниметинибом и рапамицином в клеточной линии Mel Z приводила к усиленной миграции клеток, что может быть объяснено более агрессивным фенотипом этих клеток и как следствие повышенной подвижностью.

Изучение экспрессии маркеров ЭМП и аутофагии под действием комбинации рапамицина и биниметиниба

Для оценки степени участия маркеров ЭМП и аутофагии в снижении опухолевой пролиферации

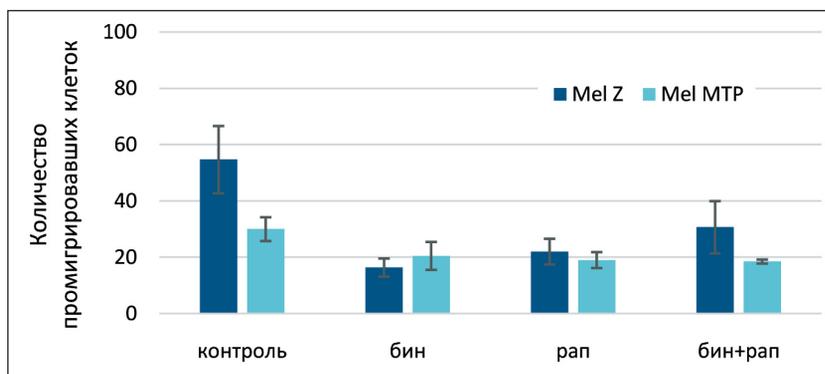


Рис. 4. Миграционная способность клеточных линий Mel MTP и Mel Z в камере Бойдена после 24-часовой инкубации с биниметинибом (2,5 μ M) и/или рапамицином (250 нM). Количество мигрировавших клеток в камере Бойдена подсчитывали в 5 различных полях (\times 40) под световым микроскопом

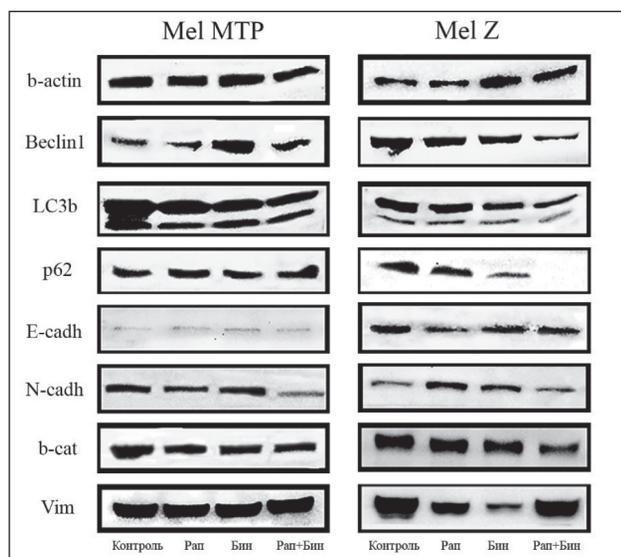


Рис. 5. Иммуноблоттинг экспрессии Беклина 1, LC3В, p62, E-кадгерина, N-кадгерина, β -катенина и виментина после воздействия биниметиниба и/или рапамицина на клеточных линиях меланомы Mel MTP и Mel Z

под действием рапамицина и/или биниметиниба мы исследовали экспрессию E-кадгерина, N-кадгерина, β -катенина, виментина, LC3В/II, p62/SQSTM1 и Беклин 1. Активность каждого рецептора определяли методом вестерн-блоттинга с использованием соответствующих антител. Как показано на рис. 5, в клетках Mel Z комбинация препаратов снижала экспрессию маркеров аутофагии Беклин 1, p62/SQSTM1, LC3В/II и маркеров мезенхимальности N-кадгерина и β -катенина, препараты в монорежиме не влияли на степень активации белков. При этом уровень виментина оставался неизменным. Схожая картина наблюдалась и в другой линии меланомы Mel MTP, где комбинация препаратов также подавляла активацию N-кадгерина, β -катенина и LC3В/II. Однако не происходило сколько-нибудь значимой блокировки p62/SQSTM1 и виментина по сравнению с контролем. При исследовании обеих клеточных линий не отмечено значимых различий в экспрессии E-кадгерина.

