

# CD437 повышает захват железа клетками метастатической меланомы

А.А. Вартамян, Ю.А. Хоченкова, В.С. Косоруков

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Амалия Арташевна Вартамян [zhivotov57@mail.ru](mailto:zhivotov57@mail.ru)

**Введение.** CD437, аналог витамина А, является агонистом  $\gamma$ -рецептора ретиноевой кислоты (RAR $\gamma$ ). Известно также, что CD437 вызывает p53-независимое повреждение ДНК с помощью механизма, независимого от пути, опосредованного RAR $\gamma$ . У онкологических больных очень часто обнаруживается дефицит железа, а также нарушена доставка железа к тканям.

**Цель исследования** – изучение влияния CD437 на метаболизм железа в клетках метастатической меланомы.

**Материалы и методы.** В экспериментах были использованы: 2D-культивирование клеток метастатической меланомы Mel Z, фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопия, проточная цитофлуориметрия.

**Результаты.** В экспериментах с клетками меланомы линии Mel Z, не обработанными CD437 (контроль), рецептор трансферрина CD71 экспрессировали  $40 \pm 4$  % клеток ( $p < 0,05$ ), а при инкубации с CD437 количество клеток, экспрессирующих CD71, возрастало до  $80 \pm 6$  % ( $p < 0,05$ ). Далее мы исследовали экспрессию ферритина, связывающего железо, не участвующее в метаболизме клетки. В контрольных экспериментах ферритин экспрессировали  $84 \pm 6$  % клеток ( $p < 0,05$ ). При росте клеток в присутствии CD437 ферритин стали экспрессировать все клетки (100 %,  $p < 0,05$ ). Подобный сценарий указывает на то, что CD437, по всей видимости, способствует накоплению в клетке свободного, несвязанного железа, которое может индуцировать ферроптоз. В контрольных экспериментах, без добавления CD437, уровень перекисного окисления липидов мембран, индикатора ферроптоза, был незначительным. Перекисное окисление липидов, индуцированное CD437, составляло  $55 \pm 5$  % ( $p < 0,05$ ) от интенсивности флуоресценции, индуцированной эрастином, положительным контролем.

**Заключение.** CD437 повышает захват железа клетками метастатической меланомы. Низкий уровень перекисного окисления липидов мембран, индуцированного CD437, не позволяет рассматривать его как индуктор ферроптоза. Нужны дополнительные исследования для поиска мишеней, связывающих железо, альтернативных ферритину.

**Ключевые слова:** меланома, железо, CD437, CD71, ферритин, ферроптоз

**Для цитирования:** Вартамян А.А., Хоченкова Ю.А., Косоруков В.С. CD437 повышает захват железа клетками метастатической меланомы. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(3):34–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-34-39

## CD437 increases the iron uptake by metastatic melanoma cells

Amalia A. Vartanian, Yulia A. Khochenkova, Vyacheslav S. Kosorukov

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia

**Contacts:** Amalia Artashevna Vartanian [zhivotov57@mail.ru](mailto:zhivotov57@mail.ru)

**Background.** CD437, an analog of vitamin A, is an agonist of the retinoic acid  $\gamma$ -receptor (RAR $\gamma$ ). CD437 is also known to cause p53-independent DNA damage by a mechanism independent of the RAR-mediated pathway. In cancer patients, iron deficiency is constantly detected, the delivery of iron to tissues is also destroyed.

**Aim.** To study the effect of CD437 on iron metabolism in metastatic melanoma cells, Mel Z.

**Materials and methods.** In this study 2D cultivation of metastatic Mel Z melanoma cells, phase-contrast and fluorescence microscopy, flow cytometry were used.

**Results.** In control cells without the addition of CD437 CD71, transferrin receptor, expressed  $40 \pm 4$  % ( $p < 0,05$ ) of Mel Z cells, in the presence of CD437 CD71 expression increased to  $80 \pm 6$  %. Next, we have studied the expression of ferritin. Iron, which is not involved in cell metabolism, is bound by ferritin. In control experiments, ferritin

was expressed by  $84 \pm 6\%$  ( $p < 0.05$ ) of cells. When the cells grew in the presence of CD437, ferritin was expressed by all the cells ( $100\%$ ,  $p < 0.05$ ). Such a scenario indicates that CD437 may contribute to the accumulation of free, unbound iron in the cell, which can induce ferroptosis. In control experiments without the addition of CD437, the level of membranes lipid peroxidation, an indicator of ferroptosis, was insignificant. Lipid peroxidation induced by CD437 was  $55 \pm 5\%$  ( $p < 0.05$ ) of the fluorescence intensity induced by erastin, positive control.

