

УДК 57.085.23

CD437 СНИЖАЕТ МЕТАСТАТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ

А.А. Вартамян*, Ю.А. Хоченкова, Е.Н. Кособокова, М.А. Барышникова, В.С. Косоруков

(ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ; *e-mail: zhivotov57@mail.ru)

Синтетический ретиноид CD437, агонист γ -рецептора ретиноевой кислоты (RAR γ), на моделях ксенотрансплантатов животных демонстрирует высокий потенциал для лечения рака. Исследовано влияния CD437 на метастатический потенциал клеток меланомы. Использованы 2D- и 3D-культивирование клеток, тесты на миграцию «в рану», инвазия, формирование колоний и проточная цитофлуориметрия. CD437 снижает миграцию клеток меланомы Mel Z по сравнению с положительным контролем на $52 \pm 2\%$. Снижение инвазивной активности клеток меланомы под действием CD437 относительно контроля не превышает $40 \pm 4\%$. CD437 также блокирует формирование сосудисто-подобных структур клетками меланомы на Матригеле. Эффективность колониеобразования Mel Z клетками была достаточно высокой в контроле, однако мы не обнаружили ни одной колонии через 7 дней культивирования с CD437 в нецитотоксических концентрациях. Экспрессия MMP-9 в клетках Mel Z была значительно ниже, чем экспрессия MMP-2. CD437 снижает экспрессию MMP-2 в два раза, а MMP-9 – в 35 раз по сравнению с контролем. Не выявлено влияния CD437 на экспрессию CD44, наблюдалось незначительное снижение экспрессии CD24 ($23 \pm 2\%$). Полученные нами результаты позволяют предположить, что CD437 снижает метастатический потенциал клеток меланомы.

Ключевые слова: CD437, клетки меланомы, метастазирование, MMP-2, MMP-9, CD44, CD24.

Современная противоопухолевая терапия направлена в основном на уничтожение опухолевых клеток путем реактивации в них апоптоза. Однако атака на геном опухолевой клетки не только не дает нужного эффекта, но и переводит опухоль в более агрессивную, метастатическую фазу роста, опухоль прогрессирует. Приобретение метастатических свойств начинается задолго до того, как клетка мигрирует из первичной опухоли. От первичной опухоли «отрываются» клетки с эпигенетическими изменениями, которые позволяют им преодолеть физические границы опухоли и колонизировать другие органы. Этапы метастазирования абсолютно одинаковы для всех типов опухоли. Метастазы являются конечным результатом сложного, многоступенчатого взаимодействия опухоли и организма [1, 2].

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 [3]. В силу

изначально невысокой чувствительности меланомы к существующим противоопухолевым препаратам крайне редко удается достигнуть регрессии метастазов и добиться стойкого длительного излечения [4]. Это обстоятельство повышает интерес к альтернативным методам лечения, в частности к блокированию формирования отдаленных метастазов меланомы.

Термин «ретиноиды» был введен в практику в середине 1970-х годов. Сегодня семейство ретиноидов включает несколько десятков веществ, структурно схожих с витамином А. Интерес вызывает феномен, наблюдаемый при изучении многих опухолей – концентрация витамина А в опухолевых клетках значительно снижена по сравнению со здоровыми клетками [5]. В таких клетках снижена также экспрессия рецепторов ретиноевой кислоты (RAR), что коррелирует с повышенным уровнем экспрессии маркеров стволовой клетки опухоли и, следовательно, с низкой безрецидивной выживаемостью онкологических больных [6]. Многочисленные эффекты, вызываемые этим соединением, и очевидные

специфические реакции на лечение ретиноидами позволили поднять вопрос о возможности ретиноидных рецепторов стать мишенью действия средств, предназначенных для профилактики рака. Начался поиск наиболее эффективной модификации витамина А, способной показать наилучший клинический результат. Синтетический ретиноид, 6-[3-(1-адамантил)-4-гидроксифенил]-2-нафталинкарбоновая кислота (CD437 или АНРН), избирательно связывается с γ -рецептором ретиноевой кислоты (RAR γ) и трансактивирует рецептор, запуская дифференцировку клеток [7]. Этот ретиноид проявляет также ярко выраженный противоопухолевый эффект на моделях ксенотрансплантатов животных [8]. Цель настоящего исследования – изучение вклада CD437 в изменения метастатического потенциала клеток меланомы.

Материалы и методы

Культивирование клеток. Клетки меланомы Mel Z были получены в НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России из метастаза в лимфоузел больной с диссеминированной меланомой, которая проходила лечение в этом центре. Клетки культивировали в полной питательной среде RPMI-1640 («Gibco», Великобритания), содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка (ЭСТ), («HyClone», США); 2 мМ/мл глутамин («ПанЭко», Россия) и 0,1 мг/мл гентамицин («ПанЭко», Россия) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры каждые 3 дня.

