



Производное 3-гидроксихиназолина, аналог эрастина, индуцирует ферроптоз в метастатических клетках меланомы

Л.М. Борисова, В.Н. Осипов, Д.В. Гусев, И.С. Голубева, М.П. Киселева, А.А. Варганян

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

Контакты: Лариса Михайловна Борисова larib@inbox.ru

Введение. Резистентность к терапии является основной причиной клинического прогрессирования злокачественной опухоли на фоне лечения. Реактивировать апоптоз в резистентных клетках практически нереально, опухоль переходит в необратимую фазу роста. Опубликованные недавно данные о способности производных хиназолина, индукторов ферроптоза, вызывать гибель резистентных клеток открывают новые возможности для повышения эффективности противоопухолевой терапии.

Цель исследования – изучение индукции ферроптоза синтезированным аналогом эрастина OVN-002 в клетках меланомы Mel Z и оценка его противоопухолевой активности на перевиваемой меланоме B-16 мышей.

Материалы и методы. В экспериментах *in vitro* использованы 2D-культивирование метастатических клеток меланомы Mel Z, фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопия. Исследования *in vivo* проведены на модели экспериментального роста меланомы B-16 у самок гибридов иммунокомпетентных мышей F1 (C57Bl/6 × DBA/2). Противоопухолевый эффект оценивали по торможению роста опухоли (ТРО, %) и увеличению продолжительности жизни леченых животных по сравнению с животными контрольной группы.

Результаты. Гибель опухолевых клеток при воздействии OVN-002 и эрастина в концентрациях 10,0 мкМ происходила по механизму ферроптоза. Цитотоксическая активность OVN-002 была сравнима с активностью эрастина на клетках метастатической меланомы Mel Z: 744 ± 20 и 719 ± 20 у. е. соответственно. В экспериментах *in vivo* на меланоме B-16 в дозе 50 мг/кг OVN-002 оказал противоопухолевый эффект с ТРО 81–57 % ($p < 0,05$) до 7-го дня наблюдения, тогда как для эрастина отмечали только непосредственный эффект (ТРО 65 %, $p < 0,05$).

Заключение. Полученные данные позволяют предположить, что соединение OVN-002 может стать потенциальным противоопухолевым агентом для лечения меланомы.

Ключевые слова: производное хиназолина, ферроптоз, меланома, противоопухолевая активность

Для цитирования: Борисова Л.М., Осипов В.Н., Гусев Д.В. и др. Производное 3-гидроксихиназолина, аналог эрастина, индуцирует ферроптоз в метастатических клетках меланомы. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(1):67–73.

3-Hydroxyquinazoline derivative, an analogue of erastin, induces ferroptosis in metastatic melanoma cells

Larisa M. Borisova, Vasily N. Osipov, Dmitriy V. Gusev, Irina S. Golubeva, Marina P. Kiseleva, Amalia A. Vartanian

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

Contacts: Larisa Mikhailovna Borisova larib@inbox.ru

Introduction. The main cause of clinical progression of tumor under the conditions of treatment is the resistance. Reactivate apoptosis in resistant to chemotherapy cells is impossible, the tumor grows into an irreversible growth phase. Recently published data on the ability of ferroptosis inducers to induce the death of resistant cells opens up new possibilities for improving the effectiveness of antitumor therapy.

The purpose of the study – assessment of the mechanism of ferroptosis induction of the synthesized analogue of erastin OVN-002 on Mel Z melanoma cells and investigation of its antitumor activity on transplanted B-16 melanoma of mice.

Materials and methods. In this study 2D cultivation of metastatic Mel Z melanoma cells, phase-contrast and fluorescence microscopy, and a model of experimental growth of B-16 melanoma in female hybrids of immunocompetent mice F1 (C57Bl/6 × DBA/2) were used. The antitumor effect was evaluated by measurement of tumor growth inhibition (TGI, %) and increase of life span of the treated animals as compared to the control ones.

Results. The cytotoxic activity of OVN-002 was equal to the activity of erastin on metastatic melanoma cells Mel Z: 744 ± 20 and 719 ± 20 a. u., respectively. OVN-002 at a dose 50 mg/kg reduced the growth of experimental melanoma B-16 about 81 % (TGI 81–57 %, $p < 0.05$). The effect was stable up to 7th day, while erastin showed only a direct antitumor effect (TGI 65 %, $p < 0.05$).