**Conclusion.** CD437 increases the iron uptake by metastatic melanoma cells. The low level of membranes lipid peroxidation induced by CD437 does not allow it to be considered as an inducer of ferroptosis. Additional investigations are needed to find iron-binding targets alternative to ferritin.

**Keywords:** melanoma, iron, CD437, CD71, ferritin, ferroptosis

**For citation:** Vartanian A.A., Khochenkova Yu.A., Kosorukov V.S. CD437 increases the iron uptake by metastatic melanoma cells. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(3):34–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-34-39

## Введение

Синтетический ретиноид 6-[3-(1-адамантил)-4-гидроксифенил]-2-нафталинкарбоновая кислота (CD437), аналог витамина А, является агонистом  $\gamma$ -рецептора ретиноевой кислоты (RAR $\gamma$ ) [1]. Его противоопухолевая активность была подтверждена на моделях ксенотрансплантатов животных, демонстрируя высокий потенциал для лечения и/или профилактики рака [2–4]. Интерес к аналогам витамина А вызвал феномен, наблюдаемый на многих опухолях, – концентрация витамина А в опухолевых клетках значительно снижена по сравнению со здоровыми клетками. Это сопровождается снижением экспрессии рецепторов ретиноевой кислоты и приводит к повышению экспрессии маркеров стволовой клетки опухоли и, следовательно, короткой безрецидивной выживаемости онкологических больных [5]. Эффект CD437 как агониста RAR $\gamma$  был одной из первых описанных активностей этого ретиноида. CD437 избирательно связывается с RAR $\gamma$  и трансактивирует рецептор, запуская дифференцировку клеток [6]. Активно обсуждается в литературе и способность CD437 вызывать p53-независимое повреждение ДНК с помощью механизма, независимого от пути, опосредованного RAR $\gamma$  [7–9]. CD437-опосредованное повреждение ДНК объясняет, почему большинство клеток, независимо от их чувствительности к ретиноевой кислоте, отвечают на CD437. Недавно нами было получено экспериментальное подтверждение ингибирования миграционной и инвазивной активности клеток метастатической меланомы CD437 [10]. Многочисленные специфические реакции опухолевых клеток на этот ретиноид предполагают существование в опухолевой клетке нескольких мишеней его действия.

У онкологических больных дефицит железа обнаруживается очень часто [11]. Опухолевые клетки активно «изымают» из крови трансферрин (Tf), переносчик железа. Захват железа тем значительнее, чем больше масса самой опухоли и чем более она злокачественна [12, 13]. Одной из причин такого ак-

тивного поглощения железа опухолевыми клетками может быть необходимость этого металла как кофактора ДНК-полимеразного комплекса [14]. Железо также является активной частью дыхательных ферментов (при его недостатке ткани не могут усваивать кислород) и участвует в генерации аденозинтрифосфорной кислоты – источника биологической энергии в живых организмах [15, 16]. CD71, рецептор Tf, – практически единственный белок, доставляющий железо в клетку [17]. Следует отметить, что низкая экспрессия CD71 на опухолевых клетках коррелирует с меньшей частотой выявления метастазов и более длительной общей и безрецидивной выживаемостью больных [18]. Взаимодействие комплекса Tf/Fe $^{3+}$  с рецептором CD71 приводит к интернализации комплекса CD71/Tf/Fe $^{3+}$  в клетку. В клетке железо диссоциирует из комплекса и в основном используется для включения в гем или кофакторы ферментов. Железо, не участвующее в метаболизме клетки, депонируется в составе ферритина [19]. Ферритин позволяет клетке сохранять железо в нетоксичной форме, из которой оно может быть мобилизовано для синтеза гемоглобина и негемовых железосодержащих белков. Не связанное с ферритином свободное железо в результате окисления Fe $^{2+}$  в Fe $^{3+}$  (реакция Фентона: Fe $^{2+}$  + H $_2$ O $_2$  → Fe $^{3+}$ OH $^-$  + •OH) и генерации радикала кислорода способствует накоплению в клетке активных форм кислорода [20]. Ферритин практически «обезвреживает» свободное, не использованное клеткой железо.