Определение миграционной активности клеток меланомы методом миграции в «рану». Клетки меланомы высаживали в субконфлюентной плотности на 24-луночный планшет. После прикрепления клеток пластмассовым накопечником (200 мкл) удаляли часть клеточного монослоя по центру чашки, создавая «рану» шириной 2,0–2,5 мм, а затем промывали и инкубировали с CD437 (IC₁₀ = 1 мкМ) («Merck», Германия). Отрицательным контролем служил рост клеток в бессывороточной среде, положительным контролем – рост клеток в полной среде RPMI-1640 в течение 24 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Миграционную скорость оценивали, измеряя ширину раны трех различных полей ($\times 20$) под световым микроскопом «Nikon 80i». Дальнейшую обработку и подсчет проводили в программе Image J.

Определение инвазивной активности клеток меланомы в камере Бойдена. Мембраны Transwell (размер пор 8 мкм, диаметр 6,5 мм; «Corning Costar Corporation», Великобритания) были покрыты 100 мкл Матригеля («BD Bioscience», США) (1,0 мг/мл), разбавленным RPMI-1640. Камеры помещали в 24-луночные чашки («Nunc», Дания), содержащие 700 мкл RPMI-1640 с 20% ЭСТ. Клетки (1×10^5) в 200 мкл RPMI-1640 с 0,2% бычьего сывороточного альбумина и CD437 (IC₁₀) высевали в верхние лунки. В качестве положительного контроля использовали клетки в среде RPMI-1640 без добавления CD437. Через 24 ч инкубации при 37 °С клетки на нижней поверхности мембраны фиксировали в 3%-м формальдегиде, окрашивали красителем Гимза, промывали в фосфатно-солевом буфере и подсчитывали (не менее 10 полей). Инвазивный потенциал рассчитывали по формуле (N – число клеток):

$$[N(\text{опыт}) / N(\text{контроль})] \times 100\%.$$

Культивирование клеток в 3D-системе. Матригель (8,7 мг/мл) размораживали при 4 °С и наносили по 100 мкл/лунку 24-луночного планшета на лед и оставляли в стерильных условиях для полимеризации матрикса в течение 1 ч при комнатной температуре и 30 мин при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Клетки меланомы Mel Z в концентрации 2×10^5 клеток/мл в полной ростовой среде RPMI-1640, содержащей 10% ЭСТ, наносили на гель и инкубировали при 37 °С в течение 15 ч с IC₁₀ CD437. В качестве положительного контроля использовали клетки, инкубированные в полной среде RPMI-1640, содержащей 10% ЭСТ без добавления CD437. После окончания инкубации делали серию фотоснимков образовавшейся сети сосудисто-подобных структур с помощью цифровой фотокамеры «Canon».

Определение колониеобразования. Клетки (200 тыс./лунка) высаживали в 6-луночные планшеты. К клеткам добавляли IC₁₀ CD437 и инкубировали 24 ч при 37 °С в CO₂-инкубаторе. После этого клетки снимали, подсчитывали в камере Горяева и пересаживали на новые 6-луночные планшеты в количестве 2 тыс./лунка в триплетах и культивировали 7–8 дней, заменяя питательную среду каждые 3 дня. Число колоний подсчитывали в 10 полях зрения.

Определение экспрессии CD44 и CD24. Клетки меланомы Mel Z инкубировали с CD437 (IC₁₀) в течение 24 ч при 37 °С. Экспрессию CD44 и CD2 оценивали в реакции непрямой иммуноф-

луоресценции с помощью проточной цитометрии. Клетки (1×10^5) трижды промывали PBS (pH 7,5) и ресуспендировали в PBS. В каждую пробирку добавляли моноклональные антитела («Thermo Scientific», США) к поверхностным маркерам и инкубировали при $+4^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. Клетки дважды отмывали от несвязавшихся антител и вносили вторичные антитела, конъюгированные с PE («Thermo Scientific», США), и инкубировали при $+4^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. Далее клетки дважды промывали PBS и ресуспендировали в 200 мкл PBS, содержащем 1%-й формалин. Экспрессию антигенов CD44 и CD24 оценивали на проточном цитофлуориметре «ACEA NovoCyte 2000R» («Acea Bioscience», США). В каждой пробе анализировали до 10 000 событий. Анализируемый гейт устанавливали на основании комбинации светорассеивания и размера клеток.

Определение экспрессии MMP-2, MMP-9.

