

## ДИАЛОГ МЕЖДУ АУТОФАГИЕЙ И ЖЕЛЕЗОМ ПРИ ПРОГРЕССИИ МЕЛАНОМЫ

А.А. Вартамян, О.С. Бурова, Ю.А. Хоченкова, М.А. Барышникова

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

**Контакты:** Амалия Арташевна Вартамян zhivotov57@mail.ru

**Введение.** Аутофагия — катаболический процесс удаления отработанных органелл, долгоживущих белков и продуктов распада с помощью двухмембранных фагосом — в опухолевых клетках имеет патологически повышенную активность, и неэффективность химио- и радиотерапии во многом связывают с активацией аутофагии. Среди металлов, необходимых живому организму, железо занимает особое место. Стремительный рост злокачественной опухоли требует значительно большего расхода железа, нежели метаболизм нормальных клеток.

**Цель исследования** — выявление взаимосвязи между аутофагией и железом в прогрессии опухоли.

**Материалы и методы.** В работе были использованы 2D- и 3D-культивирование клеток меланомы с высокой экспрессией CD71 (mel P and mel Z) и с низкой экспрессией CD71 (mel Gus and mel Ibr), проточная цитофлуориметрия, флуоресцентная микроскопия.

**Результаты.** Захват железа опухолевой клеткой происходит посредством транслокации комплекса «трансферрин/CD71» в цитоплазму с последующей диссоциацией железа из комплекса. Хелатор железа в клетках меланомы с высокой экспрессией CD71 снижал базовый уровень аутофагии, в то время как донор железа повышал базовый уровень аутофагии. В присутствии донора железа клетки меланомы формировали в 3D-культуре сосудистоподобные структуры с многочисленными разрывами в сети. Хелатор железа сохранял способность клеток меланомы мигрировать и узнавать друг друга, формирование сосудистоподобных структур не наблюдалось. Аналогичная закономерность сохранялась и в клетках меланомы с низкой экспрессией CD71. В контрольных клетках меланомы экспрессия CD105 была значительно выше в клетках меланомы с высокой экспрессией CD71. В таких клетках хелатор железа повышал экспрессию CD105 на  $50 \pm 5\%$ , в клетках меланомы с низкой экспрессией CD71 хелатор железа повышал в 8 раз число клеток, экспрессирующих CD105. Донор железа также повышал экспрессию CD105 на  $35 \pm 4\%$  в клетках меланомы с высокой экспрессией CD71. В клетках меланомы с низкой экспрессией CD71 донор железа снижал экспрессию CD105 на  $300 \pm 3\%$ .

**Заключение.** Активация аутофагии способствует выживанию опухолевых клеток при генотоксическом стрессе, запуская ряд метаболически важных функций клетки с участием железа.

**Ключевые слова:** аутофагия, железо, меланома, CD71, CD105

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-29-35

### CROSSTALK BETWEEN AUTOPHAGY AND IRON IN MELANOMA PROGRESSION

A.A. Vartanian, O.S. Burova, Yu.A. Khochenkova, M.A. Baryshnikova

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;

24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

**Introduction.** Autophagy, a catabolic process of protein and organelle recycling by transferring defective cytoplasm and organelles into double-membraned vesicles to degrade and regenerate materials, plays a critical role in maintaining energy homeostasis. Inefficiency chemo- and radiotherapy is largely associated with the activation of autophagy. Among the metals needed by the living organism, iron occupies a special place. The rapid growth of malignant tumors requires much more iron than the metabolism of normal cells.

**Objective.** To elucidate the relationship between autophagy and iron in melanoma progression.

**Materials and methods.** In this study we used 2D- and 3D-culturing of melanoma cells with high expression of CD71 (mel P and mel Z) and low expression of CD71 (mel Gus and mel Ibr), flow cytometry and fluorescence microscopy.

**Results.** The uptake of iron in cancer cells occurs through translocation of the complex of transferrin/receptor (CD71) in the cytoplasm with subsequent dissociation of iron from the complex. Chelation of iron by deferoxamine in melanoma cells mel P and mel Z reduced the level of autophagy about 2-fold. In the presence of an iron donor ferrum ammonium citrate the level of autophagy increased 2.5-fold. The same correlation was observed in melanoma cells with low expression of CD71. Chelation of iron in melanoma cells with high CD71 expression blocked the formation of capillary-like structures. In the presence of an iron donor the formation of capillary-like structures was also not observed. The same correlation was observed in melanoma cells with low expression of CD71. There was an increase in CD105 expression about  $50 \pm 5\%$  and  $800 \pm 50\%$  under the condition of iron chelation in melanoma cells with high and low expression of CD71, respectively. Quite unexpectedly, iron donor also increased expression of CD105 about  $35 \pm 4\%$  and  $300 \pm 3\%$  in melanoma cells with high and low expression of CD71, respectively.