Меланома – одна из наиболее агрессивных злокачественных опухолей человека. В основе летальности меланомы лежит высокая подвижность клеток опухоли, что позволяет им метастазировать почти во все органы [21]. Из-за невысокой чувствительности меланомы к существующим противоопухолевым препаратам крайне редко удается достигнуть регрессии метастазов и добиться стойкой длительной ремиссии [22].

**Цель настоящего исследования** – изучение влияния CD437 на метаболизм железа в клетках метастатической меланомы.

## Материалы и методы

**Материалы.** Ретиноид CD437 и эрастин были приобретены у Sigma-Aldrich Corporation (США). Антитела к CD71, FITC-конъюгированные, были получены от BD BioScience (США). C11-BODIPY приобретен у Thermo Fisher Scientific (США). Антитела к ферритину (clone F31) были любезно предоставлены О.Н. Солоповой.

**Культура клеток.** В работе использована клеточная линия меланомы Mel Z, выведенная из опухолевого материала пациента, находившегося на лечении в Научно-исследовательском институте клинической онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Клетки культивировали в полной среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 2 ммоль/мл глутамина и 0,1 мг/мл гентамицина. В экспериментах использовали клетки 70–75 % конфлюентности.

**Определение экспрессии ферритина и CD71.** Клетки Mel Z инкубировали с 1 мкМ CD437 в течение 24 ч при 37 °С. Фенотипирование антигенов клеточной поверхности проводили в реакции прямой иммунофлуоресценции.  $1 \times 10^5$  клеток трижды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) pH 7,5 и ресуспендировали в PBS. В каждую пробирку с клетками добавляли моноклональные антитела к CD71, меченные FITC, и инкубировали в течение 30 мин при 4 °С. По истечении срока инкубации клетки дважды промывали PBS от несвязавшихся антител и ресуспендировали в 200 мкл PBS, содержащего 1 % формалин. Экспрессию CD71 оценивали на проточном цитофлуориметре ACEA NovoCyte 2000R (Acea Bioscience, США). В каждой пробе анализировали до 10 тыс. событий. Анализируемый гейт устанавливали на основании комбинации светорассеивания и размера клеток. Для определения экспрессии ферритина вводилась дополнительная процедура – пермеабиллизация клеток. Пермеабиллизацию проводили, используя PBS с 0,1 % Triton X-100 в течение 10 мин, далее клетки дважды промывали центрифугированием и ресуспендировали в 0,1 мл PBS.

**Исследование влияния CD437 на индукцию ферроптоза *in vitro*.** Клетки Mel Z растили в полной среде RPMI-1640 в 24-луночном планшете. Через 24 ч роста клеток в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С добавляли 10,0 мкМ эрастина или 1,0 мкМ CD437 и инкубировали в течение 5 ч. В качестве контроля использовали клетки, растущие в полной среде RPMI-1640 без индуктора ферроптоза. Затем среду заменяли свежей, не содержащей сыворотки, и добавляли 5 мкМ C11-BODIPY – это флуорофор, который при переходе из тиоэфира в сульфоксид меняет флуоресцентные характеристики: убывает поглощение красного цвета и нарастает

поглощение зеленого. После инкубации в течение 30 мин с флуоресцентной меткой клетки трижды промывали фосфатным буфером. Интенсивность флуоресценции определяли на флуоресцентном микроскопе IN Cell Analyzer (GE Healthcare, США) (581/591 нм).

**Статистический анализ.** Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Статистический анализ проведен с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, США).