Conclusion. The data obtained suggest that OVN-002 might be considered as a novel antitumor agent.

Key words: quinazoline derivative, ferroptosis, melanoma, antitumor activity

For citation: Borisova L.M., Osipov V.N., Gusev D.V. et al. 3-Hydroxyquinazoline derivative, an analogue of erastin, induces ferroptosis in metastatic melanoma cells. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(1):67–73. (In Russ.).

Введение

Современная противоопухолевая терапия базируется в основном на индукции апоптоза в опухолевых клетках. Несмотря на существенное улучшение результатов химиотерапии, достигнутое в последние годы, в большинстве случаев лечение сопровождается развитием лекарственной резистентности [1]. Дальнейшее улучшение результатов лечения будет связано с преодолением репрессии апоптоза в опухолевых клетках. Обнаруженный недавно новый тип программируемой гибели клетки, ферроптоз, позволяет надеяться на продление ремиссии онкологических больных. Ферроптоз – железозависимая гибель клетки, при которой накапливаются продукты перекисного окисления фосфолипидов, основного компонента всех клеточных мембран. Окисление происходит при обязательном участии ионов железа. Избыток ионов железа Fe^{2+} , находящихся в несвязанном с ферритином или ферропортином состоянии, запускает реакцию Фентона, генерируются гидроксил-радикалы, окисляющие фосфолипиды клеточных мембран [2–4]. Противостоит массивному окислению липидов антиоксидантная система защиты клетки. Основные компоненты антиоксидантной системы клетки составляют глутатионпероксидаза (GPX4), которая восстанавливает потенциально опасные гидроперекиси липидов в нетоксичные спирты (дефицит GPX4 несовместим с жизнью), и глутатион, субстрат GPX4. Глутатион – трипептид, состоящий из глутамина, глицина и цистеина. Истощение запасов глутатиона усиливает перекисное окисление липидов и убивает клетку. Индукторы ферроптоза делят на ингибиторы GPX4 и соединения, блокирующие транспорт цистеина в клетку, в том числе такие как эрастин и его аналоги [5–8].

Следует отметить, что ферроптоз обнаружили в процессе поиска противоопухолевых соединений.

Исследователи из группы Stockwell, занимаясь скринингом соединений, направленных на индукцию гибели опухолевых клеток с мутацией в *RAS*-онкогене, обнаружили соединение эрастин, производное хиназолина, которое вызывало массовую гибель опухолевых клеток. При комбинировании эрастина с хелаторами железа стало ясно, что необычная гибель, обнаруженная ими, это железозависимая гибель клетки. Эти исследователи и ввели в 2012 г. термин «ферроптоз» [9].

В работе представлены результаты исследований влияния синтезированного аналога эрастина – бензил 2-((2-(3,5-диметил-1*H*-пиразол-1-ил)-4-оксохинолин-3(4*H*)-ил)окси)ацетата (OVN-002) – на индукцию ферроптоза в метастатических клетках меланомы Mel Z и клетках перевиваемой меланомы B-16.

Целью настоящего исследования является изучение индукции гибели клетки по типу ферроптоза синтезированным аналогом эрастина OVN-002 в клетках меланомы Mel Z и оценка его противоопухолевой активности на перевиваемой меланоме B-16 мышей.

Материалы и методы

Культивирование клеток

В работе были использованы клетки меланомы Mel Z, полученной из опухолевого материала пациента с диссеминированной меланомой, проходившего лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [10].

Клетки меланомы Mel Z культивировали в полной среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (HI-CLONE), 2 ммоль/мл глутамина и 0,1 мг/мл гентамицина (приобретены у «ПанЭко», Россия). В экспериментах использовали клетки 70–75 % конфлюентности.

