

Для цитирования: Жидкова Е.М., Григорьева Д.Д., Лылова Е.С., Максимова В.П., Сагитова Г.Р., Хайриева Г.И., Трапезникова Е.С., Кирсанов К.И., Якубовская М.Г., Лесовая Е.А. Скрининг эффективности и антипролиферативного действия потенциальных ингибиторов DDIT4 на моделях рака молочной железы. Сибирский онкологический журнал. 2022; 21(3): 50–60. – doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-3-50-60

For citation: Zhidkova E.M., Grigoreva D.D., Lylova E.S., Maksimova V.P., Sagitova G.R., Khayrieva G.I., Trapeznikova E.S., Kirsanov K.I., Yakubovskaya M.G., Lesovaya E.A. In vitro screening of effectiveness and anti-proliferative effects of potential DDIT4 inhibitors for breast cancer cell lines. Siberian Journal of Oncology. 2022; 21(3): 50–60. – doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-3-50-60

СКРИНИНГ ЭФФЕКТИВНОСТИ И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ DDIT4 НА МОДЕЛЯХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.М. Жидкова¹, Д.Д. Григорьева¹, Е.С. Лылова¹, В.П. Максимова¹,
Г.Р. Сагитова², Г.И. Хайриева², Е.С. Трапезникова², К.И. Кирсанов^{1,3},
М.Г. Якубовская¹, Е.А. Лесовая^{1,4}

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, г. Москва, Россия¹

Россия, 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24. E-mail: zhidkova_em@mail.ru¹

ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»
Минздрава России (Сеченовский Университет), г. Москва, Россия²

Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2, Россия²

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», г. Москва, Россия³

Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6³

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»

Минздрава России, г. Рязань, Россия⁴

Россия, 390026, г. Рязань, ул. Высоковольная, 9⁴

Аннотация

Цель исследования – скрининг отобранных нами ранее ингибиторов DDIT4 по способности подавлять базальную и глюкокортикоид-индуцированную экспрессию данного гена в клетках рака молочной железы (РМЖ), а также оценка антипролиферативных и цитотоксических эффектов исследуемых комбинаций препаратов. **Материал и методы.** В исследовании использованы клетки РМЖ люминального, HER2-положительного и тройного негативного подтипов. Методами количественной ПЦР и Вестерн-блоттинга было оценено влияние препаратов (рапамицина, вортманнина, LY-294002, апигенина, ресвератрола, куркумина, CGP-60474 и эметина) на базальный и индуцированный глюкокортикоидами уровень экспрессии гена *DDIT4* и его белкового продукта. **Результаты.** Наиболее эффективными ингибиторами DDIT4 оказались рвотное средство эметин, ингибитор протеинкиназы C CGP-60474 и модуляторы сигнального пути PI3K/Akt/mTOR рапамицин, вортманнин и LY-294002. В отношении клеточных линий РМЖ были продемонстрированы цитотоксические эффекты и антипролиферативная активность комбинаций глюкокортикоида дексаметазона с противорвотным соединением эметином, ингибитором протеинкиназы C CGP-60474, а также фитонутриентами ресвератролом и куркумином. **Заключение.** Выявлены новые ингибиторы как базального, так и глюкокортикоид-индуцированного уровня белка и мРНК гена *DDIT4* в клеточных моделях РМЖ *in vitro*. По итогам работы эметин и CGP-60474 являются наиболее перспективными препаратами для дальнейших исследований.

Ключевые слова: глюкокортикоиды, глюкокортикоидный рецептор, рак молочной железы, DDIT4, комбинированная химиотерапия, экспрессия генов.

IN VITRO SCREENING OF EFFECTIVENESS AND ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF POTENTIAL DDIT4 INHIBITORS FOR BREAST CANCER CELL LINES

E.M. Zhidkova¹, D.D. Grigoreva¹, E.S. Lylova¹, V.P. Maksimova¹,
G.R. Sagitova², G.I. Khayrieva², E.S. Trapeznikova², K.I. Kirsanov^{1,3},
M.G. Yakubovskaya¹, E.A. Lesovaya^{1,4}

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russia, Moscow, Russia¹

24, Kashirskoye Shosse, 115522, Moscow, Russia. E-mail: zhidkova_em@mail.ru¹

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russia, Moscow, Russia²

8-2, Trubetskaya St., 119991, Moscow, Russia²

RUDN University, Moscow, Russia³

6, Miklukho-Maklaya St., Moscow, 117198, Russia³

I.P. Pavlov Ryazan State Medical University of the Ministry of Health of the Russia, Ryazan, Russia⁴

9, Vysokovoltnaya St., Ryazan, 390026, Russia⁴

Abstract

Objective: screening of previously selected DDIT4 inhibitors by their ability to suppress basal and glucocorticoid-induced expression of this gene in breast cancer (BC) cells, as well as evaluation of antiproliferative and cytotoxic effects of the studied drug combinations the antiproliferative and proapoptotic effects of studied drug combinations. **Material and Methods.** Breast cancer cells of the luminal, HER2-positive and triple negative subtypes were used. The effects of drugs (rapamycin, wortmannin, LY-294002, apigenin, resveratrol, curcumin, CGP-60474, and emetine) on the basal and glucocorticoid-induced levels of expression of the *DDIT4* gene and its protein product were evaluated by qPCR and Western blotting assays. **Results.** Emetine, rapamycin, wortmannin, LY-294002 and CGP-60474 demonstrated DDIT4-inhibition activity. Glucocorticoid dexamethasone showed cytotoxic effects and antiproliferative activity in combination with emetine, CGP-60474 (C protein kinase inhibitor), resveratrol and curcumin. **Conclusion.** Novel inhibitors of *DDIT4* in breast cancer model cells in vitro were found. Emetine and CGP-60474 are the most promising drugs for further research.

Key words: glucocorticoid, glucocorticoid receptor, breast cancer, *DDIT4*, combination therapy, gene expression

Введение

Глюкокортикоиды (ГК) применяют в клинической практике уже более 50 лет. Цитотоксическое действие ГК на клетки иммунной системы обуславливает их применение в лечении опухолей кроветворной системы [1, 2]. При терапии солидных опухолей, в частности рака молочной железы (РМЖ), ГК применяют в качестве адъюванта для расширения терапевтического интервала основного цитотоксического препарата и снижения побочных эффектов химиотерапии [1]. Однако при длительном применении ГК вызывают развитие серьезных побочных эффектов, в частности асептический остеонекроз, диабет, мышечную атрофию, метаболические осложнения и др. [3]. Кроме того, в зависимости от подтипа РМЖ, ГК могут значительно способствовать прогрессированию опухоли [2, 4].

За последнее десятилетие был предложен ряд подходов по расширению терапевтического интервала ГК благодаря одновременному снижению

их побочных эффектов. Одним из таких подходов является использование ГК в комбинации с препаратами, способными подавить экспрессию генов, отвечающих за развитие побочных эффектов ГК. В ряде исследований было показано, что при действии ГК в тканях, чувствительных к стероид-индуцированной атрофии, наблюдается повышение экспрессии *DDIT4* (*RTP801/Dig2/DDIT4*), консервативного индуцируемого стрессом ингибитора mTOR [5, 6].