**Conclusions.** The activation of autophagy promotes the survival of tumor cells by triggering a number of metabolic functions with the participation of iron.

**Key words:** autophagy, iron, melanoma, CD71, CD105

## Введение

Аутофагия — древнейший механизм регуляции клеточного гомеостаза. Посредством аутофагии клетка избавляется от поврежденных органелл и долгоживущих белков, регулируя состав цитозоля и размеры эндоплазматической сети. Благодаря аутофагии становятся возможны расщепление собственных макромолекул и повторное их использование для поддержания нормальной жизнедеятельности клетки [1]. Непрерывно работающая система аутофагии поддерживает также концентрацию токсичных метаболитов клетки на безопасном уровне [2]. Аутофагия — процесс избирательный и строго регулируемый. Нарушенная регуляция или сниженная активность аутофагии приводят к неизбежным ошибкам, последствиями которых могут быть самые разнообразные патологии — от злокачественных заболеваний до нейродегенеративных расстройств [3]. При злокачественных заболеваниях на ранних стадиях опухолевой трансформации клетки активация аутофагии проявляет противоопухолевый эффект, способствуя развитию защитного механизма. На поздних стадиях заболевания, при гипоксии, лучевой терапии или действии цитотоксических противоопухолевых препаратов аутофагия используется опухолевой клеткой как механизм выживания и может стать причиной лекарственной устойчивости и быстрой прогрессии опухоли [4]. Результаты, полученные в нашей лаборатории, позволили идентифицировать ранее не описанную в литературе функцию аутофагии — участие в сигнальных путях, вовлекающихся в формирование сети васкулярных каналов опухолевыми клетками, васкулогенной мимикрии (ВМ), которая может частично компенсировать недостаточно быстрое развитие в опухоли кровеносной микроциркуляторной сети [5–7].

Стремительный рост злокачественной опухоли требует значительно большего расхода железа, нежели метаболизм нормальных клеток. У онкологических больных дефицит железа обнаруживается постоянно. Опухолевые клетки активно «изымают» из крови трансферрин (Tf), переносчик железа [8]. CD71 — рецептор трансферрина, практически единственный белок, участвующий в транспорте железа в клетку. Взаимодействие комплекса железо—трансферрин с рецептором приводит к интернализации комплекса CD71/Tf/Fe<sup>3+</sup> в клетку. В клетке железо диссоциирует из комплекса, а рецептор и трансферрин независимо возвращаются на поверхность клетки. Захват

железа тем значительнее, чем больше масса самой опухоли и чем более она злокачественна. Одной из причин такого активного поглощения железа опухолевыми клетками может стать необходимость этого металла как кофактора рибонуклеотид редуктазы, фермента, конвертирующего рибонуклеотид трифосфаты в дезоксирибонуклеотид трифосфаты, необходимые для биосинтеза дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) [9]. Железо является также активной частью дыхательных ферментов (при его недостатке ткани не могут усваивать кислород [10]) и участвует в генерации аденозинтрифосфата — источника биологической энергии в живых организмах [11]. Реалистичным выглядит сценарий, согласно которому одной из основных причин смертности от рака являются расстройства, вызванные нарушением обмена железа в организме [12].

**Целью** нашей работы стало получение экспериментального подтверждения существования взаимосвязи между аутофагией и железом при меланоме.

## Материалы

Цитрат железа (II) аммония (FAC) (#F5879), дефероксамин мезилат (DFO) (#D9533) и монодансилкадаверин (monodansylcadaverine, MDC #D4008) были приобретены у Sigma-Aldrich Corporation (США). Антитела к CD105 FITC- или PE-конъюгированные были получены от Miltenui Biotec (Германия) и антитела к CD71 FITC-конъюгированные были получены от NOVUS Biological, LLC (США).

## Методы

### Культура клеток

В работе использованы клеточные линии меланомы mel Z, mel P, mel Gus и mel Ibr, выведенные из опухолевого материала пациентов, находившихся на лечении в НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [13]. Клетки культивировали в полной среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 2 ммоль/мл глутамина и 0,1 мг/мл гентамицина. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 2–3 дня. Жизнеспособность клеток определяли методом МТТ. В экспериментах использовали клетки 70–75 % конфлюентности.