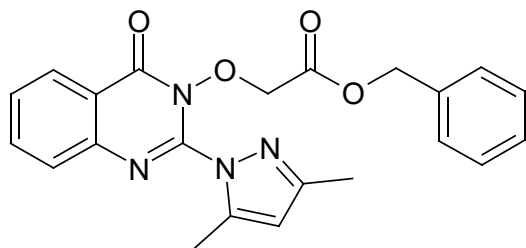


Рис. 1. Структурная формула OVN-002

Fig. 1. Structural formula OVN-002

Синтез бензил 2-((2-(3,5-диметил-1H-пиразол-1-ил)-4-оксохиназолин-3(4H)-ил)окси)-ацетата (OVN-002) (рис. 1)

К раствору 256 мг (1,0 ммоль) 3-гидрокси-2-(3,5-диметил-1H-пиразол-1-ил)хиназолин-4(3H)-она в 5 мл диметилсульфоксида (ДМСО) («ПанЭко», Россия) добавляли 138 мг (1,0 ммоль) мелкоизмельченного карбоната калия и по каплям вносили 185 мг (1,1 ммоль) бензилового эфира хлоруксусной кислоты. Перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч, выливали в 15 мл холодной воды, отфильтровывали осадок, промывали на фильтре 2 раза по 10 мл воды и затем 10 мл гексана. Сушили на воздухе. Выход составлял 347 мг (86 %) белых кристаллов. Т.пл. 121–123 °С. Спектр ^1H ЯМР (360 МГц, ДМСО- d_6 , δ м.д.) 8,20 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 7,88 (т, $J = 8,4$ Гц, 1H), 7,79 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H), 7,61 (т, $J = 8,4$ Гц, 1H), 7,34–7,39 (м, 5H), 6,12 (с, 1H), 6,12 (с, 1H), 5,22 (с, 2H), 5,15 (с, 2H), 2,44 (с, 3H), 2,10 (с, 3H).

Исследование влияния OVN-002 на индукцию ферроптоза *in vitro*

Клетки меланомы Mel Z растили в полной среде RPMI-1640 в 24-луночном планшете. Через 24 ч роста клеток в CO_2 -инкубаторе при 37 °С добавляли 0,1; 1,0 и 10,0 мкМ эрастина или 0,1; 1,0 или 10,0 мкМ OVN-002 и инкубировали в течение 5 ч. Ранее было показано, что клетки меланомы Mel Z чувствительны к эрастину при концентрации 10,0 мкМ [11]. В качестве контроля использовали клетки, растущие в полной среде RPMI-1640 без индукторов ферроптоза.

Затем среду заменяли свежей, не содержащей сыворотки, и добавляли 5 мкМ C11-BODIPY (581/591) — индикатора перекисного окисления липидов (получен от Thermo Fisher Scientific, США). C11-BODIPY — это флуорофор, который, переходя из тиоэфира в сульфоксид, меняет флуоресцентные характеристики: убывает поглощение красного цвета и нарастает поглощение зеленого. После инкубирования с флуоресцентной меткой в течение 30 мин клетки трижды промывали фосфатным буфером. Интенсивность флуоресценции определяли на флуоресцентном микроскопе IN Cell Analyzer (GE Healthcare, США) при 510–550 нм.

Исследования *in vivo*

Животные. Исследования *in vivo* выполнены на самках мышей — гибридов F1 (C57Bl/6 \times DBA/2) массой 20–22 г. Мышей получали из отдела лабораторных животных ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Животных содержали в виварии при естественном освещении, на стандартном рационе питания и свободном доступе к воде [12].

Опухолевая модель. Первичную оценку противоопухолевой активности соединения OVN-002 проводили на перевиваемой меланоме B-16 мышей.

Штамм меланомы B-16 поддерживали на самках мышей линии C57Bl/6 [13]. Для перевивки опухолевую ткань измельчали ножницами до гомогенной консистенции, добавляли среду 199 до соотношения 1:10 и 0,5 мл (50 мг опухолевой массы) полученной суспензии вводили подкожно в область правой подмышечной впадины самкам гибридов мышей F1 (C57Bl/6 \times DBA/2) [13].

Схема введения. Эрастин и OVN-002 вводили мышам ежедневно внутривентрально в течение 5 дней. Начало введения — через 48 ч после трансплантации меланомы B-16. Соединение OVN-002 изучали в дозах 10, 15, 30, 50 и 100 мг/кг. Действие OVN-002 сравнивали с эффектом эрастина в дозе 50 мг/кг.

Эрастин растворяли в ДМСО («ПанЭко», Россия) и подкисляли соляной кислотой до pH 3,5, далее раствор разбавляли водой для инъекций до необходимой концентрации эрастина и содержания ДМСО не более 10 %.

OVN-002 растворяли в ДМСО, затем добавляли кислотный фосфатный буфер (pH 4,8) до концентрации 3 мг/мл и содержания ДМСО не более 10 %.