В ряде исследований было установлено, что повышение уровня экспрессии *DDIT4* ассоциировано с более быстрым прогрессированием опухоли, что делает его интересным объектом исследований в качестве возможного прогностического маркера при ряде злокачественных новообразований (ЗНО) [7]. При этом роль *DDIT4* в прогрессировании и терапии РМЖ изучена недостаточно, а данные опубликованных исследований весьма противоречивы. Показано, что повышение экспрессии *DDIT4* после использования отдельных химиопрепаратов кор-

релирует со снижением жизнеспособности клеток РМЖ [8]. Более того, при HER2-положительном и тройном негативном (ТН) РМЖ пролиферация опухолевых клеток в условиях гипоксии возможна за счет гиперактивации сигнального пути mTOR при ингибировании DDIT4 [9]. Однако в других исследованиях была показана взаимосвязь повышения экспрессии DDIT4 с неблагоприятным прогнозом при ТН РМЖ [10]. По всей видимости, ингибирование DDIT4 приводит к неодинаковым последствиям при РМЖ различных подтипов.

Данная работа посвящена анализу действия ряда ингибиторов DDIT4 на клетки РМЖ разных подтипов с целью выявления соединений, проявляющих наибольшую эффективность как по подавлению экспрессии данного гена и его белкового продукта, так и по подавлению жизнеспособности опухолевых клеток.

Цель исследования – скрининг отобранных нами ранее ингибиторов DDIT4 по способности подавлять базальную и глюкокортикоид-индуцированную экспрессию данного гена в клетках рака молочной железы (РМЖ), а также оценка антипролиферативных и цитотоксических эффектов исследуемых комбинаций препаратов.

Выбор соединений

На основании биоинформатического скрининга, проведенного в сотрудничестве с лабораториями И.В. Будуновой (Northwestern University, Чикаго, США) и Дж.Т. Дадли (госпиталь Маунт-Синай, Нью-Йорк, США) с использованием аналитической системы «карты взаимодействия» (ConnectivityMap, CMap) из лекарственных препаратов различных классов, одобренных управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA), были определены 1 300 потенциальных ингибиторов DDIT4 [11, 12]. Для 5 из них была продемонстрирована успешность применения GC в комбинации с ингибиторами экспрессии DDIT4 с целью снижения их побочного действия при терапии ЗНО кроветворной системы. На моделях лейкозов и лимфом *in vitro* был показан синергизм противоопухолевого действия при комбинировании с GC для вортманнина, LY-294002 и AZD-8055. Данные соединения, а также противопаразитарное и рвотное средство эметин и ингибитор протеинкиназы C CGP-60474 подавляют базальную и GC-индуцированную экспрессию гена *DDIT4* в клеточных линиях CEM и Granta [11, 13].

Сравнив биоинформатические данные о потенциальной активности веществ в отношении клеток РМЖ, а также данные, полученные на линиях опухолей кроветворной системы [11, 13], мы отобрали для дальнейшего исследования *in vitro* 8 различных по структуре и физико-химическим свойствам соединений: растительные полифенолы куркумин, ресвератрол и апигенин, модуляторы сигнального

пути PI3K/Akt/mTOR LY-294002, рапамицин и вортманнин, а также рвотное средство эметин и ингибитор протеинкиназы C CGP-60474.

Соединения группы природных полифенолов (куркумин, ресвератрол и апигенин) обладают разнообразной биологической активностью. Они действуют как акцепторы свободных радикалов и антиоксиданты, проявляя антимуtagenное и противовоспалительное действие [14–20]. Изучаемые полифенолы обладают антиканцерогенным эффектом в отношении ЗНО, а также обладают антипролиферативным действием на опухолевые клетки [21–23]. Также показано, что ресвератрол обладает хроматин-модулирующим эффектом и способен активировать интерфероновый сигналинг в клетках, культивируемых *in vitro* [24]. Эметин, изохинолин растительного происхождения, обладает противопаразитарным действием, противовирусной активностью, а также противовоспалительным эффектом за счет ингибирования NF-κB [25]. Эметин усиливает чувствительность клеток рака яичника к цисплатину [26], индуцирует апоптоз, снижает пролиферацию и метастатическую активность клеток РМЖ [27]. Ингибитор протеинкиназы C CGP-60474 является двойным ингибитором циклинзависимых киназ cdk1/cdk2 и запускает обратимую остановку клеточного цикла в G1/S фазах [28]. Рапамицин, вортманнин и LY-294002, несмотря на большие структурные различия, имеют схожие биологические функции и входят в группу ингибиторов Akt/PI3K/mTOR. Было показано, что mTOR регулирует протеасомную деградацию DDIT4 и что ингибиторы mTOR и PI3K снижают период полужизни белка DDIT4 в кератиноцитах *in vitro* и в эпидермисе мышей *in vivo* [11].

Материал и методы

Клеточные линии аденокарциномы человека культивировали в стандартной среде DMEM (для MCF-7 и MDA-MB-231) или RPMI 1640 (для HCC-1954), содержащей 10 % эмбриональную сыворотку телят, 2 mM L-глутамин, пенициллин (50 ед/мл) и стрептомицин (50 ед/мл) (все – «ПанЭко», Россия) при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂.

В культуральную среду вносили потенциальные ингибиторы в концентрации 0,1 мкМ (апигенин, ресвератрол, куркумин), 10 нМ (рапамицин, вортманнин, LY-294002), 1 нМ (CGP-60474, эметин) или дексаметазон (100 нМ) и инкубировали 24 ч. В экспериментах по исследованию совместного действия препаратов и GC обработку дексаметазоном проводили после 4 ч инкубации с ингибиторами. Оптимальная схема обработки клеток была отрабатана нами ранее: с помощью МТТ-теста были подобраны минимальные нетоксичные концентрации веществ (IC80-90), в пилотном эксперименте с наиболее активным соединением рапамицином оптимальным временем предобработки клеток

Таблица 1/Table 1

Последовательности праймеров для qPCR
qPCR primers

Ген/Gene	Последовательность праймеров 5'-3'/Primer sequences 5'-3'	
	Прямой праймер/Forward primer	Обратный праймер/Reverse primer
<i>RPLP0</i>	ccttctccttgggctggtcatcca	cagacactggcaacattgcggacac
<i>DDIT4</i>	tagccttgggaccgctctcgt	caggtaagccgtgtcttctccg

РМЖ для регистрации ингибирования DDIT4 являлся 4-часовой интервал [29].

Антипролиферативное действие веществ определяли методом прямого подсчета клеток. Клетки рассаживали в 24-луночные планшеты (по 1 мл, 25 000 кл/мл) и обрабатывали, как описано выше. Подсчет клеток проводили на автоматическом счетчике клеток (BioRad, США) с исключением трипановым синим через 24 ч и 120 ч после введения первой дозы препаратов.