### 3D-культура

На дно 24-луночного планшета на льду быстро наносили 100 мкл матригеля (8,7 мг/мл), планшет

оставляли при комнатной температуре на 1 ч и затем помещали в CO<sub>2</sub> инкубатор на 30 мин. Клетки с нецитотоксическими концентрациями донора или хелатора железа добавляли в количестве  $2 \times 10^5$  в полной среде RPMI-1640 на гелевую матрицу и продолжали инкубировать при 37 °C в CO<sub>2</sub> инкубаторе. Формирование сосудистоподобных структур (СПС) наблюдалось через 14–16 ч роста клеток на матрикеле.

### **Окрашивание клеток MDC**

Клетки меланомы в течение ночи инкубировали с донором (FAC) или хелатором железа (DFO). Утром среду замещали свежей и добавляли 0,05 ммоль MDC в RPMI-1640 без сыворотки, инкубировали 20–30 мин при 37 °C в CO<sub>2</sub> инкубаторе. Далее клетки 3 раза промывали ледяным натрий-фосфатным буфером и немедленно определяли флуоресценцию на флуоресцентном микроскопе IN Cell Analyzer (GE Healthcare, США).

### **Определение экспрессии CD105 и CD71**

Фенотипирование антигенов клеточной поверхности проводили в реакции прямой иммунофлуоресценции.  $1 \times 10^5$  клеток трижды промывали PBS pH = 7,5 и ресуспендировали в PBS. В каждую пробирку с клетками добавляли моноклональные антитела, меченные FITC или PE, и инкубировали в течение 30 мин при +4 °C. Клетки дважды промывали PBS от несвязавшихся антител и ресуспендировали в 200 мкл PBS, содержащем 1 % формалин. Экспрессию антигенов CD105 и CD71 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 светорассеивания и размера клеток.

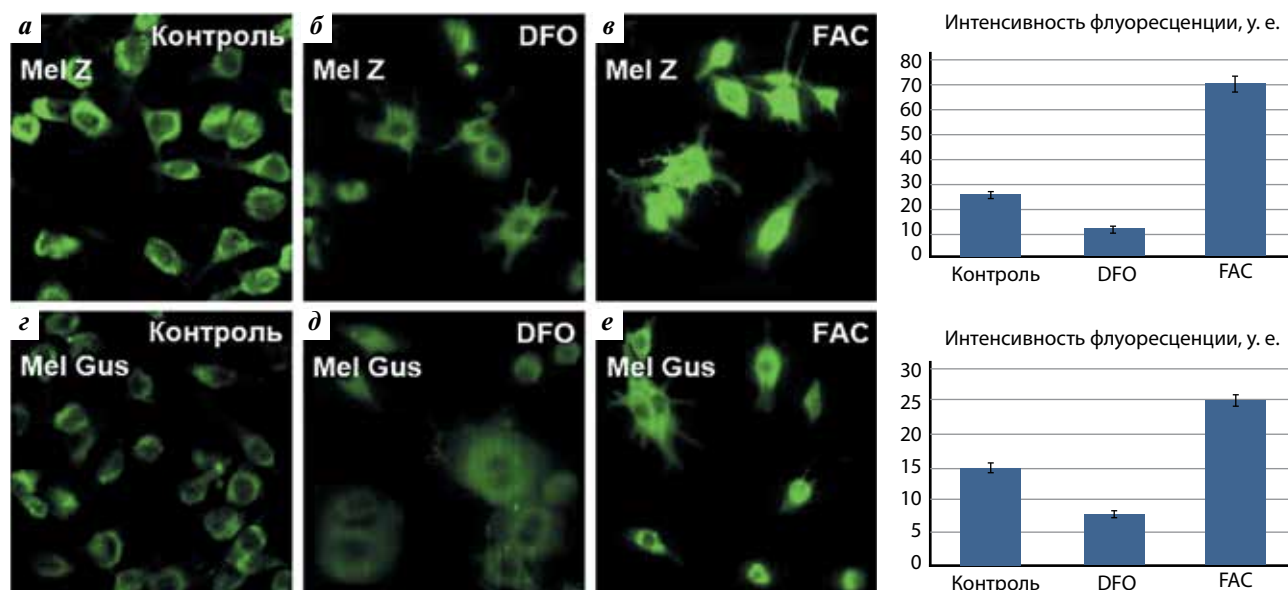
### **Результаты и обсуждение**

В работе были использованы клеточные линии меланомы кожи mel P и mel Z с высокой экспрессией CD71, а также mel Ibr и mel Gus с низкой экспрессией CD71.