Группы мышей формировали с учетом получения статистически достоверных результатов: контрольная группа состояла из 10 животных, опытные группы — из 6 животных.

Критерии оценки противоопухолевого эффекта. Наблюдение за мышами проводили до их гибели. Противоопухолевый эффект соединений оценивали по торможению роста опухоли (ТРО, %) и увеличению продолжительности жизни (УПЖ, %) леченых мышей по сравнению с контрольными животными [14].

Для оценки ТРО проводили измерение 3 максимальных взаимно перпендикулярных размеров опухоли (a — длина, b — ширина, c — высота) у каждого животного, вычисляли ее объем, а затем средний объем опухоли в группе. Измерение объема опухоли проводили каждые 3–4 дня начиная с 1-го дня после окончания лечения животных по формуле 1:

$$V(\text{мм}^3) = a \times b \times c.$$

ТРО вычисляли по формуле 2:

$$\text{ТРО (\%)} = (V_k - V_o) / V_k \times 100,$$

где V_k — средний объем опухолей в контрольной группе (мм^3), V_o — средний объем опухолей в опытной группе (мм^3).

УПЖ вычисляли по формуле 3:

$$\text{УПЖ (\%)} = (\text{СПЖ}_o - \text{СПЖ}_k) / \text{СПЖ}_k \times 100,$$

где СПЖ_k — средняя продолжительность жизни животных в контрольной группе (дни), СПЖ_o — средняя продолжительность жизни животных в опытной группе (дни).

Минимальные критерии активности — ТРО ≥ 50 %, УПЖ ≥ 25 %. Эффективными считали дозы, вызывающие ТРО ≥ 70 % продолжительностью не менее 7 дней после окончания лечения [14].

Статистическую значимость противоопухолевого эффекта по отношению к нелеченым особям контрольной группы определяли по методу Фишера—Стьюдента. Различия между сравниваемыми группами считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Исследования *in vitro*

Ранее нами был исследован дозозависимый эффект эрастина на рост клеток меланомы Mel Z. Было показано, что 0,1 и 1,0 мкМ эрастина не индуцировали ферроптоз в клетках меланомы. Гибель клеток Mel Z наблюдали при концентрации 10,0 мкМ [11]. О гибели клеток меланомы Mel Z по типу ферроптоза судили по интенсивности перекисного окисления липидов, которое фиксировали после инкубации клеток с флуоресцентной меткой C11-BODIPY (581/591 нм).

Соединение OVN-002 также тестировали при 3 концентрациях: 0,1; 1,0 и 10,0 мкМ. При концентрации 0,1 мкМ соединение OVN-002 не индуцировало ферроптоз в клетках Mel Z; при 1,0 мкМ наблюдалась гибель 10–15 % клеток; гибель клеток, индуцированная 10,0 мкМ соединения OVN-002, была сравнима с гибелью клеток, индуцированной 10,0 мкМ эрастина (рис. 2). Следует отметить, что интенсивность флуоресценции C11-BODIPY для 10,0 мкМ OVN-002 и эрастина была сравнима: 744 ± 20 и 719 ± 20 у. е. соответственно (см. рис. 2). В контрольных клетках и клетках, инкубированных с эквивалентным количеством ДМСО, интенсивность флуоресценции равнялась 202 ± 10 и 206 ± 10 у. е. соответственно.

Чувствительность клеток меланомы Mel Z к действию соединения OVN-002 позволила инициировать исследование его противоопухолевой активности на модели перевиваемой меланомы В-16 мышей.

Первичная оценка противоопухолевой активности OVN-002 *in vivo*

При изучении действия OVN-002 на меланому В-16 было выявлено, что в диапазоне доз 10–30 мг/кг соединение оказывало минимальный противоопухолевый эффект на уровне 48–59 % ТРО ($p < 0,05$ по отношению к контролю) (см. таблицу).

Результаты сравнительного исследования противоопухолевой активности OVN-002 и эрастина в дозе 50 мг/кг показали, что OVN-002 оказывал выраженное противоопухолевое действие на рост меланомы В-16 (см. таблицу). ТРО составляло 81–57 % ($p < 0,05$ по отношению к контролю), эффект наблюдали в течение 7 дней после окончания лечения.

Введение эрастина вызывало кратковременное ТРО В-16 непосредственно после окончания лечения (ТРО 65 %; $p < 0,05$ по отношению к контролю).