Клетки меланомы Mel Z инкубировали с CD437 (IC_{10}) в течение 24 ч при 37°C . Экспрессию MMP-2 и MMP-9 оценивали в реакции непрямой иммунофлуоресценции с помощью проточной цитометрии. Для этого 1×10^5 клеток вносили в иммунологические пробирки и проводили пермеабиллизацию, используя PBS с 0,1% Triton X-100 в течение 10 мин, далее клетки дважды промывали центрифугированием и ресуспендировали в 0,1 мл PBS. В каждую пробирку добавляли моноклональные антитела к MMP-2 и MMP-9 («Thermo Scientific», США) и инкубировали при $+4^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. Клетки дважды отмывали от несвязавшихся антител, вносили вторичные, конъюгированные с FITC («Thermo Scientific», США) и инкубировали при $+4^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. Клетки дважды отмывали от несвязавшихся антител и ресуспендировали в 200 мкл PBS, содержащем 1%-й формалин. Экспрессию антигенов MMP-2 и MMP-9 оценивали на проточном цитометре «ACEA NovoCyte 2000R» («Acea Bioscience», США). В каждой пробе анализировали до 10 000 событий. Анализируемый гейт устанавливали на основании комбинации светорассеивания и размера клеток.

Статистический анализ. Все эксперименты проводили по 3 раза независимо друг от друга. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Для статистической обработки использовали дисперсионный анализ ANOVA, различия считались статистически значимыми при $P < 0,05$. Стати-

стические анализы были выполнены с использованием программного обеспечения GraphPad Prism («GraphPad Software», «La Jolla», США).

Результаты и обсуждение

В последние десятилетия усилия многих онкологов были направлены на исследование механизмов инициации и прогрессии злокачественной опухоли. Со временем стало понятно, что основная угроза злокачественных новообразований – распространение по всему организму. Метастазирование, или процесс миграции клеток опухоли из первичного очага с последующим формированием вторичных опухолевых очагов (метастазов) – одна из главных трудностей в лечении онкологических заболеваний. Химио- и/или лучевая терапия проводятся в том числе и для предотвращения появления метастазов. В настоящей работе мы представляем экспериментальный материал, подтверждающий снижение метастатического потенциала клеток меланомы линии Mel Z.

CD437 избирательно связывается с RAR γ и трансактивирует рецептор, запуская дифференцировку клеток [6]. Этот ретиноид также индуцирует апоптоз в различных типах опухолевых клеток с помощью механизма, не зависящего от RAR γ -пути. [9]. Его противоопухолевая активность подтверждена на моделях ксенотрансплантатов человеческих опухолей у животных, продемонстрирован высокий потенциал для профилактики и/или лечения рака [8]. Мы предположили, что ингибирование метастазирования могло бы стать одной из составляющих противоопухолевого эффекта CD437. На это указывали и наши недавно опубликованные данные об отмене CD437 цитопротекторной функции аутофагии [10].

Цитотоксичность CD437 на клетках Mel Z была изучена МТТ-тестом. При инкубировании клеток Mel Z с CD437 в диапазоне концентраций от 0,001 до 1 мМ была определена нецитотоксическая концентрация (IC_{10}) CD437, составившая 1 мкМ. Влияние CD437 на миграцию клеток меланомы, инвазию, формирование сосудисто-подобных структур и колоний исследовали при инкубации клеток с нецитотоксическими концентрациями (1 мкМ). Такая схема эксперимента позволила исключить вклад цитотоксичности CD437 в эти процессы. Оценка влияния CD437 на миграционную активность клеток меланомы Mel Z была изучена в экспериментах по миграции «в рану». Добавление эквимольного количества

ДМСО не оказывало влияния на миграцию Mel Z клеток. По сравнению с положительным контролем, обработанным ДМСО, зарастание «раны» не превышало $52 \pm 2\%$ ($p < 0,05$) (рис. 1, А–В).

Способность опухолевых клеток проникать в окружающую ткань – одна из основных характеристик, определяющих метастатический фенотип опухоли. Для оценки изменения инвазивных свойств клеток меланомы в ответ на CD437 мы выбрали широко используемый *in vitro* тест на инвазию с помощью камеры Бойдена. В данном тесте моделируется ситуация, при которой опухолевым клеткам для получения питания необхо-

димо преодолеть барьер (Матригель), имитирующий внеклеточный матрикс. Такой тест отражает также способность клетки разрушать внеклеточный матрикс. Полученные нами результаты свидетельствуют о снижении инвазивной активности клеток на $40 \pm 4\%$ в ответ на CD437 ($p < 0,05$), (рис. 1, Г).