Об уровне аутофагии в клетках меланомы судили по изменениям, происходящим в необратимой стадии аутофагии. Активация аутофагии сопровождается протеолитическим расщеплением белка LC-3 (Atg8) в изоформу LC-3A. Его конъюгация с фосфатидилэтаноламином приводит к образованию LC-3B формы, которая и встраивается в мембрану аутофагосомы. В процессе сборки аутофагосомы участвует только LC-3B изоформа белка. Недавно был предложен другой метод для мониторинга аутофагии — окрашивание аутофагосом флуоресцентным красителем монодансилкадаверином (MDC). Избирательное аккумулялирование MDC в аутофагосомах посредст-

вом специфического взаимодействия с липидами мембран аутофагосом свидетельствует о переходе аутофагии в необратимую фазу. Ранее нами было показано, что экспрессия LC-3B в клетках меланомы, определенная методом иммунофлуоресценции на проточном цитофлуориметре, строго коррелирует с флуоресценцией MDC [5]. И потому в этом исследовании за базовым уровнем аутофагии мы следили по флуоресценции MDC. В предварительных исследованиях были подобраны концентрации донора железа, FAC и хелатора железа, DFO, не индуцирующие гибель клеток. На рис. 1 представлены результаты, свидетельствующие о влиянии нецитотоксических концентраций донора железа (100 мкг/мл) и хелатора железа (100 мкМ) на базовый уровень аутофагии в клетках меланомы, использованных в данном исследовании. Базовый уровень аутофагии в клеточных линиях mel P и mel Z с высокой экспрессией CD71 ( $50 \pm 3$  и  $64 \pm 3$  % соответственно) был значительно выше, чем в клеточных линиях mel Gus и mel Ibr с низкой экспрессией CD71 ( $2,8 \pm 0,05$  и  $5,3 \pm 1$  % соответственно). Поскольку высококачественный фенотип коррелирует с высоким уровнем аутофагии в клетках меланомы [5], полученные нами результаты позволяют предположить, что ионы железа вовлекаются в процессы, поддерживающие агрессивность клеток меланомы. Подтвердить это нам удалось исследованием вклада донора и хелатора железа в базовый уровень аутофагии. Донор железа в клетках меланомы с высокой экспрессией CD71 mel P и mel Z повышал базовый уровень аутофагии в 2,5 раза, а хелатор железа понижал его в 2 раза (рис. 1а–в). Аналогичная закономерность наблюдалась и на 2 других клеточных линиях меланомы Mel Gus и Mel Ibr с низкой экспрессией CD71 (рис. 1г–е). Полученные нами данные о снижении базового уровня аутофагии хелатором железа в клетках меланомы как с высокой, так и с низкой экспрессией CD71 указывают на то, что железо является необходимым компонентом поддержания высокоагрессивного фенотипа клеток меланомы. Подтверждением нашей гипотезы послужили опубликованные недавно данные о том, что в экспериментальной модели рака легкого на C57/Black-мышьях рост опухоли заметно снижался в ответ на бевацизумаб у мышей с низким содержанием сывороточного железа [14]. Низкий уровень железа в крови C57/Black-мышей поддерживали железодефицитной диетой.

По данным иммуногистохимического анализа, низкая экспрессия CD71 на опухолевых клетках коррелирует с меньшей частотой выявления метастазов и более высокой общей и безрецидивной выживаемостью больных [15]. Для выяснения роли железа в прогрессии меланомы, в частности при переходе опухоли в фазу более агрессивного роста,