Обсуждение

Основной причиной, ограничивающей эффективность таргетной терапии при меланоме, являются возникающая резистентность и дальнейшая опухолевая прогрессия. Чаще всего резистентность приобретает за счет реактивации MAPK-сигнального пути или активации альтернативных каскадов, включая PI3K/AKT/mTOR [20]. Оба сигнальных пути PI3K/AKT/mTOR и MAPK могут регулироваться посредством рецепторных тирозинкиназ [21].

В данном исследовании мы показали, что комбинация MEK-ингибитора биниметиниба и mTOR-ингибитора рапамицина имеет большую

терапевтическую эффективность по сравнению с препаратами в монорежиме в экспериментах *in vitro*. Биниметиниб и рапамицин синергично снижали пролиферативную активность как BRAF-мутированной меланомы Mel Z, так и NRAS-мутированной Mel MTP. Более того, данный эффект сохранялся и при изучении эффективности данной комбинации в 3D-сфероидах, которые представляют собой более близкую к *in vivo* экспериментальную модель. Недавние данные показали, что инактивация PI3K/AKT/mTOR-сигнального пути уменьшает прогрессию меланомы. Предварительные исследования показывают, что ингибитор PI3K, LY-294.002 может уменьшить инвазию и миграцию меланомы за счет снижения фосфорилирования AKT и увеличения экспрессии MITF [22]. Схожие данные были получены и при других типах опухолей [23].

Нами показано, что частично эффективность комбинации связана со снижением маркеров ЭМП N-кадгерина и β -катенина и снижением аутофагии в клетках меланомы – Беклин 1, p62/SQSTM1 и LC3В/II.

Недавно была исследована прогностическая значимость маркеров аутофагии и ЭМП LC3В, E-cadherin и Vimentin в предсказании общей выживаемости у пациентов с карциномой желудка, гастроинтестинальными опухолями и раком почки [24].

Известно, что PI3K/AKT/mTOR играет значительную роль в меланоме ЭМП. Структурная активация PI3K/AKT приводит к последующей экспрессии мезенхимальных белков, репрессии E-кадгерина и усиленной миграции клеток меланомы [13, 14]. mTOR является нисходящим эффектором пути PI3K/AKT. mTOR функционирует как каталитическая единица двух важных белковых комплексов mTORC1 и mTORC2 [25]. Активация mTORC1 индуцирует ЭМП путем активации p70S6 киназы 1. Это изменение стимулирует реорганизацию F-актина, фокальную адгезию и экспрессию MMP. Через фосфорилирование AKT, сигнализация TGF β стимулирует mTORC2, чтобы индуцировать цитоскелетную реорганизацию и миграцию.

Хотя ряд ученых показали, что ингибирование MEK при меланоме может увеличивать инвазию и индуцировать клеточную подвижность, особенно в клеточных линиях, мутантных по BRAF и KRAS [12, 26–28], в нашем исследовании комбинация биниметиниба и рапамицина снижала инвазию клеток, но не миграцию. Стоит отметить, что не все MEK-ингибиторы индуцируют повышенную инвазию клеток. Так, MEK-ингибитор траметиниб уменьшал фосфорилирование ERK1/2, но увеличивал активацию AKT и нисходящих эффекторов в NRAS-мутированных клетках SK-MEL-2 посредством EGF-сигналинга [29]. Другой MEK-ингибитор селуметиниб индуцировал инвазию в

клеточной линии A375 по сравнению с контролем за счет усиления экспрессии MMP-2 и MMP-9 и промезенхимальных транскрипционных факторов, таких как Zeb1, Twist, Snail [12, 30]. С другой стороны, U0126 – потенциальный ингибитор MEK – ингибировал инвазию клеток A375 в клеточных моделях в матрикеле за счет снижения экспрессии урокиназы плазминогена и MMP-9 [31].