«Васкулогенная мимикрия» (формирование васкулярных каналов агрессивными опухолевыми клетками *de novo* без участия эндотелиальных клеток) – уникальная особенность клеток с высокозлокачественным фенотипом, слабоагрессивные опухолевые клетки таких структур не

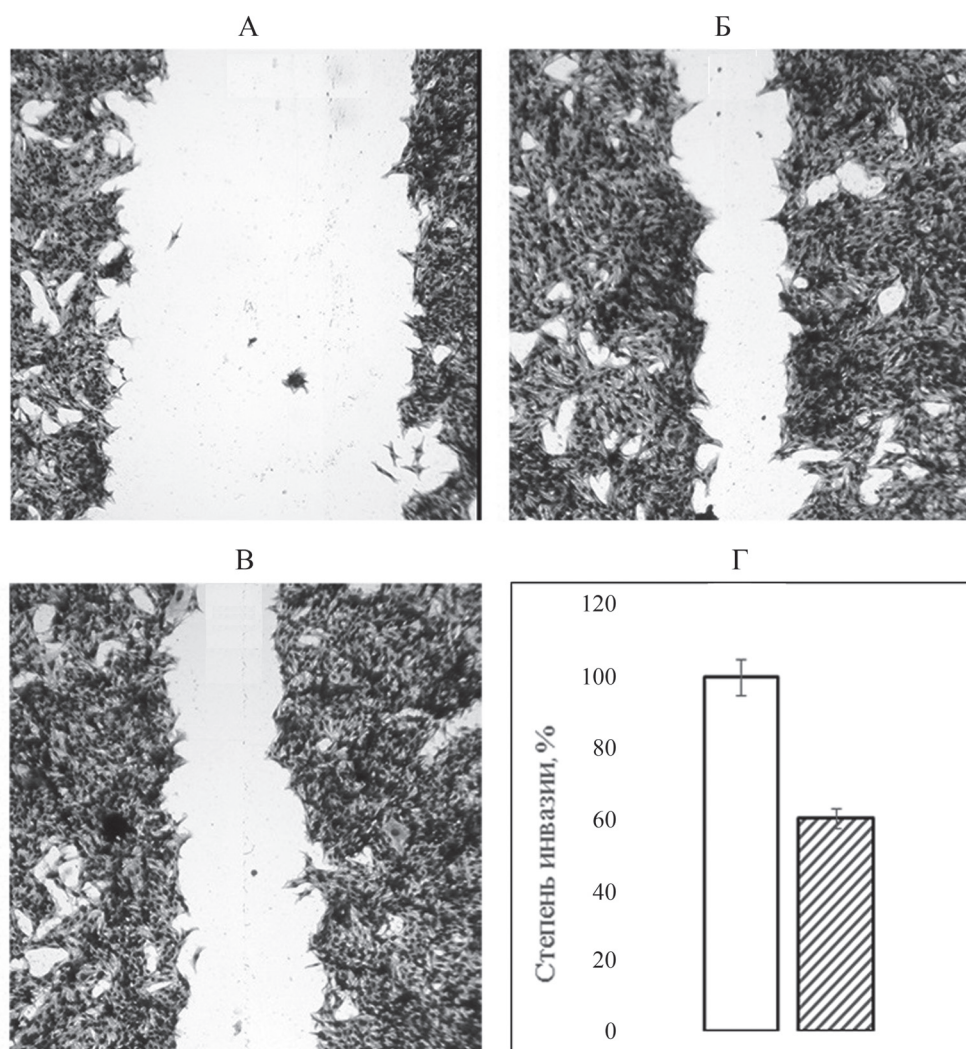


Рис. 1. Влияние CD437 на миграцию (А–В) и инвазию (Г) клеток меланомы Mel Z. Миграционная способность клеток меланомы Mel Z в «ранозаживляющем» тесте после 24 ч инкубации в среде RPMI-1640 без сыворотки (А), в среде RPMI-1640 с сывороткой (Б) и в среде RPMI-1640 с сывороткой с добавлением 1 мкМ CD437 (В). Зарастание «раны» визуализировали в пяти различных полях ($\times 20$). Изменение инвазивной активности клеток меланомы Mel Z после 24 ч инкубации с CD437 (Г). Количественная характеристика процесса представлена в процентах. Белый столбик соответствует количеству проникших через Матригель клеток (100%), заштрихованный столбик соответствует количеству клеток, проникших через Матригель в присутствии CD437

формируют [11]. Наблюдается высокая статистическая корреляция между появлением в опухоли васкулогенной мимикрии и частотой метастазирования [12]. Моделью васкулогенной мимикрии *in vitro* служит тест на формирование опухолевыми клетками сосудисто-подобных структур в 3D-культуре [13]. В своих исследованиях мы в качестве гелевой матрицы использовали Матригель – лиофилизированный природный внеклеточный матрикс. Формирование сосудисто-подобных структур опухолевыми клетками характеризуется рядом последовательных событий: миграцией клеток, гомотипическим узнаванием, формированием контактов клетка-клетка, вытягиванием клетки и образованием структур, подобных пчелиным сотам (honey-like comb). Выявленное нами ингибирование миграции и инвазии клеток меланомы CD437 предполагало его участие и в васкулогенной мимикрии. В контроле клетки меланомы формировали сосудисто-подобные структуры на Матригеле (рис. 2, А).