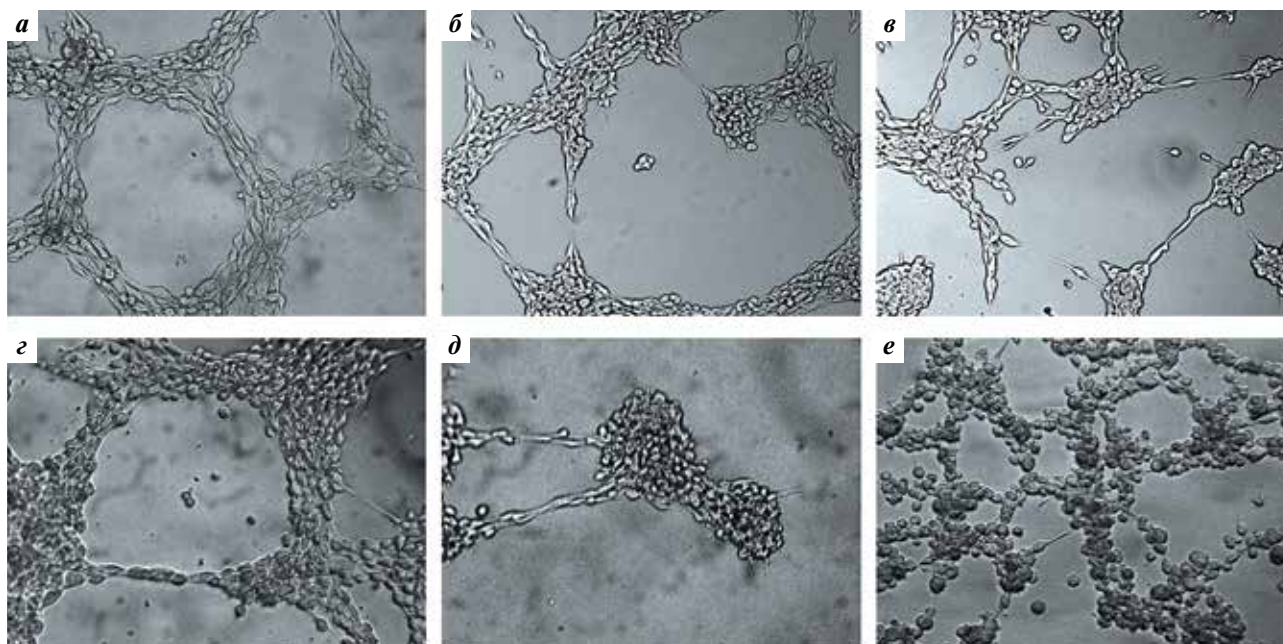
**Рис. 1.** Влияние хелатора железа, DFO, 100 мкМ (а, б, д), и донора железа FAC, 100 мкг/мл (в, е), на базовый уровень аутофагии в клетках меланомы с высокой экспрессией CD71 — mel Z и с низкой экспрессией CD71 — mel Gus. Контроль — а, г. Базовый уровень аутофагии определяли интенсивностью флуоресценции красителя MDC  $\times 20$ . Представленные данные отражают результаты 3 независимых экспериментов

нами была использована способность клеток меланомы формировать васкулярную сеть в опухоли. На сегодняшний день получены убедительные доказательства, подтверждающие, что васкулярные каналы формируют опухолевые клетки с высоко злокачественным фенотипом, слабоагрессивные опухолевые клетки таких структур не образуют [16]. В качестве *in vitro* теста ВМ используется формирование СПС в 3D-культуре, на гелевой матрице. Поведение клеток меланомы с высокой экспрессией CD71 и низкой экспрессией CD71 в 3D-культуре заметно отличалось. Mel P- и mel Z-клетки формировали СПС к 5–6 ч роста на матриксе, и эти структуры были стабильны в течение 20–24 ч. Mel Gus и mel Ibr формировали СПС к 3–4 ч роста на матриксе, к 6–7 ч роста клеток на матриксе наблюдался спонтанный распад СПС. По всей видимости, концентрация железа в среде (3 мкМ) при культивировании клеток полностью покрывает необходимость этого металла для пролиферации опухолевых клеток с низкой экспрессией CD71, но не обеспечивает достаточного поступления железа в клетку, необходимого для поддержания стабильности СПС. Донор железа изменял геометрию СПС, сформированных клетками меланомы с высокой экспрессией CD71 mel Z (рис. 2а, б). Когда mel Z росли в присутствии хелатора железа, клетки ненормально вытягивались, формирование СПС в 3D-культуре не наблюдалось (рис. 2в). Представленные результаты были воспроизведены на другой клеточной линии меланомы, активно экспрессирующей CD71, — mel P (данные не приводятся) и подтвердили выявленную закономерность: хелатор же-