Вестерн-блоттинг. Клетки рассаживали по 1 мл, 1 млн кл/мл и обрабатывали, как описано выше. Клетки промывали PBS. Лизис клеток проводили в буфере RIPA с добавлением ингибитора протеиназ (Sigma-Aldrich). Лизат отделяли центрифугированием. Белки разделяли методом вертикального электрофореза в 10 % полиакриламидном геле в Tris-глициновом буфере с 1 % SDS. Перенос на поливинилденфторидную мембрану (поры 0,22 мкм) осуществляли мокрым способом. Для предотвращения неспецифической сорбции мембраны инкубировали в растворе 5 % обезжиренного молока в PBS, затем проводили гибридизацию с первичными антителами к DDIT4 (2516S, Cell Signaling Technology). Для нормализации получаемых данных проводили гибридизацию с антителами к глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH) (ab181602, Abcam). Далее проводили гибридизацию с вторичными антителами (ab97051, Abcam). Белки проявляли при помощи набора Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad, США). Количественный анализ проводился с использованием денситометрии на приборе ImageQuant TL (General Electric, США).

Количественная ПЦР (qPCR). Тотальную РНК выделяли фенол-хлороформной экстракцией. Для удаления загрязнения геномной ДНК и исключения контаминаций при ПЦР проводили обработку полученных образцов РНК ДНКазой I (RQ1 RNase-Free DNase, Promega). Для получения кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием коммерческого набора («Синтол», Россия) по протоколу производителя. В реакцию Q-PCR брали 50 нг кДНК и по 500 нМ обратного и прямого праймеров (табл. 1). Амплификацию проводили в следующем режиме: 95 °С, 10 мин (95 °С, 15 с; 72 °С, 30 с, 60 °С, 30 с) – 45 циклов. Количество ПЦР-продуктов оценивали по флуоресценции красителя EVA GREEN («Синтол», Россия) и

нормализовали относительно ПЦР-продукта гена рибосомного белка *RPLP0*. Относительное изменение экспрессии мРНК вычисляли методом $\Delta\Delta Ct$, где $\Delta\Delta Ct$ определяли путем вычитания среднего значения ΔCt (цикл регистрации максимальной интенсивности флуоресценции) контроля из ΔCt для экспериментальных образцов.

Все эксперименты выполнены в 3–5 повторах. Средние значения и средние квадратичные отклонения рассчитывали с помощью пакета программ SPSS Statistics. Для определения статистической значимости выявленных различий использовали непараметрический критерий Манна–Уитни.

Результаты

Индукция DDIT4 дексаметазоном в клетках РМЖ различных молекулярных подтипов

Первым этапом данной работы являлось определение оптимальных условий обработки клеток РМЖ потенциальными ингибиторами экспрессии DDIT4. Основным параметром, принимаемым во внимание, была интенсивность индукции экспрессии гена *DDIT4* и его белкового продукта после обработки GC в используемых клеточных линиях. С помощью количественной ПЦР и Вестерн-блоттинга было показано, что дексаметазон (Dex) за 24 ч вызывал повышение экспрессии мРНК гена *DDIT4* и его белкового продукта в линиях РМЖ (рис. 1). Наиболее сильную индукцию гена наблюдали в линии люминального РМЖ MCF-7, что согласуется с полученными ранее данными о высокой чувствительности данной линии к действию GC [30]. В клетках линии HCC-1954 индукция экспрессии гена *DDIT4* была наименьшей, в то же время содержание белка после инкубации с Dex увеличилось в 2,2 раза.

Оценка влияния исследуемых соединений на базальную и GC-индуцированную экспрессию DDIT4

Подавление базальной экспрессии гена *DDIT4* на всех линиях РМЖ было показано для вортманнина (рис. 2). Эметин и рапамицин эффективно подавляли экспрессию гена в линиях люминального и ТН РМЖ, не вызывая при этом статистически значимой индукции в клетках HER2-положительного подтипа. Ни один из рассматриваемых ингибиторов не индуцировал экспрессию гена *DDIT4* в клетках РМЖ. Подавление GC-индуцированной

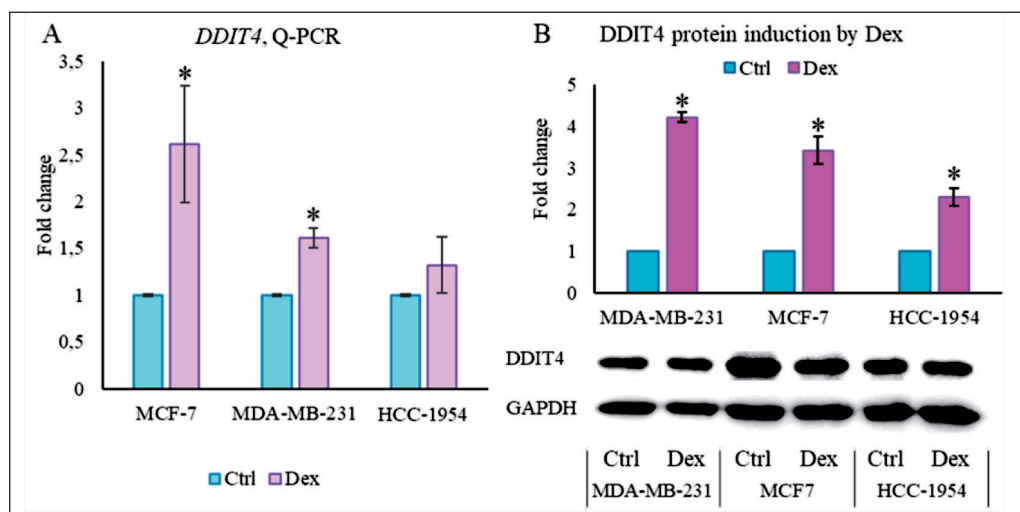


Рис. 1. GC-индуцированная экспрессия белка и гена *DDIT4* в клетках ПМЖ. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии дексаметазона (100 нМ): А. Уровень экспрессии гена *DDIT4* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPLP0*; В. Уровень экспрессии белка *DDIT4* определяли методом иммуноблоттинга с использованием специфических антител. Результаты денситометрического анализа нормированы на экспрессию белка *GAPDH*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3-5$).

Примечание: * – отличия от отрицательного контроля статистически значимы ($p < 0,05$)

Fig. 1. Dex-induced *DDIT4* expression on mRNA and protein level in breast cancer cells. Cells were cultivated for 24 h with Dex or solvent. A. qPCR of *DDIT4* expression after Dex treatment results were normalized to the housekeeping gene *RPLP0*. B. Western blot analysis of *DDIT4* expression after Dex treatment. *GAPDH* served as loading control. Data are presented as $M \pm SD$ ($n=3-5$).