Когда клетки Mel Z росли с CD437, они сохраняли способность мигрировать и узнавать друг друга, однако полностью теряли способность к коммуникации, характерной для васкулогенной мимикрии (рис. 2, Б). Полученные нами результаты предполагают снижение агрессивного фенотипа клеток меланомы при воздействии CD437.

На следующем этапе работы мы исследовали влияние CD437 на образование колоний клетками меланомы. Тест на колониюобразование позволяет выявить способность каждой клетки популяции подвергаться «неограниченному» делению. В серии экспериментов мы показали, что эффективность колониюобразования контрольными клетками Mel Z была достаточно высокой (рис. 2, В). Однако в условиях инкубации Mel Z клеток с CD437 картина существенно менялась.

CD437 не только не снижал число колоний или уменьшал их размеры в колониюобразующем тесте, но и подавлял инициацию образования ко-

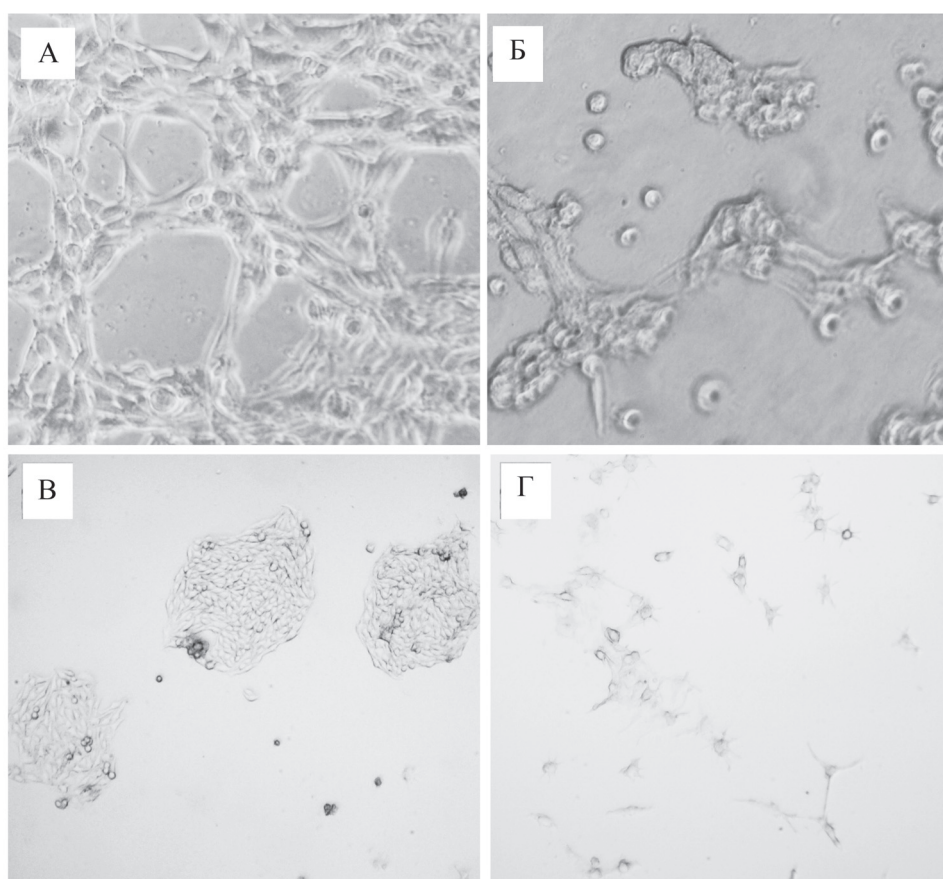


Рис. 2. Формирование сосудисто-подобных структур клетками меланомы Mel Z на Матригеле в отсутствие (А) и в присутствии (Б) CD437. Образование колоний клетками меланомы в отсутствие (В) и в присутствии (Г) CD437. Число колоний подсчитывали через 8 дней

лоний – мы не обнаружили практически ни одной колонии на всей поверхности лунки (рис. 2, Г). При более детальном исследовании удалось выявить единичные клетки меланомы, которые дали отростки, характерные для меланоцитов. Вероятно, CD437 способствует выходу опухолевой клетки из клеточного цикла, а затем в условиях оптимальной ростовой среды становится возможной дифференцировка клеток меланомы в меланоцит. Таким образом, наши исследования выявили ранее не описанное в литературе влияние CD437 на блокирование миграционной и инвазивной активности опухолевой клетки, а также на ингибирование инициации колониеобразования и формирования сосудисто-подобных структур на Матригеле.