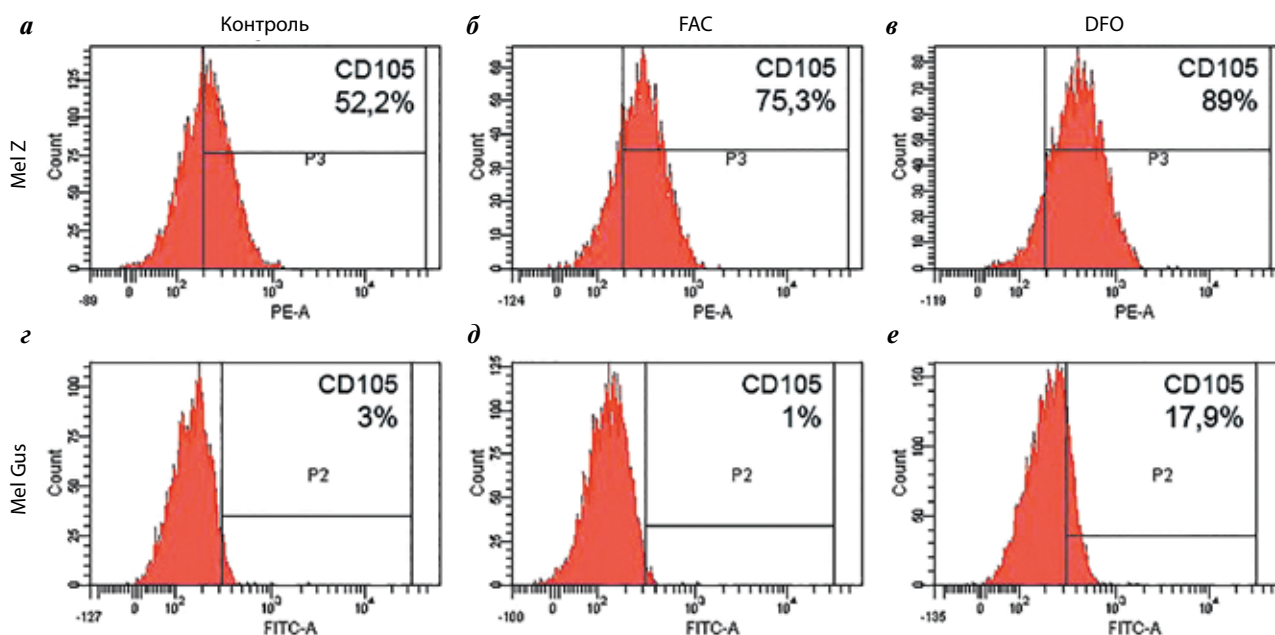
леза и в несколько меньшей степени донор железа блокируют формирование СПС. Клетки меланомы с низкой экспрессией CD71 mel Gus и mel Ibr в присутствии хелатора железа полностью теряли способность к коммуникации, необходимую для формирования СПС. Донор железа не восстанавливал способность этих клеток формировать СПС (рис. 2г–е). Формирование СПС в 3D-культуре происходит путем последовательных событий. Клетки останавливают пролиферацию, мигрируют, узнают друг друга, формируя контакты посредством VE-кадгерина, удлиняются, прикрепляются к внеклеточному матриксу и формируют СПС. Нами и другими исследователями было показано, что становление ВМ зависит от  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительной перестройки актинового цитоскелета, включая как изменение формы клетки, так и создание адгезивных сайтов, необходимых для подвижности клетки, ее удлинения и формирования контактов между клеткой и внеклеточным матриксом [16, 17]. По всей видимости, дефицит железа отражается на доступности  $\text{Ca}^{2+}$ , необходимой для реорганизации актина и формирования васкулярной сети опухолевыми клетками. Полученные нами данные о блокировании формирования СПС хелатированием железа открывают новые возможности ингибирования кровоснабжения опухоли.

Было также изучено влияние железа на экспрессию эндоглина (CD105). CD105 является белком-рецептором суперсемейства TGF- $\beta$ , регулирующим процессы ангиогенеза, независимые от VEGF. CD105 с высокой плотностью экспрессирован на эндотелии сосудов растущих опухолей и служит ключевым





**Рис. 2.** Влияние донора железа FAC, 100 мкг/мл (а, б), и хелатора железа DFO, 100 мкМ (а, в), на формирование сосудистоподобных структур на матриксе клетками меланомы mel Z и mel Gus (г, д) и (г, е),  $\times 20$



**Рис. 3.** Влияние донора железа FAC, 100 мкг/мл (а, б и г, д), и хелатора железа DFO, 100 мкМ (а, в и г, е), на уровень экспрессии CD105 в клетках меланомы mel Z и mel Gus. Экспрессию CD105 определяли проточной цитофлуориметрией с использованием антител к CD105. В каждой пробе анализировали до 10 тыс. событий. Анализируемый гейт устанавливали на основании комбинации светорассеивания и размера клеток. Представленные данные отражают результаты 3 независимых экспериментов

элементом механизмов, определяющих состояния покоя или активации клеток эндотелия [18]. Наряду с эндотелием CD105 присутствует на мембранах клеток стромы опухолей и самих опухолевых клеток [19]. Было показано, что высокая экспрессия CD105 на клетках меланомы коррелирует с агрессивностью новообразований и неблагоприятным прогнозом [20].