Недавние исследования показывают, что аутофагия и ЭМП находятся в сложной взаимосвязи в опухолях [2]. Оба процесса регулируются общими молекулярными медиаторами и сигнальными путями, включая TGF, STAT3 и PI3K/AKT/mTOR сигнальный каскад. С одной стороны, aberrантная активация ЭМП требует повышенного уровня аутофагии для поддержания жизнеспособности опухолевых клеток при метастатическом распространении. С другой стороны, аутофагия на ранних стадиях может подавлять рост опухоли, дестабилизируя важнейшие медиаторы ЭМП [2]. Qiang and He показали, что функциональное снижение аутофагии активировало ЭМП посредством

SQSTM1-опосредованной стабилизации TWIST1 [32]. В другом исследовании было показано, что нокдаун белка Беклин 1 ингибировал рапамицин-опосредованную активацию аутофагии, что приводило к подавлению ЭМП и снижению инвазивности клеток рака толстой кишки [33].

В целом Беклин 1-зависимая аутофагия играет важную роль в регуляции ЭМП и ассоциирована с ростом, метастазированием, лекарственной устойчивостью и плохим прогнозом онкозаболеваний, таких как холангиокарцинома, аденокарцинома поджелудочной железы, карцинома пищевода, рак молочной железы, рак желудка и др. [34–37].