Исследование молекулярных механизмов, вовлеченных в антиметастатический эффект CD437, мы начали с оценки вклада CD437 в изменение экспрессии матриксных металлопротеиназ (ММР). ММР – семейство цинк-зависимых эндопептидаз, которые при злокачественных новообразованиях участвуют в процессах инвазии, миграции и ангиогенеза [14]. Было показано, что экспрессия ММР-9 в невусах была в 3 раза ниже, чем в тканях меланомы кожи, что подтверждало вовлечение ММР-2 и ММР-9 в злокачественный процесс [15]. Обнаружение ММР-9 на гистологических срезах меланомы сегодня рассматривается как независимый прогностический маркер метастатической опухоли [16]. Показано также, что ингибиторы ММР блокируют появление метастазов в биомоделях (блокируются как число метастазов, так и их размер) [17]. Определенный

интерес представляют опубликованные недавно данные об участии ММР в миграции, инвазии и оккупации периваскулярной ниши стволовыми клетками опухоли: внеклеточный матрикс, окружающий стволовые клетки опухоли, более восприимчив к деградации ММР [18]. В контрольных клетках экспрессия ММР-9 была значительно ниже, чем экспрессия ММР-2 (рис. 3). В присутствии CD437 экспрессия ММР-2 снижалась в 2 раза, а экспрессия ММР-9 – в 30 раз по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (рис. 3). Следует отметить, что снижение экспрессии ММР-2 и ММР-9 под воздействием ретиноида, наблюдаемое нами, может быть также одной из доминант блокирования формирования сосудисто-подобных структур: деградация внеклеточного матрикса также необходима для роста васкулярных каналов, высланных опухолевыми клетками [17]. Блокирование ретиноидом CD437 васкулогенной мимикрии, которая сегодня рассматривается как альтернативная система кровоснабжения опухоли, будет способствовать снижению агрессивности опухоли и повышению ее чувствительности к цитотоксической терапии. Таким образом, снижение экспрессии ММР под воздействием CD437, наблюдаемое нами, позволяет предположить, что потенциальная эффективность этого ретиноида может быть связана со снижением им агрессивного фенотипа клеток опухоли.

Следующей мишенью, способной снизить метастатический потенциал клеток меланомы в ответ на воздействие CD437, могла бы стать экспрессия CD44 и CD24. Оба антигена являются маркерами метастатической меланомы. Если экс-

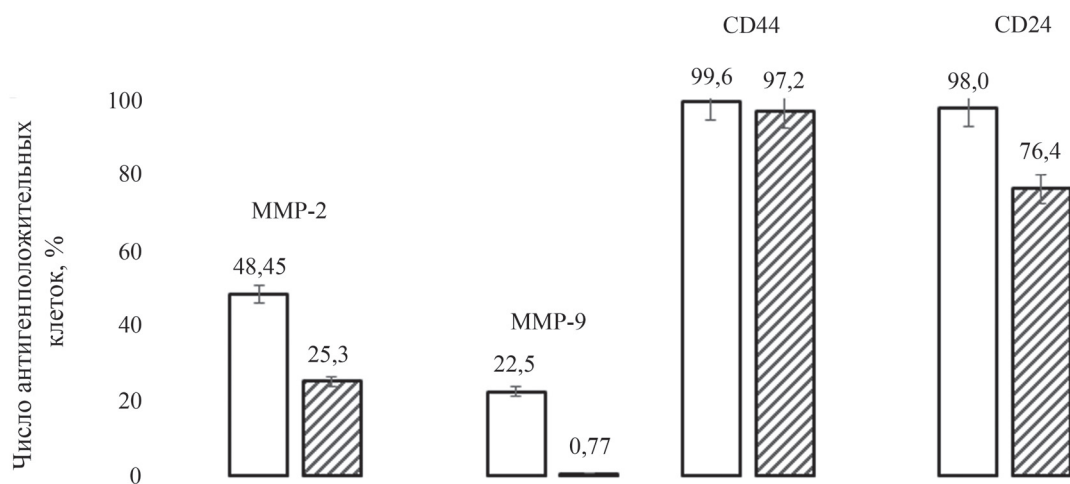


Рис. 3. Влияние CD437 на экспрессию маркеров метастазирования после 24 ч инкубации. Белые столбики соответствуют уровням экспрессии антигена в контрольных клетках, заштрихованные столбики соответствуют уровню экспрессии антигенов в присутствии CD437