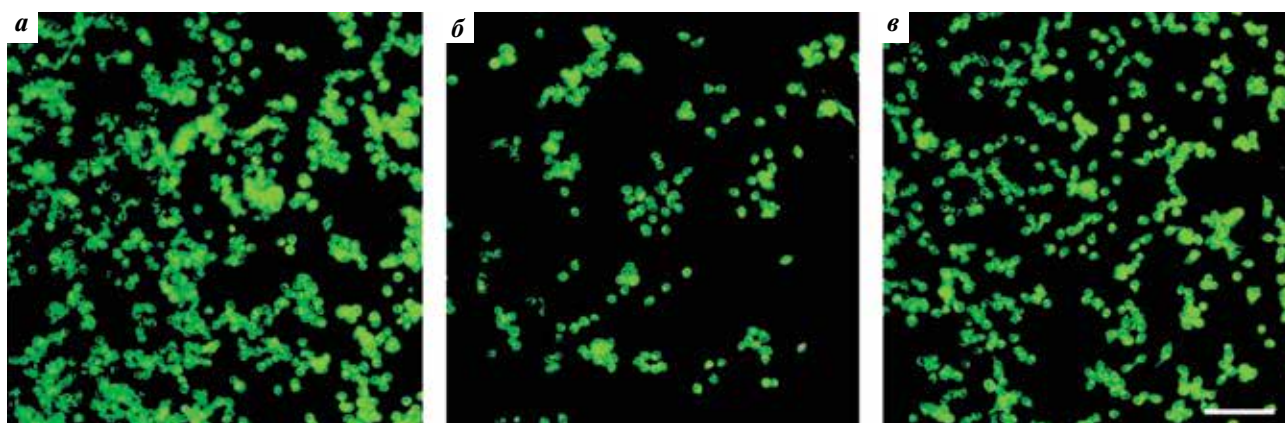


Рис. 2. OVN-002 индуцирует гибель клеток Mel Z по типу ферроптоза. Флуоресценция C11-BODIPY в клетках Mel Z: а — рост клеток с 10,0 мкМ OVN-002; б — контроль с 10 % ДМСО; в — рост клеток с 10,0 мкМ эрастина. $\times 200$

Fig. 2. Ferroptotic cell death induced by OVN-002. The fluorescence of C11-BODIPY in Mel Z: а — cells grown with 10.0 μM OVN-002; б — control cells with 10 % DMSO; в — cells grown with 10.0 μM of erastin. $\times 200$

Противоопухолевая активность OVN-002 на меланоме B-16

Antitumor activity of OVN-002 on B-16 melanoma

№ No.	Группа Group	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	ТРО, % TGI, %						УПЖ, % ILS, %
			Дни после окончания лечения Days after treatment						
			1	4	7	10	13	17	
1	OVN-002	10	59*	48*	53*	24	25	38	12
2		15	48*	10	36	12	18	24	5
3		30	56*	32	21	29	30	17	23
4		50	81*	69*	57*	46	33	55*	14
5		100	65*	62*	67*	56*	57*	43	29*
6	Эрастин	50	65*	22	28	1	0	0	3

* $p < 0,05$ различия достоверны по отношению к контролю.* $p < 0,05$ differences are significant in relation to control.**Примечание.** ТРО — торможение роста опухоли; УПЖ — увеличение продолжительности жизни.

Note. TGI — tumor growth inhibition; ILS — increase of life span.

В этой дозе ни соединение OVN-002, ни эрастин достоверно не увеличивали продолжительность жизни мышей (УПЖ 14 и 3 % соответственно).

Увеличение дозы OVN-002 до 100 мг/кг приводило к более равномерному и длительному противоопухолевому эффекту: ТРО составило 65–67 % ($p < 0,05$ по отношению к контролю) в течение 7 дней после окончания лечения, далее эффект сохранялся на уровне ТРО 57 % ($p < 0,05$) до 13-го дня наблюдения. В этой дозе получен эффект УПЖ на уровне 29 % ($p < 0,05$ по отношению к контролю).

Следует отметить, что после введения соединений гибель мышей не отмечали ни в одной из опытных групп.