Заключение

Таким образом, инактивация аутофагии и ЭМП за счет таргетного ко-ингибирования MEK и mTOR киназ позволяет преодолевать резистентность к существующей терапии и может быть рассмотрена как перспективная мишень для терапии меланомы.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Yang X., Yu D.D., Yan F., Jing Y.Y., Han Z.P., Sun K., Liang L., Hou J., Wei L.X. The role of autophagy induced by tumor microenvironment in different cells and stages of cancer. *Cell Biosci.* 2015 Mar 28; 5: 14. doi: 10.1186/s13578-015-0005-2.
2. Gugnani M., Sancisi V., Manzotti G., Gandolfi G., Ciarrocchi A. Autophagy and epithelial-mesenchymal transition: an intricate interplay in cancer. *Cell Death Dis.* 2016 Dec 8; 7(12): e2520. doi: 10.1038/cddis.2016.415.
3. Kalluri R., Weinberg R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009 Jun; 119(6): 1420–8. doi: 10.1172/JCI39104.
4. Alonso S.R., Tracey L., Ortiz P., Pérez-Gómez B., Palacios J., Polán M., Linares J., Serrano S., Sáez-Castillo A.I., Sánchez L., Pajares R., Sánchez-Aguilera A., Artiga M.J., Piris M.A., Rodríguez-Peralta J.L. A High-Throughput Study in Melanoma Identifies Epithelial-Mesenchymal Transition as a Major Determinant of Metastasis. *Cancer Res.* 2007 Apr 1; 67(7): 3450–60. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3481.
5. Caramel J., Papadogeorgakis E., Hill L., Browne G.J., Richard G., Wierinckx A., Saldanha G., Osborne J., Hutchinson P., Tse G., Lachuer J., Puisieux A., Pringle J.H., Ansieau S., Tulchinsky E. A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell.* 2013 Oct 14; 24(4): 466–80. doi: 10.1016/j.ccr.2013.08.018.
6. Sullivan R.J., Fisher D.E. Understanding the Biology of Melanoma and Therapeutic Implications. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2014 Jun; 28(3): 437–53. doi: 10.1016/j.hoc.2014.02.007.
7. van't Veer L.J., Burgering B.M., Versteeg R., Boot A.J., Ruiter D.J., Osanto S., Schrier P.I., Bos J.L. N-ras mutations in human cutaneous melanoma from sun-exposed body sites. *Mol Cell Biol.* 1989 Jul; 9(7): 3114–6.
8. Platz A., Eghazi S., Ringborg U., Hansson J. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol.* 2008 Apr; 1(4): 395–405. doi: 10.1016/j.molonc.2007.12.003.
9. Lin K., Baritaki S., Militello L., Malaponte G., Bevelacqua Y., Bonavida B. The Role of B-RAF Mutations in Melanoma and the Induction of EMT via Dysregulation of the NF-κB/Snail/RKIP/PTEN Circuit. *Genes Cancer.* 2010 May; 1(5): 409–420. doi: 10.1177/1947601910373795.
10. Whipple C.A., Brinckerhoff C.E. BRAF(V600E) melanoma cells secrete factors that activate stromal fibroblasts and enhance tumorigenicity. *Br J Cancer.* 2014 Oct 14; 111(8): 1625–33. doi: 10.1038/bjc.2014.452.
11. Salama A.K., Kim K.B. Trametinib (GSK1120212) in the treatment of melanoma. *Expert Opin Pharmacother.* 2013 Apr; 14(5): 619–27. doi: 10.1517/14656566.2013.770475.
12. Ferguson J., Arozarena I., Ehrhardt M., Wellbrock C. Combination of MEK and SRC inhibition suppresses melanoma cell growth and invasion. *Oncogene.* 2013 Jan 3; 32(1): 86–96. doi: 10.1038/onc.2012.25.
13. Fenouille N., Tichet M., Dufes M., Pottier A., Mogha A., Soo J.K., Rocchi S., Mallavialle A., Galibert M.-D., Khammari A., Lacour J.-P., Ballotti R., Deckert M., Tartare-Deckert S. The Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Regulatory Factor SLUG (SNAI2) Is a Downstream Target of SPARC and AKT in Promoting Melanoma Cell Invasion. *PLoS One.* 2012; 7(7): e40378. doi: 10.1371/journal.pone.0040378.
14. Thiery J.P., Sleeman J.P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Feb; 7(2): 131–42. doi: 10.1038/nrm1835.
15. Nathanson K.L., Martin A.M., Wubbenhorst B., Greshock J., Letrero R., D'Andrea K., O'Day S., Infante J.R., Falchook G.S., Arkenau H.T., Millward M., Brown M.P., Pavlick A., Davies M.A., Ma B., Gagnon R., Curtis M., Lebowitz P.F., Kefford R., Long G.V. Tumor genetic analyses of patients with metastatic melanoma treated with the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436). *Clin Cancer Res.* 2013 Sep 1; 19(17): 4868–78. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0827.
16. Mikhaylova I.N., Kovalevsky D.A., Morozova L.F., Golubeva V.A., Cheremushkin E.A., Lukashina M.I., Voronina E.S., Burova O.S., Utyashev I.A., Kiselev S.L., Demidov L. V., Beabealashvili R.S., Baryshnikov A.Y. Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 2008 Oct; 18(5): 303–13. doi: 10.1097/CMR.0b013e32830e391d.
17. Akasov R., Zaytseva-Zotova D., Burov S., Leko M., Dontenwill M., Chipper M., Vandamme T., Markvicheva E. Formation of multicellular tumor spheroids induced by cyclic RGD-peptides and use for anticancer drug testing in vitro. *Int J Pharm.* 2016 Jun 15; 506(1–2): 148–57. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.04.005.
18. Ryabaya O., Prokofieva A., Khochenkov D., Abramov I., Zasedatelev A., Stepanova E. Inhibition of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy sensitizes melanoma cells to temozolomide treatment. *Oncol Rep.* 2018 Jul; 40(1): 385–394. doi: 10.3892/or.2018.6430.
19. Chou T.C., Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 1984; 22: 27–55.
20. Calero R., Morchon E., Martinez-Argudo I., Serrano R. Synergistic anti-tumor effect of 17AAG with the PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 on human melanoma. *Cancer Lett.* 2017 Oct 10; 406: 1–11. doi: 10.1016/j.canlet.2017.07.021.
21. Carlino M.S., Todd J.R., Gowrishankar K., Mijatov B., Pupo G.M., Fung C., Snoyman S., Hersey P., Long G. V., Kefford R.F., Rizos H. Differential activity of MEK and ERK inhibitors in BRAF inhibitor resistant melanoma. *Mol Oncol.* 2014 May; 8(3): 544–54. doi: 10.1016/j.molonc.2014.01.003.
22. Schlegel N.C., von Planta A., Widmer D.S., Dummer R., Christofori G. PI3K signalling is required for a TGFβ-induced epithelial-mesenchymal-like transition (EMT-like) in human melanoma cells. *Exp Dermatol.* 2015 Jan; 24(1): 22–8. doi: 10.1111/exd.12580.
23. Haagensen E.J., Kyle S., Beale G.S., Maxwell R.J., Newell D.R. The synergistic interaction of MEK and PI3K inhibitors is modulated by mTOR inhibition. *Br J Cancer.* 2012 Apr 10; 106(8): 1386–94. doi: 10.1038/bjc.2012.70.
24. Wang X., Chen K., Yu Y., Xiang Y., Kim J.H., Gong W., Huang J., Shi G., Li Q., Zhou M., Sayers T., Tewary P., Gao B., Wang J.M. Metformin