Note: * – a statistically significant difference from the control ($p < 0.05$)

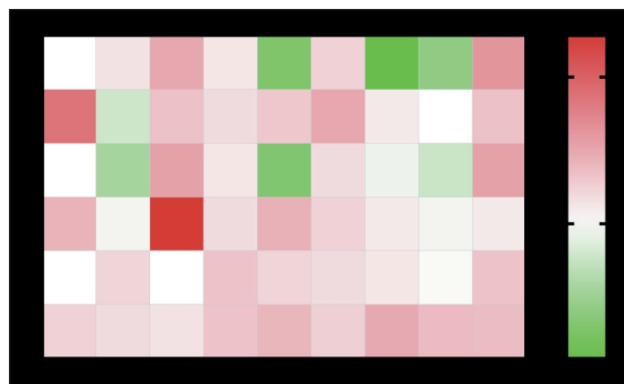


Рис. 2. Экспрессия гена *DDIT4* в клетках ПМЖ при обработке ингибиторами *DDIT4* и их комбинациями с GC. Клетки культивировали в течение 4 ч в присутствии растворителя или исследуемого ингибитора *DDIT4*, затем добавляли GC в концентрации 100 нМ или растворитель и инкубировали в течение 24 ч. Уровень экспрессии *DDIT4* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPLP0*. Данные представлены в виде тепловой карты распределения значений \log_2 экспрессии гена. Для каждого соединения было получено 3–5 биологических повторов

Fig. 2. Effects of *DDIT4* inhibitors, GCs and their combined treatment on *DDIT4* expression in breast cancer cells. Cells were pre-treated with solvent or *DDIT4* inhibitors for 4 h, then were treated for 24 h with Dex or solvent. qPCR results were normalized to the housekeeping gene *RPLP0*. Data are presented as heat map of \log_2 FoldChange

экспрессии гена *DDIT4* было показано для ингибиторов PI3K/Akt/mTOR LY-294002 и вортманнина. Растительные полифенолы ресвератрол, апигенин и куркумин и рвотное средство эметин также обладали способностью ингибировать экспрессию *DDIT4*, индуцированную дексаметазоном.

Наиболее ярко выраженный эффект ингибирования базальной экспрессии белка *DDIT4* был показан для ингибитора протеинкиназы С CGP-60474: 3,42-кратное увеличение экспрессии *DDIT4* после инкубации клеток MCF-7 с дексаметазоном и снижение уровня белка и мРНК в 0,7 раза после инкубации клеток с CGP-60474 (рис. 3). Для клеточной линии MDA-MB-231 наблюдали аналогичные эффекты (рис. 3).

Антипролиферативные эффекты исследуемых веществ

Были оценены эффекты изучаемых соединений на пролиферативную активность модельных линий клеток как индивидуально, так и в сочетании с дексаметазоном. Число жизнеспособных клеток подсчитывали через 24 ч и через 120 ч после обработки. Ингибитор протеинкиназы CGP-60474 и рвотное средство эметин продемонстрировали наиболее высокую способность подавлять рост и жизнеспособность клеток ПМЖ. Так, при обработке эметин в течение 24 ч число жизнеспособных клеток линии MCF-7 и MDA-MB-231 составило 50–60 %, при обработке в течение 5 сут этот показатель падал на 15–20 % (рис. 4). Обработка клеток комбинацией эметина с дексаметазоном

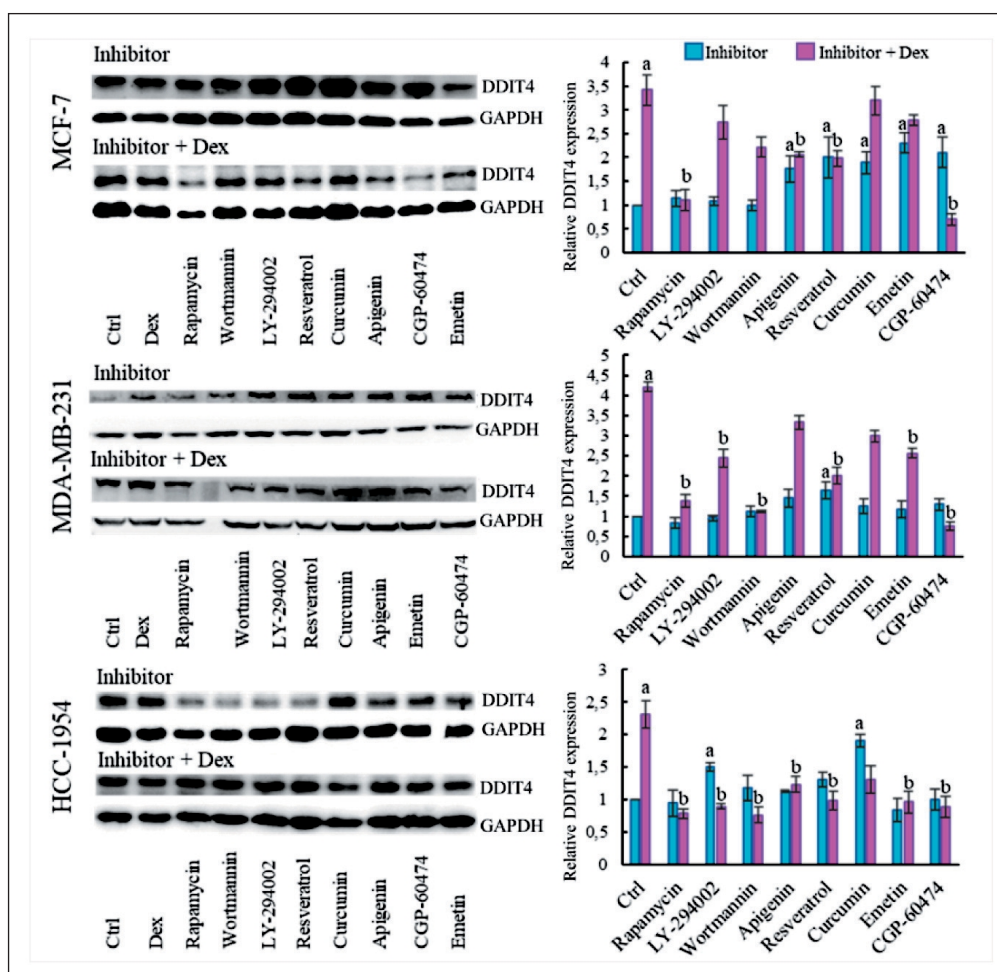


Рис. 3. Экспрессия белка DDIT4 в клетках РМЖ при обработке ингибиторами DDIT4. Клетки культивировали в течение 4 ч в присутствии растворителя или исследуемого ингибитора DDIT4, затем добавляли GC в концентрации 100 нМ или растворитель и инкубировали в течение 24 ч. Уровень экспрессии DDIT4 определяли методом иммуноблоттинга с использованием специфических антител. Относительное изменение количества белка оценивали денситометрически и нормализовали по экспрессии белка GAPDH. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$).

Примечание: а – отличия от контроля статистически значимы;

б – отличия от образцов клеток, обработанных Dex, статистически значимы ($p < 0,05$)

Fig. 3. Effects of DDIT4 inhibitors, GCs and their combined treatment on DDIT4 protein expression in breast cancer cells. Cells were pretreated with in the presence of solvent or DDIT4 inhibitor for 4 h, then were treated for another 24 h with Dex or solvent. GAPDH served as loading control. Data are presented as $M \pm SD$ ($n=3$).

Note: а – statistically significant difference from the control (Ctrl);

б – statistically significant difference from the samples treated with Dex ($p < 0.05$)

частично приводила к кооперации цитотоксических эффектов при 120-часовой инкубации линии MDA-MB-231. Цитотоксические эффекты CGP-60474 были менее выражены, однако для данного соединения в комбинации с GC наблюдали более четкую кооперацию в подавлении жизнеспособности клеток РМЖ (рис. 4). Более слабый цитотоксический эффект был продемонстрирован для препаратов класса ингибиторов PI3K/Akt/mTOR рапамицина, вортманнина и LY-294002, а также фитоалексина ресвератрола, причем преимущественно на 120 ч инкубации с данными соединениями индивидуально и в комбинации с дексаметазоном. Цитотоксический эффект остальных анализируемых потенциальных ингибиторов DDIT4 был менее выражен. В связи с этим эметин и CGP-60474

являются наиболее перспективными препаратами для дальнейших исследований.