Обсуждение

Меланома — высокозлокачественная опухоль, резистентная к химио- и лучевой терапии [15], а также к антиангиогенной терапии. Высокая частота рецидивов, непредсказуемость клинического течения болезни и отсутствие эффективной системной терапии делают пессимистическими прогнозы при прогрессировании и метастазировании опухоли. Два независимых факта привели нас к синтезу и исследованию влияния аналога эрастина на рост метастатических клеток меланомы: во-первых, индукторы ферроптоза способны вызывать гибель резистентных к терапии опухолевых клеток [15, 16], во-вторых, эрастин плохо растворим в воде и нестабилен [17, 18].

«Золотым стандартом» индукции ферроптоза и сегодня продолжает оставаться эрастин. В последнее время эрастин рассматривается как перспективное противоопухолевое соединение, способное повысить

эффективность стандартной химио- и лучевой терапии [19]. Эрастин содержит в молекуле структурный фрагмент хиназолина, который, очевидно, важен для проявления такого типа активности [9, 20]. Нами была модифицирована структура эрастина с заменой заместителей во 2-м и 3-м положении хиназолинового цикла. Во 2-м положении был введен пиразольный цикл, а в 3-м — гидроксильная группа, алкилированная бензиловым эфиром уксусной кислоты. Предполагалось, что такая замена должна привести к усилению активности данного соединения по сравнению с эрастином.

In vitro исследование соединения OVN-002 показало, что его активность не только приближалась к активности эрастина при одинаковой концентрации в 10,0 мкМ, но и незначительно превышала эффект эрастина на клетках меланомы Mel Z. Обнаруженная в опытах *in vitro* цитотоксическая активность OVN-002 явилась основанием для исследования его противоопухолевой активности на экспериментальной модели меланомы B-16 мышей. Исследование аналогов эрастина *in vivo* в настоящее время лимитировано низкой биодоступностью соединений, обусловленной их плохой растворимостью в воде [17, 18]. Поэтому J. Сао и соавт. использовали в качестве растворителя 0,625 % ДМСО [21]. Другие авторы растворяли эрастин в 5 % ДМСО с кукурузным маслом или в 0,1 % ДМСО [22, 23]. Также эрастин растворяли в 2 % ДМСО с последующим добавлением 98 % физиологического раствора с фосфатным буфером [24]. Синтезированный аналог эрастина OVN-002 также плохо растворялся в воде. Для *in vivo* экспериментов соединение OVN-002 растворяли в ДМСО, затем добавляли кислотный фосфатный буфер (рН 4,8), получая раствор с содержанием ДМСО не более 10 %.

При первичной оценке противоопухолевой активности соединения OVN-002 *in vivo* на меланоме B-16 выявлено, что соединение в дозе 50 мг/кг оказало эффект в виде ТРО 81–57 % ($p < 0,05$) в течение 7 дней после окончания лечения. В то же время эрастин в аналогичной дозе показал лишь кратковременный эффект (ТРО 65 %, $p < 0,05$) в 1-й день наблюдения. При увеличении дозы OVN-002 до 100 мг/кг получен более длительный противоопухолевый эффект: ТРО составило 65–57 % до 13-го дня наблюдения. В этой дозе соединение оказало эффект УПЖ на 29 % ($p < 0,05$), что превышало, хотя и незначительно, минимальное значение критерия (УПЖ 25 %).

К сожалению, в данном эксперименте доза эрастина 100 мг/кг не была испытана, что предполагается сделать в последующих исследованиях.

Несмотря на несомненную перспективность эрастина, к настоящему времени нет внедренного в клиническую практику препарата, индуцирующего ферроптоз в опухолевых клетках. Полученные данные об индукции гибели метастатических клеток меланомы Mel Z и первичная оценка противоопухолевой активности соединения OVN-002 могут служить основанием для продолжения исследований и синтеза новых производных хиназолина с более высокой активностью.

Заключение

Сегодня уже нет сомнений, что одной из основных причин клинического прогрессирования опухоли на фоне лечения является резистентность к терапии. Достигнуть реактивации апоптоза в резистентных клетках практически невозможно. Заболевание вступает в терминальную неконтролируемую фазу роста.

Опубликованные недавно данные о способности индукторов ферроптоза вызывать гибель метастатических опухолевых клеток привели нас к инициации поиска низкомолекулярных активаторов ферроптоза.