sensitizes lung cancer cells to treatment by the tyrosine kinase inhibitor erlotinib. *Oncotarget*. 2017 Nov 21; 8(65): 109068–109078. doi: 10.18632/oncotarget.22596.

25. *Betz C., Hall M.N.* Where is mTOR and what is it doing there? *J Cell Biol*. 2013 Nov 25; 203(4): 563–74. doi: 10.1083/jcb.201306041.

26. *Vultur A., Villanueva J., Krepler C., Rajan G., Chen Q., Xiao M., Li L., Gimotty P.A., Wilson M., Hayden J., Keeney F., Nathanson K.L., Herlyn M.* MEK inhibition affects STAT3 signaling and invasion in human melanoma cell lines. *Oncogene*. 2014 Apr 3; 33(14): 1850–61. doi: 10.1038/onc.2013.131.

27. *Solit D.B., Garraway L.A., Pratilas C.A., Sawai A., Getz G., Basso A., Ye Q., Lobo J.M., She Y., Osman I., Golub T.R., Sebolt-Leopold J., Sellers W.R., Rosen N.* BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature*. 2006 Jan 19; 439(7074): 358–62. doi: 10.1038/nature04304.

28. *Gilmartin A.G., Bleam M.R., Groy A., Moss K.G., Minthorn E.A., Kulkarni S.G., Rominger C.M., Erskine S., Fisher K.E., Yang J., Zappacosta F., Annan R., Sutton D., Laquerre S.G.* Is an Inhibitor of MEK Activity and Activation with Favorable Pharmacokinetic Properties for Sustained In Vivo Pathway Inhibition. *Clin Cancer Res*. 2011 Mar 1; 17(5): 989–1000. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2200.

29. *Vu H.L., Rosenbaum S., Capparelli C., Purwin T.J., Davies M.A., Berger A.C., Aplin A.E.* MIG6 Is MEK Regulated and Affects EGF-Induced Migration in Mutant NRAS Melanoma. *J Invest Dermatol*. 2016 Feb; 136(2): 453–463. doi: 10.1016/j.jid.2015.11.012.

30. *Leight J.L., Tokuda E.Y., Jones C.E., Lin A.J., Anseth K.S.* Multifunctional bioscaffolds for 3D culture of melanoma cells reveal increased MMP activity and migration with BRAF kinase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Apr 28; 112(17): 5366–71. doi: 10.1073/pnas.1505662112.

31. *Ge X., Fu Y.M., Meadows G.G.* U0126, a mitogen-activated protein kinase inhibitor, inhibits the invasion of human A375 melanoma cells. *Cancer Lett*. 2002; 179(2): 133–140.

32. *Qiang L., He Y.-Y.* Autophagy deficiency stabilizes TWIST1 to promote epithelial-mesenchymal transition. *Autophagy*. 2014 Oct 1; 10(10): 1864–5. doi: 10.4161/auto.32171.

33. *Shen H., Yin L., Deng G., Guo C., Han Y., Li Y., Cai C., Fu Y., Liu S., Zeng S.* Knockdown of Beclin-1 impairs epithelial-mesenchymal transition of colon cancer cells. *J Cell Biochem*. 2018 Aug; 119(8): 7022–7031. doi: 10.1002/jcb.26912.

34. *Nitta T., Sato Y., Ren X.S., Harada K., Sasaki M., Hirano S., Nakanuma Y.* Autophagy may promote carcinoma cell invasion and correlate with poor prognosis in cholangiocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014 Jul 15; 7(8): 4913–21.

35. *Chen Y., Lu Y., Lu C., Zhang L.* Beclin-1 expression is a predictor of clinical outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma and correlated to hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α expression. *Pathol Oncol Res*. 2009 Sep; 15(3): 487–93. doi: 10.1007/s12253-008-9143-8.