Обсуждение

Стандартная химио- и радиотерапия РМЖ вызывает большое количество токсических побочных эффектов, для купирования которых разработаны отдельные схемы применения препаратов. GC являются частым компонентом таких схем; более того, собственный антипролиферативный эффект GC на клетки РМЖ может усиливать действие основного цитостатика [31, 32]. Однако следует принимать во внимание тот факт, что среди побочных эффектов применения GC в терапии ЗНО могут наблюдаться развитие резистентности [33, 34], остеопороза и мышечной дистрофии, усиление

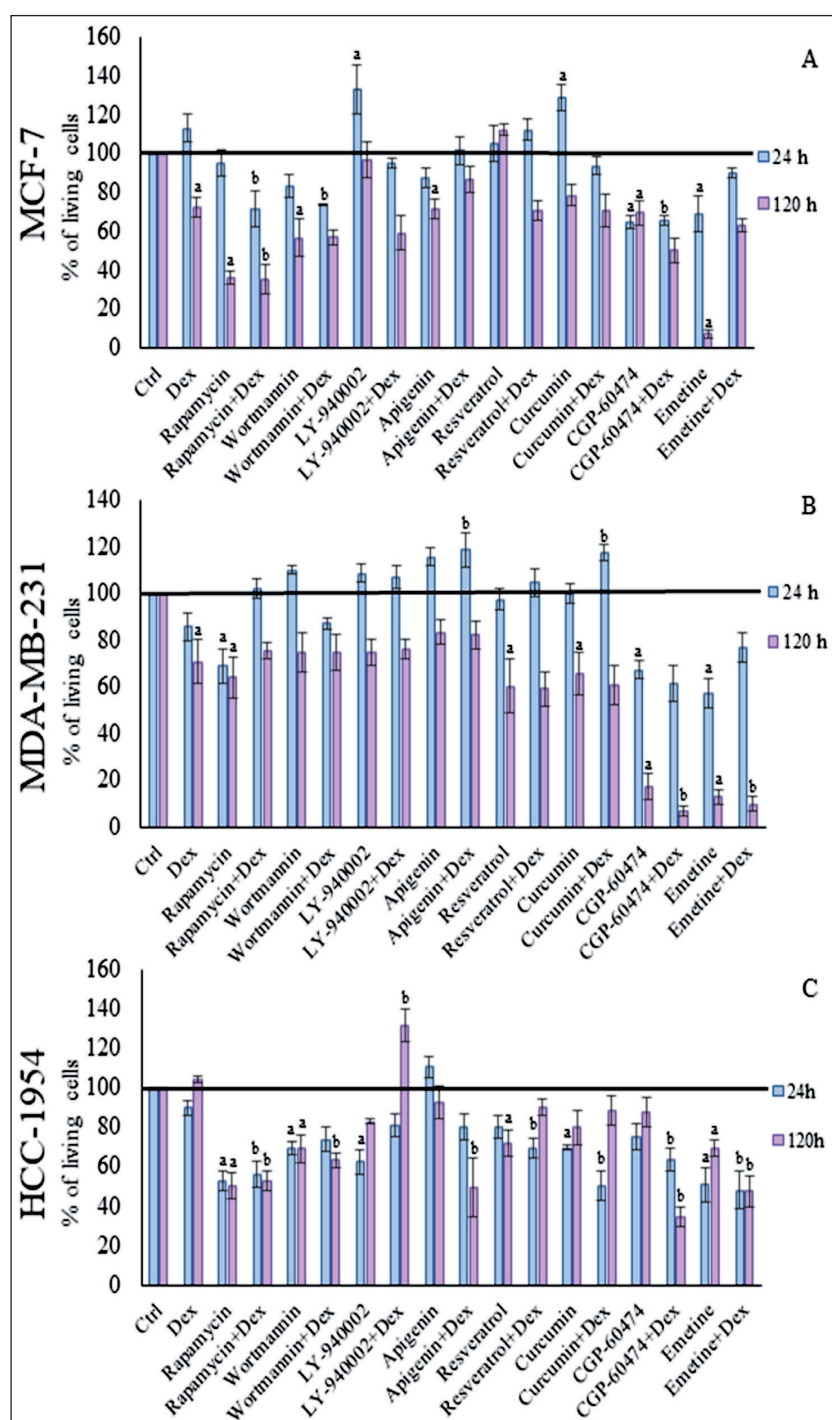


Рис. 4. Антипролиферативный эффект исследуемых ингибиторов DDIT4 индивидуально и в комбинации с дексаметазоном на клетки РМЖ:

А – число живых клеток линии MCF-7 после инкубации с исследуемыми веществами и их комбинациями; В – число живых клеток линии MDA-MB-231 после инкубации с исследуемыми веществами и их комбинациями; С – число живых клеток линии HCC-1954 после инкубации с исследуемыми веществами и их комбинациями. Клетки культивировали в присутствии растворителя, дексаметазона, исследуемых ингибиторов, а также их комбинаций. Подсчет клеток проводили через 24 ч и 120 ч. Количество живых клеток в экспериментальных образцах приведено в процентах от контроля, обработанного растворителем. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=5$). Примечание: а – отличия от контроля статистически значимы; б – отличия от образцов клеток, обработанных Dex, статистически значимы ($p < 0,05$)

Fig. 4. Antiproliferative effect of DDIT4 inhibitors individually and in combination with Dex on breast cancer cells. A – data for MCF-7 cells, B – data for MDA-MB-231, C – data for HCC-1954 line. Cells were treated with the solvent, Dex, inhibitors and their combination. Cells were counted 24 h and 120 h after the treatment. Data are presented as $M \pm SD$ ($n=5$).

Note: a – statistically significant difference from the control (Ctrl);

b – statistically significant difference from the samples treated with Dex ($p < 0.05$)

метастазирования [35] и пр. Введение в протокол противоопухолевой терапии дополнительных соединений для ингибирования экспрессии GR-зависимых генов/белков, опосредующих развитие побочных эффектов, рассматривается как один из наиболее рациональных подходов для совершенствования GC-терапии. При этом перепрофилирование зарегистрированных и уже используемых в клинической практике препаратов с описанными свойствами является перспективной альтернативой долгосрочной и дорогостоящей разработке новых фармакологических препаратов [12]. Более того,

многие препараты растительного происхождения (флавоноиды, алкалоиды, фенолы, танины, гликозиды, лактоны и пр.) могут служить «мягкими» вспомогательными средствами при химиотерапии или при купировании ее побочных эффектов. Биоинформатический скрининг на основе принципа перепрофилирования препаратов оказался продуктивным подходом к подбору соединений, способных подавлять побочные эффекты GC.

В ходе работы нами были продемонстрированы цитотоксические эффекты эметина и CGP-60474 на клетки РМЖ различных подтипов, что

согласовывалось с литературными данными [27]. Наблюдаемая нами антипролиферативная активность ресвератрола и куркумина на клетках РМЖ также была описана в литературе [23]. Цитотоксический эффект комбинаций данных соединений с GC дексаметазоном был описан нами впервые. Также впервые было показано, что данные соединения ингибируют как базальный, так и GC-индуцированный уровень белка и мРНК *DDIT4* в клеточных моделях РМЖ.