Экспрессия CD105 была значительно выше в клетках меланомы с высокой экспрессией CD71, чем в клетках с низкой экспрессией CD71. В этих клетках хелатор железа повышал экспрессию CD105 на  $50 \pm 4$  % (рис. 3а, б). В клетках меланомы с низкой экспрессией CD71 хелатор железа активировал экспрессию CD105, в 8 раз увеличивалось число клеток

с экспрессией CD105. Следует отметить, что высокая экспрессия CD105 характерна для клеток меланомы, метастазирующих в мозг [20]. Несколько неожиданным оказалось поведение клеток меланомы в присутствии донора железа. Донор железа в клетках меланомы с низкой экспрессией CD71 снижал экспрессию CD105 на  $300 \pm 20$  %, в клетках же меланомы с высокой экспрессией CD71 наблюдалось повышение экспрессии CD105 на  $60 \pm 2$  %. Мы предполагаем, что дефицит железа в клетках меланомы активирует ряд сигнальных путей, под контролем которых находится экспрессия CD105.

### Заключение

В последние годы с развитием молекулярно-биологических технологий понимание метаболизма железа значительно расширилось. Выяснилось, что опухолевые клетки репрограммируют метаболизм железа, активируя экспрессию рецептора трансферрина (CD71) и подавляя экспрессию ферритина, депонирующего железо в клетке. С другой стороны, одной из составляющих лекарственной резистентности является активация аутофагии. Для выяснения взаимосвязи между аутофагией и железом в прогрес-

сии меланомы мы использовали 2 типа клеток меланомы — с высокой и низкой экспрессией CD71. Мы показали:

- что высокая экспрессия CD71 коррелирует с высоким базовым уровнем аутофагии;
- хелатирование железа изменяет цитоскелет клетки;
- дефицит железа в клетках меланомы сопровождается повышением экспрессии CD105.

Полученные нами результаты согласуются с результатами ранее опубликованных работ о роли железа в метаболизме опухолевых клеток. Было показано, что использование терапевтических антител к CD71 или конъюгатов трансферрина, которые связывались с CD71 и интернализировались в клетку, способствовало повышению эффективности цитотоксической химиотерапии [21]. Другим подтверждением полученных нами результатов являются данные о том, что захват железа посредством комплекса CD71/трансферрин был заметно повышен у стволовых клеток глиобластомы по сравнению с нестволовыми клетками [22]. Все это подводит нас к идее, что железо, по всей видимости, может стать еще одной мишенью для терапии злокачественных заболеваний.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Mizushima N., Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 2011;147(4):728–41. DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.026. PMID: 22078875.
2. Rabinowitz J.D., White E. Autophagy and metabolism. *Science* 2010;330(6009):1344–8. DOI: 10.1126/science.1193497. PMID: 21127245.
3. Menzies F.M., Fleming A., Rubinsztein D.C. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2015;16(6):345–57. DOI: 10.1038/nrn3961. PMID: 25991442.
4. Sun K., Deng W., Zhang S. et al. Paradoxical roles of autophagy in different stages of tumorigenesis: protector for normal or cancer cells. *Cell Biosci* 2013;3(1):35–42. DOI: 10.1186/2045-3701-3-35. PMID: 24016776.
5. Вартанян А.А., Бурова О.С., Уласов И.В., Барышникова М.А. Вовлечение аутофагии в васкулогенную мимикрию при меланоме. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(2):66–73. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-66-73. [Vartanian A.A., Burova O.S., Ulasov I.S., Baryshnikova M.A. The involvement of autophagy in melanoma vasculogenic mimicry. *Rossiysky Bioterpevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(2):66–73. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-66-73. (In Russ.)].
6. Вартанян А.А., Барышникова М.А., Бурова О.С. и др. Блокатор васкулогенной мимикрии восстанавливает чувствительность резистентных клеток меланомы к ДНК-повреждающим агентам // *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(1):19–20. [Vartanian A.A., Baryshnikova M.A., Burova O.S. et al. Inhibitor of vasculogenic mimicry recovers the sensitivity of drug-resistant melanoma cells to DNA-damaging agents. *Rossiysky Bioterpevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(1):19–20. (In Russ.)].
7. Вартанян А.А., Хоченков Д.А., Бурова О.С. Взаимосвязь между аутофагией и железом в васкулогенной мимикрии // *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(спецвыпуск):15. [Vartanian A.A., Khochenkov D.A., Burova O.S. Interaction between autophagy and iron in vasculogenic mimicry *Rossiysky Bioterpevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(Special Issue):15. (In Russ.)].
8. Reichert C.O., da Cunha J., Levy D. et al. Hepcidin: Homeostasis and Diseases Related to Iron Metabolism. *Acta Haematol* 2017;137(4):220–36. DOI: 10.1159/000471838. PMID: 28514781.
9. Zhang D.L., Ghosh M.C., Rouault T.A. The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis — an update. *Front Pharmacol* 2014;5:124–9. PMID: 24982634.
10. Munoz M., Villar I., Garcia-Erce J.A. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol* 2009;15:4617–4626. PMID: 19787824.
11. Kleingardner J.G., Bren K.L. Biological significance and applications of heme proteins and peptides. *Acc Chem Res* 2015;48(7):1845–52. DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00106. PMID: 26083801.
12. Вартанян А.А. Метаболизм железа, ферроптоз, рак // *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(3):14–20. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-14-20 [Vartanian A.A. Iron metabolism, ferroptosis and cancer. *Rossiysky Bioterpevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(3):14–20.

- DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-14-20. (In Russ.)].
13. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы как основа для создания противоопухолевых вакцин. Вестник Российской академии медицинских наук 2005;7:37–40. [Mikhailova I.N., Lukashina M.I., Baryshnikov A.Yu. et al. Melanoma cell lines as the basis for antitumor vaccine preparation. Vestnik Rossiyskoy Akademii Meditsinskih Nauk = Bulletin of Russian Academy of Medical Sciences 2005;7:37–40. (In Russ.)]. 2005;7:37–40.
  14. Khiroya H., Turner A.M. The role of iron in pulmonary pathology. Multidiscip Respir Med 2015;10:34. DOI: 10.1186/s40248-015-0031-2. PMID: 26629341.
  15. Calzolari A., Oliviero I., Deaglio S. et al. Transferrin receptor is frequently expressed in human cancer. Blood Cells Mol Dis 2007;39(1):82–91. PMID: 17428703.
  16. Hendrix M.J., Seftor E.A., Seftor R.E. et al. Tumor vasculogenic mimicry: Novel targeting opportunity in melanoma. Pharmacol Ther 2016;159:83–92. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.01.006. PMID: 26808163.
  17. Vartanian A., Stepanova E., Grigorieva I. et al. Melanoma Vasculogenic Mimicry Capillary-Like Structure Formation Depends on Integrin and Calcium Signaling. Microcirculation 2011;18(5):390–9. DOI: 10.1111/j.1549-8719.2011.00102.
  18. Dallas N.A., Samuel S., Xia L. et al. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. Clin Cancer Res 2008;14(7):1931–7. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4478. PMID: 18381930.
  19. Altomonte M., Montagner R., Fonsatti E. et al. Expression and structural features of endoglin (CD105), a transforming growth factor beta1 and beta3 binding protein, in human melanoma. Br J Cancer 1996;74(10):1586–91. PMID: 8932339.
  20. Salgado K.B., Toscani N.V., Silva L.L. et al. Immunoeexpression of endoglin in brain metastasis secondary to malignant melanoma Clin Exp Metastasis 2007;24(6):403–10. DOI: 10.1007/s10585-007-9077-7. PMID: 17564791.
  21. Daniels-Wells T.R., Penichet M.L. Transferrin receptor 1: a target for antibody-mediated cancer therapy. Immunotherapy 2016;8(9):991–4. DOI: 10.2217/imt-20160-0050. PMID: 27373880.
  22. Schonberg D.L., Miller T.E., Wu Q. et al. Preferential Iron Trafficking Characterizes Glioblastoma Stem-like Cells. Cancer Cell 2015;28:441–55. PMID: 26461092.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

А.А. Вартанян / A.A. Vartanyan: <https://orcid.org/0000-0001-9342-5523>

О.С. Бурова / O.S. Burova: <https://orcid.org/0000-0001-8897-0172>

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.