## Результаты и обсуждение

Опухолевые клетки перепрограммируют метаболизм железа, увеличивая экспрессию рецептора Tf, CD71, и накапливая ферритин, депонирующий железо, причем иногда в таких количествах (например, в клетках рака молочной железы), что он может играть роль маркера, т.е. с его помощью можно отличать злокачественное поражение молочной железы от доброкачественного [19]. Стабильно воспроизводимая противоопухолевая активность CD437 на моделях ксенотрансплантатов животных, демонстрирующая высокий потенциал для лечения рака, позволила нам поднять вопрос о возможном участии железа в этом эффекте. Мы предположили, что CD437, снижая поступление железа в клетку и увеличивая экспрессию ферритина, мог бы ингибировать репликацию ДНК и предотвратить неконтролируемую пролиферацию опухолевых клеток.

Ранее нами при инкубации клеток Mel Z с CD437 в диапазоне концентраций от 0,001 до 1 мМ была определена нецитотоксическая концентрация (IC<sub>10</sub>) CD437, составившая 1 мкМ [10]. Влияние CD437 на экспрессию CD71 и ферритина исследовали при инкубации клеток с нецитотоксическими концентрациями CD437 (1 мкМ). Такая схема эксперимента позволяла исключить вклад цитотоксичности CD437 в этот процесс. CD71 экспрессировали  $40 \pm 4$  % клеток ( $p < 0,05$ ) в контроле, а при инкубации с CD437 количество клеток, экспрессирующих этот маркер, возрастало до  $80 \pm 6$  % ( $p < 0,05$ ) (рис. 1, а). На следующем этапе работы мы исследовали влияние CD437 на экспрессию ферритина. Мы ожидали, что двукратное повышение захвата железа клетками меланомы должно сопровождаться активацией экспрессии ферритина, депонирующего несвязанное железо. В контрольных экспериментах ферритин экспрессировали  $84 \pm 6$  % клеток ( $p < 0,05$ ). При инкубации с CD437 ферритин стали экспрессировать все клетки (100 %,  $p < 0,05$ ) (рис. 1, б).

Подобный сценарий указывает на то, что CD437, по всей видимости, способствует накоплению в клетке свободного железа. Присутствие в клетке железа в свободном состоянии запускает реакцию Фентона

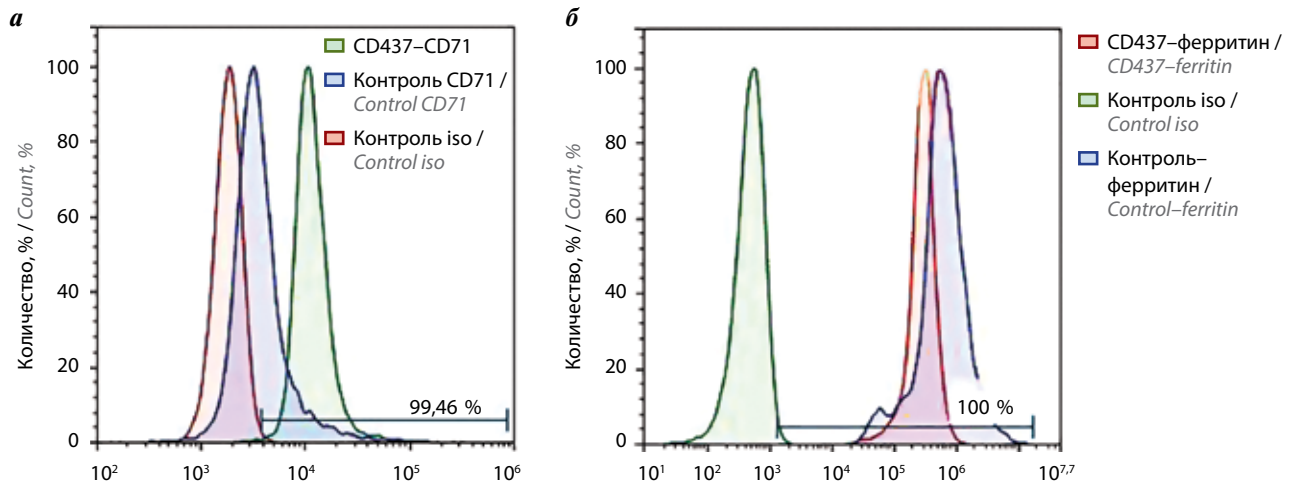


Рис. 1. Влияние CD437 на экспрессию CD71 (а) и ферритина (б) клетками Mel Z после 24 ч инкубации