прессия CD44 (трансмембранного рецептора гиалуроната) активирует МАРК и PI-3K-сигнальные пути запускающих неконтролируемую пролиферацию клеток меланомы, а также биосинтез и секрецию MMP-2 и MMP-9 [19], то экспрессия CD24 сопровождается активацией сигнального пути Notch в клетках меланомы [20]. Ранее нами было показано, что формирование васкулярных каналов опухолевыми клетками находится под контролем Notch сигнального пути [21]. Анализ экспрессии поверхностных антигенов показал, что CD437 практически не изменяет экспрессию CD44, и незначительно снижает экспрессию CD24, составляющую $23,6 \pm 2\%$ ($p < 0,05$) (рис. 3). По всей видимости, вклад CD437 в блокирование формирования сосудисто-подобных структур посредством активации CD24 будет существенным.

Заключение

Утрата программы клеточной гибели дает возможность опухолевой клетке сохранять жизнеспособность в присутствии высоких концентраций противоопухолевых препаратов и формировать опухолевую ткань, резистентную к лекарственному лечению. Достигнуть реактивации апоптоза в таких опухолевых клетках становится практически невозможным, опухоль переходит в

метастатическую фазу роста. Наличие метастазов ухудшает прогноз течения заболевания, поэтому блокирование формирования метастазов может стать эффективным способом продления ремиссии. В данном исследовании мы представляем экспериментальный материал, подтверждающий, что CD437 ингибирует миграционную и инвазивную активность клеток меланомы, экспрессию MMP-2 и MMP-9, а также васкулогенную мимикрию. CD437 не только не снижает число колоний или уменьшает их размеры в колониеобразующем тесте, но и подавляет инициацию образования колоний. Полученные нами результаты позволяют поднять вопрос о более детальном исследовании роли CD437 в лечении диссеминированной меланомы.

Работа выполнена в рамках программы исследований, запланированных в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (тема НИР: «Разработка и доклиническое исследование лекарственного средства ВЕЛ400, предназначенного для терапии опухолей», рег. № АААА-А20-120031190017-7).

Конфликта интересов нет.

Дополнительных материалов нет.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seyfried T.N., Huysentruyt L.C. // *Crit. Rev. Oncog.* 2013. Vol. 18. N 1–2. P. 43 (<https://doi.org/10.1615/critrevoncog.v18.i1-2.40>).
2. Gupta G.P., Massagué J. // *Cell.* 2006. Vol. 127. N 4. P. 679 (<https://doi.org/10.1016/j.cell.>).
3. Damsky W.E., Theodosakis N., Bosenberg M. // *Oncogene.* 2014. Vol. 33. N 19. P. 2413 (<https://doi.org/10.1038/onc.>).
4. Simon A., Kourie H.R., Kerger J. // *J. Chin. J. Cancer.* 2017. Vol. 36. N 1. P.10. (<https://doi.org/10.1186/s40880-017-0179-6>).
5. Doldo E., Costanza G., Agostinelli S., Tarquini C., Ferloto A., Arcuri G. // *Biomed. Res. Int.* 2015. P. 2015:624627 (<https://doi.org/10.1155/2015/624627>).
6. Alvarez S., Bourguet W., Gronemeyer H., de Lera A.R. // *Expert. Opin. Ther. Pat.* 2011. Vol. 21. N 1. P. 5563 (<https://doi.org/10.1517/13543776.2011.536531>).
7. di Masi A., Leboffe L., De Marinis E., Pagano F., Cicconi L., Rochette-Egly C. // *Mol. Aspects Med.* 2015. Vol. 41. P. 1 (<https://doi.org/10.1016/j.mam.2014.12.003>).
8. Langdon S.P., Rabiasz G.J., Ritchie A.A., Reichert U., Buchan P., Miller W.R. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1998. Vol. 42. N 5. P. 429 (<https://doi.org/10.1007/s002800050841>).
9. Zhao X., Spanjaard R.A. // *J Biomed. Sci.* 2003. Vol. 10. N 1. P. 44 (<https://doi.org/10.1007/BF02255996>).
10. Вартамян А.А., Хоченков Д.А., Кособокова Е.Н., Барышникова М.А., Косоруков В.С. // Российский биотерапевтический журнал. 2020. Т. 19. № 4. С. 63. (<https://doi.org/10.17650/1726.9784.2020.19.4.63>).
11. Vartanian A., Golubewa I. and Shprakh Z. // *Horizons in Cancer Res.* 2017. Vol. 65. P. 13.
12. Zhang J., Qiao L., Liang N., Xie J., Luo H., Deng G. // *J BUON.* 2016. Vol. 21. N 3. P. 533 (PMID: 27569069).
13. Maniotis A.J., Folberg R., Hess A., Seflor E.A., Gardner L.M., Pe'er J. // *Am. J. Pathol.* 1999. Vol. 155. N 3. P. 739 ([https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65173-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65173-5)).
14. Huang H. // *Sensors (Basel).* 2018. Vol. 18. N 10. P. 3249 (<https://doi.org/10.3390/s18103249>).
15. Bakos R.M., Bakos L., Edelweiss M.I., Cartell A., Mariante J.C., Masiero N.C. // *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2007. Vol. 23. N 6. P. 250 (<https://doi.org/10.1111/j.1600-0781.2007.00322.x>).
16. Kim H.K., Chae S.W., Woo K.I., Kim Y.D. // *Jpn J. Ophthalmol.* 2010. Vol. 54. N 3. P. 221 (<https://doi.org/10.1007/s10384-009-0793-1>).
17. Deryugina E.I., Quigley J.P. // *Cancer Metastasis Rev.* 2006. Vol. 25. N 1. P. 9. (<https://doi.org/10.1007/s10555-006-7886-9>).
18. Schnegg C.I., Yang M.H., Ghosh S.K., Hsu M.Y. // *Cancer Res.* 2015. Vol. 75. N 8. P. 1682. (<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1855>).
19. Ranuncolo S.M., Ladeda V., Gorostidy S., Morandi A., Varela M., Lastiri J. // *Expression of CD44s and CD44 splice variants in human melanoma. Oncol Rep.* 2002. Vol. 9. N 1. P. 51 (PMID: 11748454).