36. *Ko Y.H., Cho Y.-S., Won H.S., Jeon E.K., An H.J., Hong S.U., Park J.H., Lee M.A.* Prognostic significance of autophagy-related protein expression in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas*. 2013 Jul; 42(5): 829–35. doi: 10.1097/MPA.0b013e318279d0dc.

37. *Masuda G.O., Yashiro M., Kitayama K., Miki Y., Kasashima H., Kinoshita H., Morisaki T., Fukuoka T., Hasegawa T., Sakurai K., Toyokawa T., Kubo N., Tanaka H., Muguruma K., Masaichi O., Hirakawa K.* Clinicopathological Correlations of Autophagy-related Proteins LC3, Beclin 1 and p62 in Gastric Cancer. *Anticancer Res*. 2016; 36(1): 129–136.

Поступила/Received 12.11.18
Принята в печать/Accepted 06.12.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Рябая Оксана Олеговна, научный сотрудник, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России (г. Москва, Россия). E-mail: oxa2601@yandex.ru. SPIN-код: 4865-5850. Author ID (Scopus): 56974346800. Researcher ID (WOS): G-1529-2017. ORCID: 0000-0001-6295-3497.

Прокофьева Анастасия Алексеевна, лаборант-исследователь, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России (г. Москва, Россия). Author ID (Scopus): 57202330994.

Хоченков Дмитрий Александрович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия). E-mail: khochenkov@gmail.com. SPIN-код: 9588-1183. Author ID (Scopus): 25930436100. Researcher ID (WOS): J-6861-2015. ORCID: 0000-0002-5694-3492.

Акасов Роман Александрович, кандидат химических наук, научный сотрудник, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва, Россия). SPIN-код: 8383-0004. Author ID (Scopus): 56285575900. Researcher ID (WOS): K-2275-2016. ORCID: 0000-0001-6486-8114.

Буров Сергей Владимирович, доктор химических наук, Медико-биологический научно-производственный комплекс «Цитомед» (г. Санкт-Петербург, Россия). SPIN-код: 6046-3461. Author ID (Scopus): 7003948349. Researcher ID (WOS): P-7225-2015.

Марквичева Елена Арнольдовна, доктор химических наук, Институт биоорганической химии имени академиком М.М. Шемьякина и Ю.А. Овчинникова РАН (г. Москва, Россия). Author ID (Scopus): 6603356683.

Степанова Евгения Владиславовна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России (г. Москва, Россия). SPIN-код: 3008-2690. Author ID (Scopus): 57189217833. Researcher ID (WOS): B-3206-2014. ORCID: 0000-0002-7546-1288.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №14-35-00107).

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Oksana O. Ryabaya, Researcher, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology (Moscow, Russia). E-mail: oxa2601@yandex.ru. Author ID (Scopus): 56974346800. Researcher ID (WOS): G-1529-2017. ORCID: 0000-0001-6295-3497.

Anastasia A. Prokofieva, Research assistant, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology (Moscow, Russia). Author ID (Scopus): 57202330994.

Dmitry A. Khochenkov, PhD, Head of the Laboratory, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology (Moscow, Russia). Author ID (Scopus): 57202330994. Researcher ID (WOS): J-6861-2015. ORCID: 0000-0002-5694-3492.

Roman A. Akasov, PhD, Institute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia). Author ID (Scopus): 56285575900. Researcher ID (WOS): K-2275-2016. ORCID: 0000-0001-6486-8114.

Sergey V. Burov, DSc, Cytomed J.S.Co (St. Petersburg, Russia). Author ID (Scopus): 7003948349. Researcher ID (WOS): P-7225-2015.

Elena A. Markvicheva, DSc, Institute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia). Author ID (Scopus): 6603356683.

Evgenia V. Stepanova, MD, DSc, Leading Researcher, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology (Moscow, Russia). Author ID (Scopus): 57189217833. Researcher ID (WOS): B-3206-2014. ORCID: 0000-0002-7546-1288.

Funding

The study was supported by the Russian Science Foundation (grant № 14-35-00 107).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.