Fig. 1. The influence of CD437 on CD71 (a) and ferritin (б) expression in Mel Z cells after 24 h incubation

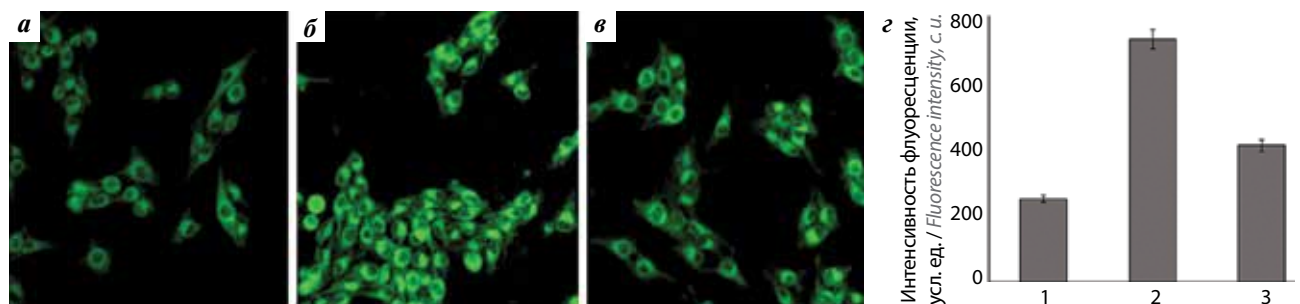


Рис. 2. Влияние CD437 на индукцию ферроптоза в Mel Z клетках. Флуоресценция C11-BODIPY в клетках Mel Z: а – контрольные клетки, без добавления CD437; б – клетки с 10,0 мкМ эрастина; в – клетки с 1,0 мкМ CD437; г – уровень перекисного окисления липидов в клетках Mel Z: 1 – интенсивность флуоресценции в контрольных клетках, без добавления CD437; 2 – индуцированная эрастином; 3 – индуцированная CD437.  $\times 200$

Fig. 2. The influence of CD437 on ferroptosis induction in Mel Z cells. The fluorescence of C11-BODIPY in Mel Z: а – control cells, without addition of CD437; б – cells grown with 10.0  $\mu\text{M}$  erastin; в – cells grown with 1.0  $\mu\text{M}$  of CD437: 1 – fluorescence intensity of control cells, without CD437 addition; 2 – after 24 h incubation with erastin; 3 – after 24 h incubation with CD437.  $\times 200$

и увеличивает уровень активных форм кислорода. Ферроптоз сегодня рассматривается как железозависимая регулируемая гибель клетки. Гибель клетки по типу ферроптоза базируется на перекисном окислении липидов мембран, которое сопровождается появлением многочисленных пор в плазматической мембране. Содержимое клетки вытекает в межклеточную среду, клетка уменьшается в размерах, сморщивается. Процесс этот абсолютно одинаков для всех типов клеток [23]. К бесконтрольному перекисному окислению липидов клеточных мембран приводят отказ механизмов антиоксидантной защиты клетки и дисбаланс клеточных метаболических процессов (например, метаболизма липидов и кратковременного повышения уровня железа) [24].

В наших исследованиях о роли CD437 в гибели клеток по типу ферроптоза в качестве положительного контроля мы использовали эрастин. Эрастин, исторически первый индуктор ферроптоза, и сегодня

продолжает оставаться «золотым стандартом». Ранее нами были протестированы 0,1 мкМ, 1,0 мкМ и 10 мкМ эрастина на способность индуцировать ферроптоз в клетках меланомы Mel Z. Массовая гибель клеток наблюдалась при 10 мкМ эрастина. 10 мкМ эрастина не вызывало фрагментацию ядра, что является итогом активации апоптоза. На гибель клеток, индуцированную эрастином, не оказывало влияния и присутствие 20 мкМ хлорокина, ингибитора аутофагии [25]. О гибели клеток Mel Z по типу ферроптоза судили по интенсивности перекисного окисления липидов, которое фиксировали после инкубации клеток с флуоресцентной меткой C11-BODIPY. Для исключения индукции апоптоза и/или некроза CD437 в клетках Mel Z мы использовали нецитотоксические концентрации CD437. В контрольных экспериментах без добавления CD437 уровень перекисного окисления липидов был незначительным (рис. 2, а). Перекисное окисление липидов мембран, индуцированное 1 мкМ CD437,