Проведенные исследования показали, что производное хиназолина OVN-002 проявляет цитотоксическую активность, сравнимую с активностью эрастина, на клетках метастатической меланомы Mel Z: в концентрации 10,0 мкМ значения флуоресценции C11-BODIPY для OVN-002 и эрастина составляли 744 ± 20 и 719 ± 20 у. е. соответственно.

OVN-002 оказывает более высокий противоопухолевый эффект на меланому B-16 мышей по сравнению с эрастином: ТРО 81–57 % ($p < 0,05$ по отношению к контролю) до 7-го дня и ТРО 65 % ($p < 0,05$) в 1-й день после окончания лечения соответственно.

Полученные предварительные результаты дают возможность продолжить поиск соединений, индуцирующих ферроптоз.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Свирновский А.И. Резистентность опухолевых клеток к терапевтическим воздействиям как медико-биологическая проблема. Международные обзоры: Клиническая практика и здоровье 2014;5(11):15–37. [Svirnovsky A.I. The resistance of tumor cells to therapeutic influences as a biomedical problem. *Mezhdunarodnie obzory: klinicheskaya praktika i zdorovie* = International Reviews: Clinical Practice and Health 2014;5(11):15–37 (In Russ.)].
- Xie Y., Hou W., Song X. et al. Ferroptosis: Process and function. *Cell Death Differ* 2016;23(3):369–79. DOI: 10.1038/cdd.2015.158.
- Вартанян А.А. Метаболизм железа, ферроптоз, рак. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(3):14–20. [Vartanian A.A. Iron metabolism, ferroptosis and cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2017;16(3):14–20 (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-14-20.
- Bogdan A.R., Miyazawa M., Hashimoto K. et al. Regulators of iron homeostasis: new players in metabolism, cell death, and disease. *Trends Biochem Sci* 2016;41(3):274–86. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.11.012.
- Lo M., Ling V., Wang Y.Z. et al. The xc-cystine/glutamate antiporter: a mediator of pancreatic cancer growth with a role in drug resistance. *Br J Cancer* 2008;99:464–72. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604485.
- Yang W.S., Sriramaratnam R., Welsch M.E. et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* 2014;156:317–31. DOI: 10.1016/j.cell.2013.12.010.
- Yang W.S., Stockwell B.R. Ferroptosis: death by lipid peroxidation. *Trends Cell Biol* 2016;26(3):165–76. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.10.014.
- Lewerenz J., Hewett S., Huang Y. et al. The cystine/glutamate antiporter system x(c)(-) in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2013;18(5):522–55. DOI: 10.1089/ars.2011.4391.
- Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R. et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012;149(5):1060–72. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В. и др. Клеточная линия меланомы человека Mel Z, используемая для получения противоопухолевых вакцин. Патент на изобретение RU 2390556 C1, 27.05.2010. [Mikhajlova I.N., Baryshnikov A.J., Demidov L.V. et al. Human melanoma cell line Mel Z used for making anti-tumor vaccines. Patent of Invention RU 2390556 C1, 27.05.2010. (In Russ.)].
- Вартанян А.А., Осипов В.Н., Хоченков Д.А. и др. Производные хиназолина, индуцирующие ферроптоз в метастатических клетках меланомы и рака толстой кишки. Патент на изобретение RU 2722308 C1, 2020. [Vartanian A.A., Osipov V.N., Khochenkov D.A. et al. Quinazoline derivatives inducing ferroptosis in metastatic melanoma cells and colon cancer. Patent of Invention RU 2722308 C1, 2020. (In Russ.)].
- Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. 8-е изд. Пер. с англ. под ред. И.В. Белозерцевой, Д.В. Блинова, М.С. Красилицкой. М.: ИРБИС, 2017. 336 с. [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Transl. from Eng. by I.V. Belozertseva, D.V. Blinov, M.S. Krasilchikova. Moscow: IRBIS, 2017. 336 p. (In Russ.)].

13. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина, А. Голдин, И. Кляйн. М.: Медицина, 1980. 296 с. [Experimental evaluation of antitumor drugs in the USSR and the USA. Ed. Z.P. Sofina, A.B. Syrkin (USSR), A. Goldin, A. Klein (USA). Moscow: Meditsina, 1980. 296 p. (In Russ.)].
14. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К., 2012. С. 642–57. [Treschalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. et al. Methodical recommendations for the preclinical study of the antitumor activity of drugs. In the book: Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. Moscow: Grif i K., 2012. Pp. 642–57 (In Russ.)].
15. Tsoi J., Robert L., Paraiso K. et al. Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell* 2018;33(5):890–904.e5. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.03.017.
16. Yu Y., Xie Y., Cao L. et al. The ferroptosis inducer erastin enhances sensitivity of acute myeloid leukemia cells to chemotherapeutic agents. *Mol Cell Oncol* 2015;2(4):e1054549. DOI: 10.1080/23723556.2015.1054549.
17. Viswanathan V.S., Ryan M.J., Dhruv H.D. et al. Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature* 2017;547(7664):453–7. DOI: 10.1038/nature23007.
18. Hangauer M.J., Viswanathan V.S., Ryan M.J. et al. Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. *Nature* 2017;551(7679):247–50. DOI: 10.1038/nature24297.
19. Zhao Y., Li Y., Zhang R. et al. The Role of Erastin in Ferroptosis and Its Prospects in Cancer Therapy. *Oncotargets Ther* 2020;13:5429–41. DOI: 10.2147/OTT.S254995.
20. Dixon S.J., Patel D.N., Stockwell B.R. Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *Elife* 2014;3:e02523. DOI: 10.7554/eLife.02523.
21. Cao J., Chen X., Jiang L. et al. DJ-1 suppresses ferroptosis through preserving the activity of S-adenosyl homocysteine hydrolase. *Nature communications* 2020;11:1251. DOI: 10.1038/s41467-020-15109-y.
22. Luo M., Wu L., Zhang K. et al. miR-137 regulates ferroptosis by targeting glutamine transporter SLC1A5 in melanoma. *Cell Death & Differentiation* 2018;25:1457–72. DOI: 10.1038/s41418-017-0053-8.
23. Shiromizu Sh., Yamauchi T., Kusunose N. et al. Dosing Time-Dependent Changes in the Anti-tumor Effect of xCT Inhibitor Erastin in Human Breast Cancer Xenograft Mice. *Biol Pharm Bull* 2019;42(11):1921–5. DOI: 10.1248/bpb.b19-00546.
24. Sun X., Ou Z., Xie M. et al. HSPB1 as a novel regulator of ferroptotic cancer cell death. *Oncogene* 2015;34(45):5617–25. DOI: 10.1038/ncr.2015.32.

Вклад авторов:

Л.М. Борисова: разработка дизайна исследования, обсуждение результатов, редактирование рукописи;

В.Н. Осипов: синтез и подтверждение структуры соединения;

А.А. Вартанян: исследования *in vitro*, обсуждение результатов, написание рукописи;

Д.В. Гусев: обсуждение дизайна синтеза соединения;

И.С. Голубева: трансплантация опухоли, исследование *in vivo*;

М.П. Киселева: обработка результатов исследования *in vivo*.

Authors contributions:

L.M. Borisova: study design, results discussion, manuscript editing;

V.N. Osipov: the synthesis and confirmation of OVN-002 structure;

A.A. Vartanian: *in vitro* studies, results discussion, manuscript writing;

D.V. Gusev: discussion of OVN-002 synthesis design;

I.S. Golubeva: tumor transplantation, *in vivo* studies;

M.P. Kiseleva: *in vivo* studies results processing.

ORCID авторов/ORCID of authors

Л.М. Борисова / L.M. Borisova: <https://orcid.org/0000-0001-6554-1949>

В.Н. Осипов / V.N. Osipov: <https://orcid.org/0000-0001-7726-4467>

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

Д.В. Гусев / D.V. Gusev: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8265>

И.С. Голубева / I.S. Golubeva: <https://orcid.org/0000-0002-7263-7444>

М.П. Киселева / M.P. Kiseleva: <https://orcid.org/0000-0002-4309-6722>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено в рамках НИР № АААА-А19-119021890101-1

«Разработка подходов к созданию противоопухолевых агентов на основе соединений — потенциальных индукторов ферроптоза».

Financing. The study was performed in the framework research work № АААА-А19-119021890101-1 “Development of approaches to the creation of antitumor agents based on compounds — potential inducers of ferroptosis”.

Соблюдение правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with the rules of bioethics. The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation. The study was performed in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the protection of vertebrates used for research and other scientific purposes.

Статья поступила: 11.11.2020. **Принята в печать:** 24.12.2020.

Article submitted: 11.11.2020. **Accepted for publication:** 24.12.2020.