Таким образом, в данном исследовании выявлен ряд ингибиторов *DDIT4*, способных *in vitro* подавлять экспрессию данного гена в клетках РМЖ люминального и ТН подтипов. Наиболее эффективными ингибиторами *DDIT4* были рвотное средство эметин, ингибитор протеинкиназы С CGP-60474 и модуляторы сигнального пути PI3K/Akt/mTOR рапамицин, вортманнин и LY-294002. Также определенную активность в данном направлении проявили природные полифенолы растительного происхождения: апигенин, куркумин и ресвератрол. Способность исследуемых соединений подавлять жизнеспособность клеток РМЖ была менее выражена, чем в отношении клеток лейкозов и лимфом [11, 13]. Однако наблюдаемое подавление пролиферации после инкубации с ин-

гибиторами *DDIT4* свидетельствует о перспективности исследования данных соединений в качестве адъювантных препаратов в комбинированной химиотерапии с использованием GC.

Заключение

Выявлен ряд ингибиторов *DDIT4*, способных *in vitro* подавлять экспрессию данного гена в клетках РМЖ люминального и ТН подтипов. Наиболее эффективными ингибиторами *DDIT4* были эметин, ингибитор протеинкиназы С CGP-60474 и модуляторы сигнального пути PI3K/Akt/mTOR рапамицин, вортманнин и LY-294002. Также определенную активность в данном направлении проявили природные полифенолы растительного происхождения: апигенин, куркумин и ресвератрол. Способность исследуемых соединений подавлять жизнеспособность клеток РМЖ была менее выражена, чем в отношении клеток лейкозов и лимфом. Однако наблюдаемое подавление пролиферации после инкубации с ингибиторами *DDIT4* свидетельствует о перспективности исследования данных соединений в качестве адъювантных препаратов в комбинированной химиотерапии с использованием GC и является пилотным исследованием для дальнейшего масштабирования на первичных культурах РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Vandewalle J., Luyckaert A., De Bosscher K., Libert C. Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids. *Trends Endocrinol Metab.* 2018; 29(1): 42–54. doi: 10.1016/j.tem.2017.10.010.
2. Kadmiel M., Cidlowski J.A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2013; 34(9): 518–30. doi: 10.1016/j.tips.2013.07.003.
3. Oray M., Abu Samra K., Ebrahimiadib N., Meese H., Foster C.S. Long-term side effects of glucocorticoids. *Expert Opin Drug Saf.* 2016; 15(4): 457–65. doi: 10.1517/14740338.2016.1140743.
4. Noureddine L.M., Trédan O., Hussein N., Badran B., Le Romancer M., Poulard C. Glucocorticoid Receptor: A Multifaceted Actor in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(9): 4446. doi: 10.3390/ijms22094446.
5. Baida G., Bhalla P., Kirsanov K., Lesovaya E., Yakubovskaya M., Yuen K., Guo S., Lavker R.M., Readhead B., Dudley J.T., Budunova I. REDD1 functions at the crossroads between the therapeutic and adverse effects of topical glucocorticoids. *EMBO Mol Med.* 2015; 7(1): 42–58. doi: 10.15252/emmm.201404601.
6. Wang H., Kubica N., Ellisen L.W., Jefferson L.S., Kimball S.R. Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1. *J Biol Chem.* 2006; 281(51): 39128–34. doi: 10.1074/jbc.M610023200.
7. Pinto J.A., Roffo C., Ruez L.E., Prado A., Araujo J.M., Bravo L., Fajardo W., Morante Z.D., Aguilar A., Neciosup S.P., Mas L.A., Bretel D., Balko J.M., Gomez H.L. In silico evaluation of DNA Damage Inducible Transcript 4 gene (*DDIT4*) as prognostic biomarker in several malignancies. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 1526. doi: 10.1038/s41598-017-01207-3.
8. Savukaitytė A., Gudaitytė G., Bartnykaitė A., Ugenskienė R., Juozaitytė E. siRNA Knockdown of REDD1 Facilitates Aspirin-Mediated Dephosphorylation of mTORC1 Target 4E-BP1 in MDA-MB-468 Human Breast Cancer Cell Line. *Cancer Manag Res.* 2021; 13: 1123–33. doi: 10.2147/CMAR.S264414.
9. Horak P., Crawford A.R., Vadysirisack D.D., Nash Z.M., DeYoung M.P., Sgroi D., Ellisen L.W. Negative feedback control of HIF-1 through REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107(10): 4675–80. doi: 10.1073/pnas.0907705107.
10. Koo J.S., Jung W. Alteration of REDD1-mediated mammalian target of rapamycin pathway and hypoxia-inducible factor-1α regulation in human breast cancer. *Pathobiology.* 2010; 77(6): 289–300. doi: 10.1159/000320936.
11. Lesovaya E., Agarwal S., Readhead B., Vinokour E., Baida G., Bhalla P., Kirsanov K., Yakubovskaya M., Platanius L.C., Dudley J.T., Budunova I. Rapamycin Modulates Glucocorticoid Receptor Function, Blocks Atrophogenic REDD1, and Protects Skin from Steroid Atrophy. *J Invest Dermatol.* 2018; 138(9): 1935–44. doi: 10.1016/j.jid.2018.02.045.
12. Савинкова А.В., Жидкова Е.М., Тилова Л.Р., Лаврова М.Д., Лылова Е.С., Кузин К.А., Портянникова А.Ю., Максимова В.П., Холодова А.В., Власова О.А., Фетисов Т.И., Кирсанов К.И., Белицкий Г.А., Якубовская М.Г., Лесовая Е.А. Варианты и перспективы реперофилрования лекарственных препаратов для использования в терапии онкологических заболеваний. *Сибирский онкологический журнал.* 2018; 17(3): 77–87. [Savinkova A.V., Zhidkova E.M., Tilova L.R., Lavrova M.D., Lylova E.S., Kuzin K.A., Portyannikova A.Yu., Maximova V.P., Kholodova A.V., Vlasova O.A., Fetisov T.I., Kirsanov K.I., Belitskiy G.A., Yakubovskaya M.G., Lesovaya E.A. Variants and perspectives of drug repurposing for cancer treatment. *Siberian Journal of Oncology.* 2018; 17(3): 77–87. (in Russian)]. doi: 10.21294/1814-4861-2018-17-3-77-87.
13. Лылова Е.С., Савинкова А.В., Жидкова Е.М., Кирсанов К.И., Якубовская М.Г., Будунова И.В., Лесовая Е.А. Ингибирование экспрессии гена *REDD1* для снижения побочных эффектов глюкокортикоидов. *Сибирский онкологический журнал.* 2020; 19(6): 73–81. [Lylova E.S., Savinkova A.V., Zhidkova E.M., Kirsanov K.I., Yakubovskaya M.G., Budunova I.V., Lesovaya E.A. Inhibition of *REDD1* expression for the reduction of glucocorticoid-induced side effects. *Siberian Journal of Oncology.* 2020; 19(6): 73–81. (in Russian)]. doi: 10.21294/1814-4861-2020-19-6-73-81.
14. Hostettler G.L., Ralston R.A., Schwartz S.J. Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity. *Adv Nutr.* 2017; 8(3): 423–35. doi: 10.3945/an.116.012948.
15. Montenegro-Landivar M.F., Tapia-Quiros P., Vecino X., Reig M., Valderrama C., Granados M., Cortina J.L., Saurina J. Polyphenols and their potential role to fight viral diseases: An overview. *Sci Total Environ.* 2021; 801: 149719. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149719.
16. Yu C., Yang B., Najafi M. Targeting of cancer cell death mechanisms by curcumin: Implications to cancer therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2021; 129(6): 397–415. doi: 10.1111/bcpt.13648.
17. Fu X., Li M., Tang C., Huang Z., Najafi M. Targeting of cancer cell death mechanisms by resveratrol: a review. *Apoptosis.* 2021; 26(11–12): 561–73. doi: 10.1007/s10495-021-01689-7.
18. Hazafa A., Iqbal M.O., Javaid U., Tareen M.B.K., Amna D., Ramzan A., Piracha S., Naeem M. Inhibitory effect of polyphenols (phenolic acids, lignans, and stilbenes) on cancer by regulating signal transduction pathways: a review. *Clin Transl Oncol.* 2022; 24(3): 432–45. doi: 10.1007/s12094-021-02709-3.