составляло  $55 \pm 5 \%$  ( $p < 0,05$ ) от интенсивности флуоресценции положительного контроля, 10 мкМ эрастина (рис. 2, б–г). В клетках, инкубированных с эквивалентным количеством диметилсульфоксида, интенсивность флуоресценции была невысокой и равнялась значениям интенсивности флуоресценции контрольных клеток (данные не приводятся). Низкий уровень перекисного окисления липидов мембран Mel Z в ответ на CD437 не позволяет рассматривать его как индуктор ферроптоза в клетках метастатической меланомы.

Железо используется клеткой для включения в гем или кофакторы ферментов. Не участвующее в метаболизме железо клетки депонируется в составе ферритина. В отношении локализации свободного, не связанного с ферритином железа в клетках в настоящее время имеется лишь ограниченное число данных. Предполагают, что существуют небольшие

клеточные лабильные пулы железа, и с таким пулом связывают токсичность железа для клетки. По всей видимости, CD437, повышая захват железа клетками метастатической меланомы, пополняет лабильные пулы свободного железа. Наблюдаемое нами повышение захвата железа клетками метастатической меланомы позволяет поднять вопрос об инициации дополнительных исследований для поиска не идентифицированных ранее мишеней связывания железа.

### Заключение

CD437 повышает захват железа клетками метастатической меланомы. Низкий уровень перекисного окисления липидов мембран, индуцированного CD437, не позволяет рассматривать его как индуктор ферроптоза. Нужны дополнительные исследования для поиска мишеней, связывающих железо, альтернативных ферритину.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Alvarez S., Bourguet W., Gronemeyer H., de Lera A.R. Retinoic acid receptor modulators: a perspective on recent advances and promises. *Expert Opin Ther Pat* 2011;21(1):55–63. DOI: 10.1517/13543776.2011.536531
- Han T., Goralski M., Capota E. et al. The antitumor toxin CD437 is a direct inhibitor of DNA polymerase  $\alpha$ . *Nat Chem Biol* 2016;12(7):511–5. DOI: 10.1038/nchembio.2082
- di Masi A., Leboffe L., De Marinis E. et al. Retinoic acid receptors: from molecular mechanisms to cancer therapy. *Mol Aspects Med* 2015;41:1–115. DOI: 10.1016/j.mam.2014.12.003
- Langdon S.P., Rabiasz G.J., Ritchie A.A. et al. Growth-inhibitory effects of the synthetic retinoid CD437 against ovarian carcinoma models *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998;42(5):429–32. DOI: 10.1007/s00280050841
- Doldo E., Costanza G., Agostinelli S. et al. Vitamin A, cancer treatment and prevention: the new role of cellular retinol binding proteins. *Biomed Res Int* 2015;2015:624627. DOI: 10.1155/2015/624627
- Shyu R.Y., Lin D.Y., Reichert U., Jiang S.Y. Synthetic retinoid CD437 induces cell dependent cycle arrest by differential regulation of cell cycle associated proteins. *Anticancer Res* 2002;22(5):2757–64. PMID: 12529993.
- Zhao X., Demary K., Wong L. et al. C. Retinoic acid receptor-independent mechanism of apoptosis of melanoma cells by the retinoid CD437 (AHPN). *Cell Death Differ* 2001;8(9):878–86. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400894
- Zhao X., Spanjaard R.A. The apoptotic action of the retinoid CD437/AHPN: diverse effects, common basis. *J Biomed Sci* 2003;10(1):44–50. DOI: 10.1007/BF02255996
- Lotan R. Receptor-independent induction of apoptosis by synthetic retinoids. *J Biol Regul Homeost Agents* 2003;17(1):13–28. PMID: 12757019
- Вартанян А.А., Хоченкова Ю.А., Кособокова Е.Н. и др. CD437 снижает метастатический потенциал клеток меланомы. *Вестник Московского Университета. Серия 2: Химия* 2021;62(4):10–7. Vartanian A.A., Khochenkova Yu.A., Kosobokova E.N. et al. CD437 reduces metastatic potential of melanoma cells. *Vestnik Moscovskogo Universiteta. Seriya 2: Himiya = Moscow University Chemistry Bulletin* 2021;62(4):10–7. (In Russ.).
- Ludwig H., Evstatiev R., Kornek G. et al. Iron metabolism and iron supplementation in cancer patients. *Wien Klin Wochenschr* 2015;127(23–24):907–19. DOI: 10.1007/s00508-015-0842-3
- Gozzelino R., Arosio P. Iron homeostasis in health and disease. *Int J Mol Sci* 2016;17(1):E130–E8. DOI: 10.3390/ijms17010130
- 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. DOI: 10.3389/fphar.2014.00124
- Jozwiakowski S.K., Kummer S., Gari K. Human DNA polymerase delta requires an iron-sulfur cluster for high-fidelity DNA synthesis. *Life Sci Alliance* 2019;2(4):e201900321. DOI: 10.26508/lsa.201900321
- 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
- Paul B.T., Manz D.H., Torti F.M., Torti S.V. Mitochondria and iron: current questions. *Expert Rev Hematol* 2017;10(1):65–79. DOI: 10.1080/17474086.2016.1268047
- Shen Y., Li X., Dong D. et al. Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy. *Am J Cancer Res* 2018;8(6):916–31. PMID: 30034931
- Habashy H.O., Powe D.G., Staka C.M. et al. Transferrin receptor (CD71) is a marker of poor prognosis in breast cancer and can predict response to tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 2010;119(2):283–93. DOI: 10.1007/s10549-009-0345-x
- Bitonto V., Alberti D., Ruiu R. et al. L-ferritin: a theranostic agent of natural origin for MRI visualization and treatment of breast cancer. *J Control Release* 2020;319:300–10. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.12.051
- 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
- Damsky W.E., Theodosakis N., Bosenberg M. Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. *Oncogene* 2014;33(19):2413–18. DOI: 10.1038/ncr.2013.194
- Simon A., Kourie H.R., Kerger J. Is there still a role for cytotoxic chemotherapy after targeted therapy and immunotherapy in metastatic melanoma? A case report and literature review. *Chin J Cancer* 2017;36(1):10. DOI: 10.1186/s40880-017-0179-6