20. Tang M.R., Guo J.Y., Wang D., Xu N. // *Onco Targets Ther.* 2018. Vol. 11. P. 3401 (<https://doi.org/10.2147/OTT.S157043>).
21. Vartanian A., Gatsina G., Grigorieva I., Solomko E., Dombrovsky V., Baryshnikov A. // *Clin Exp Med.* 2013. Vol. 13. N 3. P. 201 (<https://doi.org/10.1007/s10238-012-0190-9>).

Поступила в редакцию 01.03.2021
Получена после доработки 04.03.2021
Принята к публикации 10.03.2021

CD437 REDUCES METASTATIC POTENTIAL OF MELANOMA CELLS

A.A. Vartanian*, Yu.A. Khochenkova, E.N. Kosobokova, M.A. Baryshnikova,
V.S. Kosorukov

(*Blokhin National Medical Research Center for Oncology, Moscow, Russia; *e-mail: zhivotov57@mail.ru*)

Synthetic retinoid CD437, an agonist of the retinoic acid receptor γ (RAR γ), in xenograft models demonstrates high potential for cancer treatment. The aim of this study was to investigate the melanoma cells metastatic potential alterations induced by CD437. 2D- and 3D-cell culture, migration “into the wound”, invasion, colony forming assay and flow cytometry were used in this study. Here we show that CD437 reduced the migration of Mel Z melanoma cells by $52 \pm 2\%$ compared to the positive control. The decrease in invasive activity of melanoma cells under the conditions of CD437 treatment did not exceed $40 \pm 4\%$. CD437 also blocked the formation of capillary-like structures by melanoma cells on Matrigel. The efficiency of colony formation by Mel Z cells in the control was quite high. However, we did not observe any colonies after 7 days of melanoma cells cultivation with non cytotoxic concentrations of CD437. Further, we showed that the expression of MMP-9 in Mel Z cells was significantly lower than the expression of MMP-2. CD437 reduced the expression of MMP-2 by half, and MMP-9 by 35 times compared to the control. We did not reveal the effect of CD437 on CD44 expression by melanoma cells, there was a slight decrease in CD24 expression ($23 \pm 2\%$). The data obtained suggest that CD437 reduces metastatic potential of melanoma cells.

Key words: CD437, melanoma cells, metastasis, MMP-2, MMP-9, CD44, CD24.

Сведения об авторах: Вартанян Амалия Арташевна – вед. науч. сотр. лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, докт. биол. наук (zhivotov57@mail.ru); Хоченкова Юлия Александровна – мл. науч. сотр. лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (julia_vet@bk.ru); Кособокова Екатерина Николаевна – ст. науч. сотр. лаборатории трансгенных препаратов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, канд. биол. наук (ekkos@mail.ru); Баришникова Мария Анатольевна – зав. лабораторией экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, канд. фарм. наук (ma_ba@mail.ru); Косоруков Вячеслав Станиславович – зав. лабораторией трансгенных препаратов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, канд. биол. наук (atgtga@mail.ru).