19. Nozhat Z., Heydarzadeh S., Memariani Z., Ahmadi A. Chemoprotective and chemosensitizing effects of apigenin on cancer therapy. *Cancer Cell Int.* 2021; 21(1): 574. doi: 10.1186/s12935-021-02282-3.
20. Javed Z., Sadia H., Iqbal M.J., Shamas S., Malik K., Ahmed R., Raza S., Butnariu M., Cruz-Martins N., Sharifi-Rad J. Apigenin role as cell-signaling pathways modulator: implications in cancer prevention and treatment. *Cancer Cell Int.* 2021; 21(1): 189. doi: 10.1186/s12935-021-01888-x.
21. Shukla S., Gupta S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm Res.* 2010; 27(6): 962–78. doi: 10.1007/s11095-010-0089-7.
22. Aggarwal B.B., Bhardwaj A., Aggarwal R.S., Seeram N.P., Shishodia S., Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2004; 24(5A): 2783–840.
23. Arena A., Romeo M.A., Benedetti R., Masuelli L., Bei R., Gilardini Montani M.S., Cirone M. New Insights into Curcumin- and Resveratrol-Mediated Anti-Cancer Effects. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021; 14(11): 1068. doi: 10.3390/ph14111068.
24. Власова О.А., Борунова А.А., Сафина А., Сметанина И.В., Лесовая Е.А., Белицкий Г.А., Заботина Т.Н., Гурова К., Кирсанов К.И., Якубовская М.Г. Активация сигнального пути интерферона-альфа ресвератролом, генистеином и кверцетином. *Сибирский онкологический журнал.* 2019; 18(1): 50–5. [Vlasova O.A., Borunova A.A., Safina A., Smetanina I.V., Lesovaya E.A., Belitsky G.A., Zabolina T.N., Gurova K., Kirsanov K.I., Yakubovskaya M.G. Activation of interferon- α signaling by resveratrol, genistein and quercetin. *Siberian Journal of Oncology.* 2019; 18(1): 50–5. (in Russian)]. doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-50-55.
25. Miller S.C., Huang R., Sakamuru S., Shukla S.J., Attene-Ramos M.S., Shinn P., Van Leer D., Leister W., Austin C.P., Xia M. Identification of known drugs that act as inhibitors of NF-kappaB signaling and their mechanism of action. *Biochem Pharmacol.* 2010; 79(9): 1272–80. doi: 10.1016/j.bcp.2009.12.021.
26. Sun Q., Yogosawa S., Iizumi Y., Sakai T., Sowa Y. The alkaloid emetine sensitizes ovarian carcinoma cells to cisplatin through down-regulation of bcl-xL. *Int J Oncol.* 2015; 46(1): 389–94. doi: 10.3892/ijo.2014.2703.
27. Sun Q., Fu Q., Li S., Li J., Liu S., Wang Z., Su Z., Song J., Lu D. Emetine exhibits anticancer activity in breast cancer cells as an antagonist of Wnt/ β -catenin signaling. *Oncol Rep.* 2019; 42(5): 1735–44. doi: 10.3892/or.2019.7290.
28. Meyuhas O. Ribosomal Protein S6 Phosphorylation: Four Decades of Research. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2015; 320: 41–73. doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.07.006.
29. Григорьева Д.Д., Жидкова Е.М., Лылова Е.С., Демина Д.В., Кирсанов К.И., Белицкий Г.А., Якубовская М.Г., Лесовая Е.А. Ингибирование глюкокортикоидиндуцированной экспрессии REDD1 рапамицином в клетках рака молочной железы. *Успехи молекулярной онкологии.* 2022; 9(1): 42–7. [Grigorieva D.D., Zhidkova E.M., Lylova E.S., Demina D.V., Kirsanov K.I., Belitsky G.A., Yakubovskaya M.G., Lesovaya E.A. Inhibition of glucocorticoid-induced expression of REDD1 by rapamycin in breast cancer cells. *Advances in Molecular Oncology.* 2022; 9(1): 42–7. (in Russian)].
30. Жидкова Е.М., Кузин К.А., Тилова Л.Р., Савинкова А.В., Борисова О.И., Лаврова М.Д., Максимова В.П., Кирсанов К.И., Якубовская М.Г., Лесовая Е.А. Сравнительный анализ биологических эффектов селективного агониста глюкокортикоидного рецептора cpda на клеточные линии рака молочной железы различных молекулярных подтипов. *Сибирский онкологический журнал.* 2017; 16(6): 41–46. [Zhidkova E.M., Kuzin K.A., Tilova L.R., Savinkova A.V., Borisova O.I., Lavrova M.D., Maximova V.P., Kirsanov K.I., Yakubovskaya M.G., Lesovaya E.A. Comparative analysis of biological effects of selective activator of the glucocorticoid receptor cpda on different subtypes of breast cancer cell lines. *Siberian Journal of Oncology.* 2017; 16(6): 41–46. (in Russian)]. doi: 10.21294/1814-4861-2017-16-6-41-46.
31. Kach J., Conzen S.D., Szmulewitz R.Z. Targeting the glucocorticoid receptor in breast and prostate cancers. *Sci Transl Med.* 2015; 7(305). doi: 10.1126/scitranslmed.aac7531.
32. Vilasco M., Communal L., Mourra N., Courtin A., Forgez P., Gompel A. Glucocorticoid receptor and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 130(1): 1–10. doi: 10.1007/s10549-011-1689-6.
33. Zhang C., Wenger T., Mattern J., Ilea S., Frey C., Gutwein P., Altevogt P., Bodenmüller W., Gassler N., Schnabel P.A., Dienemann H., Marmé A., Hohenfellner M., Haferkamp A., Pfizenmaier J., Gröne H.J., Kolb A., Büchler P., Büchler M., Friess H., Rittgen W., Edler L., Debatin K.M., Krammer P.H., Rutz H.P., Herr I. Clinical and mechanistic aspects of glucocorticoid-induced chemotherapy resistance in the majority of solid tumors. *Cancer Biol Ther.* 2007; 6(2): 278–87. doi: 10.4161/cbt.6.2.3652.
34. Mikosz C.A., Brickley D.R., Sharkey M.S., Moran T.W., Conzen S.D. Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, sgk-1. *J Biol Chem.* 2001; 276(20): 16649–54. doi: 10.1074/jbc.M010842200.
35. Obradović M.M.S., Hamelin B., Manevski N., Couto J.P., Sethi A., Coissieux M.M., Müntz S., Okamoto R., Kohler H., Schmidt A., Bentires-Alj M. Glucocorticoids promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2019; 567(7749): 540–4. doi: 10.1038/s41586-019-1019-4.