23. Li J., Cao F., Yin H.L. et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis* 2020;11(2):88. DOI: 10.1038/s41419-020-2298-2
24. 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
25. 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.)

#### Благодарности

Авторы благодарят М.А. Барышникову и Д.А. Хоченкова за помощь в обсуждении результатов.

#### Acknowledgments

The authors thank M. Baryshnikova and D. Khochenkov for valuable comments and critical reading the manuscript.

#### Вклад авторов

А.А. Вартанян: разработка концепции и дизайна исследования, сбор и обработка данных, подготовка рукописи;  
Ю.А. Хоченкова: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования на проточном флуориметре;  
В.С. Косоруков: анализ и интерпретация данных.

#### Author's contribution

A.A. Vartanian: developing the concept and design of the research, data collection and processing, preparation of the manuscript;  
Yu.A. Khochenkova: data collection and processing, providing research materials on Flow Cytometry;  
V.S. Kosorukov: data analysis and interpretation.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

А.А. Вартанян / A.A. Vartanian: <https://orcid.org/0000-0001-9342-5523>  
Ю.А. Хоченкова / Yu.A. Khochenkova: <https://orcid.org/0000-0001-8392-5495>  
В.С. Косоруков / V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках НИОКТР № АААА-А20-120031190017-7 «Разработка и доклиническое исследование лекарственного средства BEL400, предназначенного для терапии опухолей».

**Funding.** This work was carried out with the financial support of experimental scientific development program № АААА-А20-120031190017-7 “Development and preclinical study of the drug BEL400 for tumor therapy”.

Статья поступила: 16.08.2022. Принята к публикации: 19.09.2022.

Article submitted: 16.08.2022. Accepted for publication: 19.09.2022.