Поступила/Received 05.03.2022

Одобрена после рецензирования/Revised 03.06.2022

Принята к публикации/Accepted 15.06.2022

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Жидкова Екатерина Михайловна, младший научный сотрудник лаборатории механизмов химического канцерогенеза отдела химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия). E-mail: zhidkova_em@mail.ru. Author ID (Scopus): 57195322730. ORCID: 0000-0003-3318-9391.

Григорьева Диана Дмитриевна, младший научный сотрудник группы природных канцерогенов отдела химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия). Researcher ID (WOS): AGZ-9649-2022. ORCID: 0000-0003-2675-089X.

Лылова Евгения Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории механизмов химического канцерогенеза отдела химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия). Author ID (Scopus): 57202944330. ORCID: 0000-0001-6388-1624.

Максимова Варвара Павловна, младший научный сотрудник лаборатории канцерогенных веществ отдела химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия). Author ID (Scopus): 57195322203. Researcher ID (WOS): S-7580-2019. ORCID: 0000-0003-0896-2952.

Сагитова Гузель Рафилевна, студентка факультета Международная школа «Медицина будущего», ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (г. Москва, Россия). ORCID: 0000-0003-3940-0661.

Хайриева Гузель Ирековна, студентка факультета «Институт клинической медицины», ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (г. Москва, Россия). ORCID: 0000-0001-5545-1157.

Трапезникова Екатерина Сергеевна, студентка факультета Международная школа «Медицина будущего», ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (г. Москва, Россия). Researcher ID (WOS): AAW-1193-2021. ORCID: 0000-0003-1274-4667.

Кирсанов Кирилл Игоревич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией канцерогенных веществ отдела химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии

им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; ассистент кафедры общей врачебной практики, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (г. Москва, Россия). SPIN-код: 7329-7263. Researcher ID (WOS): L-3062-2015. ORCID: 0000-0002-8599-6833.

Якубовская Марианна Геннадиевна, доктор медицинских наук, заведующая отделом химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия). Researcher ID (WOS): R-6984-2016. ORCID: 0000-0002-9710-8178.

Лесовая Екатерина Андреевна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник группы природных канцерогенов отдела химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия); доцент кафедры онкологии, ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России (г. Рязань, Россия). Researcher ID (WOS): J-7790-2015. ORCID: 0000-0002-1967-9637.

ВКЛАД АВТОРОВ

Жидкова Екатерина Михайловна: культуральная работа, исследование пролиферации, работа над иллюстрациями, подготовка текста публикации.

Григорьева Диана Дмитриевна: проведение вестерн-блот анализа.

Лылова Евгения Сергеевна: проведение ПЦР-анализа.

Максимова Варвара Павловна: работа над иллюстрациями.

Сагитова Гузель Рафилевна: статистическая обработка результатов и корреляционный анализ кинетики пролиферации.

Хайриева Гузель Ирекловна: статистическая обработка результатов вестерн-блоттинга.

Трапезникова Екатерина Сергеевна: оценка кинетики пролиферации.

Кирсанов Кирилл Игоревич: статистическая обработка результатов и корреляционный анализ результатов ПЦР в реальном времени.

Якубовская Марианна Геннадиевна: анализ опубликованной литературы по теме исследования, подготовка текста публикации.

Лесовая Екатерина Андреевна: разработка дизайна и протоколов исследования, правка рукописи.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант РНФ 17-75-20124).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Ekaterina M. Zhidkova, Junior Researcher, Department of Chemical Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russia (Moscow, Russia). E-mail: zhidkova_em@mail.ru. Author ID (Scopus): 57195322730. ORCID: 0000-0003-3318-9391.

Diana D. Grigoreva, Junior Researcher, Department of Chemical Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russia (Moscow, Russia). Researcher ID (WOS): AGZ-9649-2022. ORCID: 0000-0003-2675-089X.

Evgeniya S. Lylova, Junior Researcher, Department of Chemical Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russia (Moscow, Russia). Author ID (Scopus): 57202944330. ORCID: 0000-0001-6388-1624.

Varvara P. Maksimova, Junior Researcher, Laboratory of Chemical Carcinogens, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russia (Moscow, Russia). Author ID (Scopus): 57195322203. Researcher ID (WOS): S-7580-2019. ORCID: 0000-0003-0896-2952.

Guzel R. Sagitova, Student, International School "Medicine of the Future", I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russia (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0003-3940-0661.

Guzel I. Khayrieva, Student, Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russia (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0001-5545-1157.

Ekaterina S. Trapeznikova, Student, International School "Medicine of the Future", I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russia (Moscow, Russia). Researcher ID (WOS): AAW-1193-2021. ORCID: 0000-0003-1274-4667.

Kirill I. Kirsanov, DSc, Head of Laboratory of Chemical Carcinogens, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russia; Assistant of the Department of General Medical Practice, RUDN University (Moscow, Russia). E-mail: kirsanov85@yandex.ru. Researcher ID (WOS): L-3062-2015. ORCID: 0000-0002-8599-6833.

Marianna G. Yakubovskaya, MD, DSc, Head of Department of Chemical Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russia (Moscow, Russia). Researcher ID (WOS): R-6984-2016. ORCID: 0000-0002-9710-8178.

Ekaterina A. Lesovaya, DSc, Senior Researcher, Department of Chemical Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russia (Moscow, Russia); Associate Professor, Department of Oncology, I.P. Pavlov Ryazan State Medical University of the Ministry of Health of the Russia (Ryazan, Russia). Researcher ID (WOS): J-7790-2015. ORCID: 0000-0002-1967-9637.

AUTHOR CONTRIBUTION

Ekaterina M. Zhidkova: experiments' performance, manuscript preparation and editing.
Diana D. Grigoreva: experiments' performance, manuscript preparation and editing.
Evgeniya S. Lylova: experiments' performance, manuscript preparation and editing.
Varvara P. Maksimova: design of figures, manuscript preparation and editing.
Guzel R. Sagitova: design of figures, manuscript preparation and editing.
Guzel I. Khayrieva: design of figures, manuscript preparation and editing.
Ekaterina S. Trapeznikova: experiments' performance, manuscript preparation and editing.
Kirill I. Kirsanov: manuscript preparation and editing.
Marianna G. Yakubovskaya: manuscript preparation and editing.
Ekaterina A. Lesovaya: manuscript preparation and editing.

Funding

Russian Science Foundation grant 17-75-20124.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest