

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-60-68



# Детерминанты ферроптоза – потенциальные терапевтические мишени стволовых клеток глиобластомы

В.Е. Шевченко<sup>1</sup>, З.Н. Никифорова<sup>2</sup>, Т.И. Кушнир<sup>1</sup>, И.А. Кудрявцев<sup>1</sup>, А.А. Митрофанов<sup>1</sup>, А.Х. Бекашев<sup>1</sup>, Н.Е. Арноцкая<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации»; Россия, 123022 Москва, Звенигородское шоссе, 5

**Контакты:** Валерий Евгеньевич Шевченко [vshev2015@yandex.ru](mailto:vshev2015@yandex.ru)

**Введение.** Терапия мультиформной глиобластомы остается малоэффективной из-за быстроразвивающихся рецидивов опухоли, обусловленных высоким опухолевым потенциалом, резистентностью к химиолучевой терапии и повышенной диссеминацией стволовых клеток глиобластомы. Актуальной становится идентификация потенциальных терапевтических мишеней, позволяющих более эффективно уничтожать данные клетки. В связи с этим большое значение приобретает изучение ферроптоза (ФП), способного вызывать гибель опухолевых клеток с высокозлокачественным фенотипом. Однако ФП и его регуляторные пути в стволовых клетках глиобластомы до конца не изучены. В настоящее время также не ясно, чем отличается ФП в стволовых и дифференцированных клетках глиобластомы.

**Цель исследования** – методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения изучить экспрессию детерминант сигнального каскада ФП в CD133<sup>+</sup>-стволовых и CD133<sup>-</sup>-дифференцированных клетках глиобластомы.

**Материалы и методы.** Использовались протеомная масс-спектрометрия высокого разрешения и клеточные технологии.

**Результаты.** В целом идентифицированы 1970 белков, 15 из которых связаны с ФП и присутствуют в обеих популяциях клеток. Обнаружена положительная регуляция 12 детерминант ФП (ACSL1, ACSL3, COPZ1, FTH1, FTL, GPX1, GPX4, PCBP1, SLC3A2, TFRC, VDAC1, VDAC2) в CD133<sup>+</sup>-стволовых клетках глиобластомы по сравнению с CD133<sup>-</sup>-дифференцированными клетками глиобластомы, 10 из которых имели повышенную более чем в 2 раза экспрессию.

**Заключение.** Установлены важные закономерности в экспрессии детерминант ФП и протеинов, контролирующих этот процесс в стволовых клетках глиобластомы, которые могут использоваться при разработке новых подходов к обнаружению потенциальных мишеней для терапии мультиформной глиобластомы.

**Ключевые слова:** стволовые клетки глиобластомы, ферроптоз, мультиформная глиобластома, протеом, масс-спектрометрия

**Для цитирования:** Шевченко В.Е., Никифорова З.Н., Кушнир Т.И. и др. Детерминанты ферроптоза – потенциальные терапевтические мишени стволовых клеток глиобластомы. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(3):60–8. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-60-68

## Ferroptosis determinants – potential therapeutic targets glioblastoma stem cells

V.E. Shevchenko<sup>1</sup>, Z.N. Nikiforova<sup>2</sup>, T.I. Kushnir<sup>1</sup>, I.A. Kudryavtsev<sup>1</sup>, A.A. Mitrofanov<sup>1</sup>, A.Kh. Bekyashev<sup>1</sup>, N.E. Arnotskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality; 5 Zvenigorodskoe Shosse, Moscow 123022, Russia

**Contacts:** Valeriy Evgenievich Shevchenko [vshev2015@yandex.ru](mailto:vshev2015@yandex.ru)

**Introduction.** Treatment of glioblastoma multiforme remains little effective due to the rapidly developing recurrence of the tumor, due to its high tumorigenic potential, resistance to chemoradiation therapy and increased dissemination of glioma stem cells. The identification of potential therapeutic targets, which make it possible to more effectively destroy glioma stem cells, becomes topical. In this regard, the study of ferroptosis (FP), which can cause the death of tumor cells with a highly malignant phenotype, is of great importance. However, FP and its regulatory pathways in the GSC are not fully understood. At present, it is also not clear how FP differs for glioma stem cells and glioblastoma differentiated cells.

**Aim.** To study the expression of ferroptosis signaling cascade determinants in CD133<sup>+</sup> glioma stem cells and CD133<sup>-</sup> glioblastoma differentiated cells using high resolution proteomic mass spectrometry.

**Materials and methods.** High-resolution proteomic mass spectrometry, cell technologies.

**Results.** In total, 1970 proteins were identified, 15 of which are associated with ferroptosis and are present in both cell populations. Upregulation of 12 FP determinants (ACSL1, ACSL3, COPZ1, FTH1, FTL, GPX1, GPX4, PCBP1, SLC3A2, TFRC, VDAC1, VDAC2) was found in CD133<sup>+</sup> glioblastoma stem cells compared to CD133<sup>-</sup> differentiated glioblastoma cells, 10 of which were more than 2-fold overexpressed.

**Conclusion.** Important regularities have been established in the expression of ferroptosis determinants and proteins controlling this process in glioma stem cells, which can be used in the development of new approaches to the detection of potential targets for the therapy of glioblastoma multiforme.

**Keywords:** glioblastoma stem cells, ferroptosis, glioblastoma multiforme, proteome, mass spectrometry

**For citation:** Shevchenko V.E., Nikiforova Z.N., Kushnir T.I. et al. Ferroptosis determinants – potential therapeutic targets glioblastoma stem cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(3):60–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-60-68

## ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на прогресс, достигнутый в терапии рака, лечение мультиформной глиобластомы (МГБ) остается малоэффективным из-за быстроразвивающихся рецидивов опухоли [1]. При выполнении стандартного протокола комплексной терапии МГБ медиана выживаемости больных составляет 12–15 мес. Отчасти это объясняется тем, что МГБ имеет высокую степень внутриопухолевой гетерогенности как на клеточном, так и на генетическом уровне, что является препятствием для преодоления резистентности к лечению. Клетки МГБ, выходящие из первичной опухоли, быстро проникают в нормальную паренхиму головного мозга, образуя рецидивы. Такие инвазивные клетки относительно устойчивы к радио- и химиотерапии [2], что еще более усложняет лечение этого заболевания.

В значительной степени инвазивность и резистентность МГБ к генотоксической терапии связывают с субпопуляцией стволовых клеток глиобластомы (СКГ) [3], способных самообновляться, инициировать и поддерживать рост опухоли, образуя рецидив [4]. Идентификация СКГ изначально основывалась на способности клеток МГБ экспрессировать CD133 – белок клеточной поверхности [5]. Однако CD133 не является уникальным маркером СКГ. Исследования выявили дополнительные маркеры – CD15, A2B5, Notch1, CD44, EZH2, STAT3 и другие, – которые могут обеспечить повышенную специфичность СКГ в сочетании с CD133 [5]. Стволовые клетки глиобластомы представляют значительную клиническую проблему и создают трудности для успешной терапии МГБ. Актуальной становится идентификация потенциальных терапевтических мишеней, позволяющих более эффективно уничтожать СКГ. В связи с этим большое значение приобретает изучение ферроптоза (ФП), способного вызывать запрограммированную гибель опухолевых клеток с высококачественным фенотипом.

Ферроптоз морфологически, биохимически и генетически отличается от других форм гибели клеток,

включая апоптоз, некроз и аутофагию, и является железозависимым процессом [6, 7]. Именно по этой причине ФП получил свое название как отдельная форма гибели клеток. Активные формы кислорода (АФК) играют ведущую роль в запуске ФП и образуются в ходе реакции Фентона, а не при работе митохондриальной электрон-транспортной цепи [8]. Активные формы кислорода вызывают окисление практически любого вещества клетки, включая генетический аппарат, белки и липиды [9]. В последние годы достигнут значительный прогресс в понимании молекулярных механизмов ФП. Однако ФП и его регуляторные пути в СКГ до конца не изучены. В настоящее время также не ясно, чем отличается ФП в СКГ и дифференцированных клетках глиобластомы (ДКГ).

В настоящем исследовании впервые проведен протеомный анализ лизатов CD133<sup>+</sup>- и CD133<sup>-</sup>-клеток, полученных из глиомасфер линии клеток U87MG, для сравнения протеомов СКГ и ДКГ. Основное внимание уделялось дифференциально экспрессированным белкам ФП, играющего важную роль в гибели опухолевых клеток. Методом панорамной нано-высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии (нано-ВЭЖХ-МС/МС) в целом идентифицированы 1970 белков, 15 из которых связаны с ФП и присутствуют в обеих популяциях клеток. Обнаружена положительная регуляция 12 детерминант ФП (ACSL1, ACSL3, COPZ1, FTH1, FTL, GPX1, GPX4, PCBP1, SLC3A2, TFRC, VDAC1, VDAC2) в CD133<sup>+</sup>-СКГ по сравнению с CD133<sup>-</sup>-ДКГ. Полученные данные и выявленные закономерности, на наш взгляд, указывают на возможность таргетирования сигнального каскада ФП в CD133<sup>+</sup>-СКГ, что может использоваться при разработке новых терапевтических схем лечения мультиформной глиобластомы.

**Цель исследования** – методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения изучить экспрессию детерминант сигнального каскада ФП в CD133<sup>+</sup>-стволовых и CD133<sup>-</sup>-дифференцированных клетках глиобластомы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клеточные культуры.** Для получения глиомасфер использовали клетки МГБ человека линии U87MG (American Type Culture Collection, Manassas, VA, США), как описано ранее [10]. CD133<sup>+</sup>-СКГ выделяли методом иммуносортинга, используя магнитные шарики с иммобилизованными на них антителами к CD133 (CD133 MicroBeadKit, Miltenyi Biotec, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя, тогда как CD133<sup>-</sup> ДКГ свободно проходили через колонку [10]. Чистоту CD133<sup>+</sup>-СКГ оценивали методом проточной цитометрии с CD133-антителами (5–10 мкг/мл, MiltenyiBiotec, Германия); она превышала 90 % [10].

**Приготовление образцов для масс-спектрометрии.** Образцы клеток глиомасфер (CD133<sup>+</sup>- и CD133<sup>-</sup>-клетки) криоконсервировали в фосфатном буферном растворе при температуре –80 °С до использования. После оттаивания клетки лизировали и подвергали ультрафильтрации для удаления низкомолекулярных соединений [10]. После ферментативного расщепления образцы концентрировали при температуре 30 °С в центрифужном концентраторе LabconcoCentriVar (Labconco Corporation, США), растворяли в мобильной фазе (30 % ацетонитрила, 70 % воды и 0,1 % муравьиной кислоты, pH 2,7) и разделяли на 24 фракции [10]. Фракции упаривали досуха при 30 °С в центрифужном концентраторе Labconco CentriVar (Labconco Corporation, США) и повторно растворяли в 100 мкл 0,1 % муравьиной кислоты для масс-спектрометрического анализа.

**Масс-спектрометрический анализ.** Анализ триптических пептидов проводили с использованием нано-ВЭЖХ-Dionex Ultimate 3000 и масс-спектрометра LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с источником ионизации NanoSpray [10]. Масс-спектрометрические данные обрабатывали с помощью программ MaxQuant 1.6.17.0 (Biochemistry Computational Systems, Biochemistry Max Planck, Martinsried, Германия) и Perseus 1.6.0.7 (Max Planck Institute of Biochemistry, Германия).

**Биоинформатический анализ.** Биоинформатический анализ проводили с использованием программы DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; <https://david.ncifcrf.gov>), а также открытой базы данных PubMed ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)). Белок-белковые взаимодействия анализировали с помощью базы данных Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins v11.0 (STRING) (<https://string-db.org>), предназначенной для сбора, оценки и интегрирования всех общедоступных источников информации о белок-белковых взаимодействиях, а также для дополнения их расчетными прогнозами. Ее цель — создать комплексную и объективную глобальную сеть, включающую как прямые (физические), так и косвенные (функциональные) взаимодействия. В связи с этим по умолчанию в базе данных STRING для оценки комби-

нированного взаимодействия принята средняя достоверность >0,4.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изучения биологических процессов и сигнальных путей, отличающих CD133<sup>+</sup>-СКГ и CD133<sup>-</sup>-ДКГ, проводили сравнительный протеомный анализ лизатов этих клеток. Мы использовали label-free количественный нано-ВЭЖХ-МС/МС-метод для панорамного картирования протеомов 2 типов образцов (в триплетах). Анализ триптических пептидов с помощью программного обеспечения MaxQuant идентифицировал в целом 1970 белков при сопоставлении 47331 МС/МС-спектра с пептидными последовательностями в базе данных Swiss-Prot\_human с ложным уровнем обнаружения (false discovery rate, FDR) 1 % для тройных повторов 2 видов образцов.

Программа Perseus идентифицировала следующее количество белков в лизатах клеточных линий: CD133<sup>+</sup>-СКГ — 1873 белка по 9044 пептидам (7867 уникальных пептидов); CD133<sup>-</sup>-ДКГ — 1732 белка по 8739 пептидам (7562 уникальных пептида). Из них 89 % белков идентифицировали по совпадению 2 и более пептидов и 11 % — по совпадению 1 пептида. Процент сиквенс-покрытия исследуемых белков изменялся от 0,2 до 77,0 %. Коэффициент корреляции Пирсона между образцами CD133<sup>+</sup>-СКГ и CD133<sup>-</sup>-ДКГ варьировал от 0,74 до 0,93.

Идентифицированные протеины показали высокий процент перекрытия для 2 клеточных популяций: 1635 (83 % из 1970 белков) белков обнаружили в обеих клеточных линиях, 238 (12 %) — только в CD133<sup>+</sup>-СКГ, а 97 (5 %) — только в CD133<sup>-</sup>-ДКГ. Из 1635 протеинов, присутствующих в обеих клеточных линиях, статистически значимые изменения ( $p < 0,05$ ) экспрессии с кратностью >2 или <0,5 имели 595 протеинов и относились к дифференциально экспрессированным белкам. Использование 1 в качестве порогового логарифмического соотношения показало, что в CD133<sup>+</sup>-СКГ экспрессия 358 белков была выше, а экспрессия 237 белков — ниже по сравнению с CD133<sup>-</sup>-ДКГ.

Учитывая важную роль ФП в программируемой гибели опухолевых клеток, мы изучили экспрессию белков, связанных с этим сигнальным каскадом. В результате протеомного анализа идентифицированы 15 детерминант ФП. Как видно из данных, представленных в таблице, повышенную экспрессию наблюдали у 12 протеинов ( $p < 0,05$ ) — ACSL1 (ацил-КоА-синтетаза 1), ACSL3 (ацил-КоА-синтетаза 3), COPZ1 (коатомер субъединица дзета-1), FTH1 (тяжелая цепь ферритина 1), FTL (легкая цепь ферритина), GPX1 (глутатионпероксидаза 1), GPX4 (глутатионпероксидаза 4), PCBP1 (поли (rC) — связывающий протеин), SLC3A2 (тяжелая цепь антигена клеточной поверхности 4F2, TFRC (рецептор трансферрина), VDAC1 (потенциал-зависимый анионный канал 1), VDAC2 (потенциал-зависимый анионный канал 2), — из них

Детерминанты сигнального каскада ферроптоза, экспрессия которых различается ( $p < 0,05$ ) в CD133<sup>+</sup>-стволовых и CD133<sup>-</sup>-дифференцированных клетках глиобластомы

Determinants of the signaling cascade of ferroptosis, the expression of which differs ( $p < 0.05$ ) between CD133<sup>+</sup> stem and CD133<sup>-</sup> differentiated glioblastoma cells

Индекс гена Gene index	Название белка Protein name	Число идентифицированных пептидов Number of identified peptides	CD133 <sup>+</sup> -СКГ/CD133 <sup>-</sup> -ДКГ CD133 <sup>+</sup> -GSC/CD133 <sup>-</sup> -GDC
ACSL1	Ацил-КоА-синтетаза 1 Acyl-CoA synthetase long chain family member 1	2	25,6
ACSL3	Ацил-КоА-синтетаза 3 Acyl-CoA synthetase long chain family member 3	4	3,4
COPZ1	Коатомер субъединица дзета-1 Coatomer subunit zeta-1	1	2,2
FTH1	Тяжелая цепь ферритина 1 Ferritin heavy chain 1	6	2,1
FTL	Легкая цепь ферритина Ferritin light chain	4	19,3
GPX1	Глутатионпероксидаза 1 Glutathione peroxidase 1	4	2,2
GPX4	Глутатионпероксидаза 4 Glutathione peroxidase 4	1	3,1
PCBP1	Поли (rC) — связывающий протеин Poly (rC) binding protein 1	6	1,8
SLC3A2	Тяжелая цепь антигена клеточной поверхности 4F2 4F2 cell-surface antigen heavy chain	3	4,3
TFRC	Рецептор трансферрина Transferrin receptor	5	2,0
VDAC1	Потенциал-зависимый анионный канал 1 Voltage dependent anion channel 1	8	1,8
VDAC2	Потенциал-зависимый анионный канал 2 Voltage dependent anion channel 2	6	2,5

**Примечание.** СКГ — стволовые клетки глиобластомы; ДКГ — дифференцированные клетки глиобластомы.

Note. GSC — glioblastoma stem cells; GDC — differentiated glioblastoma cells.

10 дифференциально экспрессированных белков имели повышенную экспрессию (более чем в 2 раза) в CD133<sup>+</sup>-СКГ по сравнению с CD133<sup>-</sup>-ДКГ. Достоверно не изменяли экспрессию 3 протеина (ACSL4, GPX8, VDAC3). Согласно данным, представленным в таблице, в СКГ наблюдались значительные изменения в экспрессии детерминант ФП по сравнению с ДКГ. Дисрегуляция касалась как белков, участвующих в ФП 1-го (SLC3A2) и 2-го (GPX1, GPX4, VDAC1, VDAC2) типов, так и регуляторных протеинов (ACSL1, ACSL3, COPZ1). Существенные различия в протеомах 2 популяций опухолевых клеток наблюдались и для белков, участвующих в метаболизме железа (FTH1, FTL, PCBP1, TFRC).

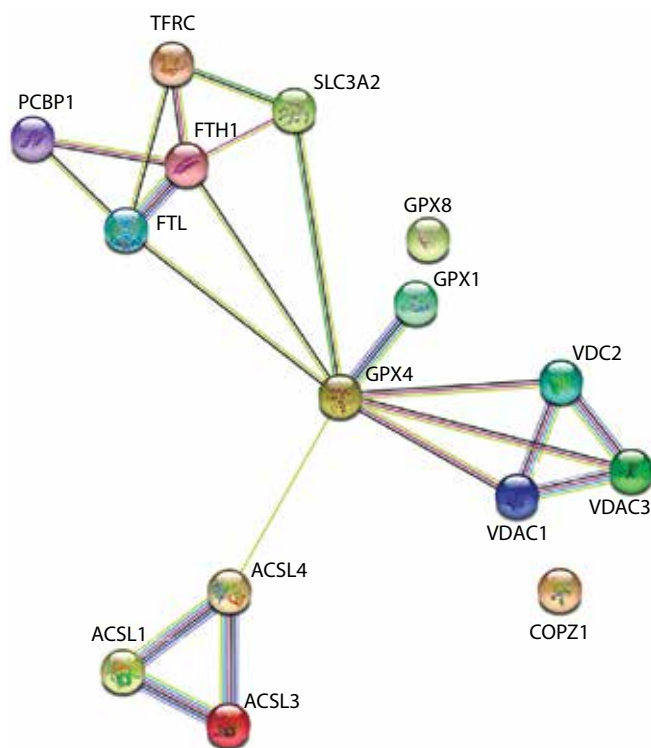
## ОБСУЖДЕНИЕ

В последнее время отмечается повышенный интерес к новым видам программируемой клеточной

гибели: некроптозу, ФП и пироптозу. В настоящей работе основное внимание уделяется ФП, играющему важную роль в процессах гибели опухолевых клеток. Согласно последним исследованиям патогенез глиом связан со снижением ФП в опухолевых клетках, что ускоряет пролиферацию и метастазирование глиом [11], способствует злокачественной трансформации и процессам ангиогенеза в глиомах [12]. Сообщается, что темозоломид, широко применяемый при терапии глиом, убивает опухолевые клетки и СКГ несколькими способами, включая ФП, и его эффективность можно повысить, индуцируя этот процесс [13]. Кроме того, маркеры ФП могут использоваться для прогнозирования выживаемости больных глиомами [14]. Учитывая важность ФП в онкогенезе, запущена база данных FerrDB по обзору регуляторов и маркеров ФП [15].

В данном исследовании впервые выполнен сравнительный протеомный анализ CD133<sup>+</sup>-СКГ



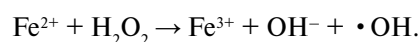


Белок-белковые взаимодействия 15 идентифицированных детерминант сигнального каскада ферроптоза, полученные с помощью веб-сайта STRING

Protein-protein interactions of 15 identified determinants of the ferroptosis signaling cascade, obtained from the STRING website

и CD133<sup>+</sup>-ДКГ. Мы идентифицировали 1970 белков, из которых к детерминантам сигнального каскада ФП относились 15 белков. Как видно из данных, представленных в таблице, положительную регуляцию в CD133<sup>+</sup>-СКГ наблюдали у 12 протеинов, 10 из которых (ACSL1, ACSL3, COPZ1, FTH1, FTL, GPX1, GPX4, SLC3A2, TFRC, VDAC2) имели повышенную более чем в 2 раза экспрессию. Интерактомное картирование с использованием базы данных STRING выполняли для 15 идентифицированных детерминантов ФП, чтобы установить их ассоциированных партнеров в сети белок-белковых взаимодействий. Согласно результатам функциональной ассоциации между белками ФП, представленным на рисунке, большинство из них тесно связаны друг с другом через скоординированную интерактивную сеть.

В регуляции метаболизма железа и редокс-дисбаланса при ФП участвуют митохондрии, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и лизосомы, что указывает на комплексную сигнальную сеть, контролирующую и обуславливающую ФП. Как отмечалось ранее, в основе ФП лежит реакция Фентона:



В результате этой реакции избыток железа, не связанный с ферритином или ферропортином, генерирует гидроксил-радикалы [6, 8]. В настоящее время

считается, что характерной особенностью ФП является железозависимое перекисное окисление липидов (ПОЛ), повреждающее плазматическую мембрану и мембраны внутриклеточных органелл клетки. Основной мишенью гидроксил-радикала являются полиненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов биомембран [16]. Синглетный кислород также участвует в ПОЛ, образуя гидропероксиды липидов из холестерина и этерифицированных липидов [17].

Семейство длинноцепочечных ацил-КоА-синтетаз (ACSL) играет важную роль в ФП и включает 5 изоформ — ACSL1 и ACSL3–6, — имеющих различные внутриклеточные локализации и субстратную специфичность. Протеомный анализ идентифицировал ACSL1, ACSL3 и ACSL4. Уровни ACSL1 и ACSL3 были увеличены в СКГ по сравнению с ДКГ в 25,6 и 3,4 раза соответственно (см. таблицу), тогда как экспрессия ACSL4 достоверно не изменялась. Все изоформы ACSL относились к детерминантам ФП, однако их роль в этом процессе и канцерогенезе в целом пока изучена недостаточно. ACSL1 и ACSL3 высоко экспрессируются при некоторых видах рака и коррелируют с плохим прогнозом. Ацил-КоА-синтетаза 1 участвует в опосредованном ФНО-α (фактором некроза опухоли α) провоспалительном фенотипе клеток и в основном способствует прогрессированию рака [18]. Гиперэкспрессия ACSL3 вызывала абсорбцию олеиновой кислоты и повышала резистентность опухолевых клеток к окислительному стрессу. Олеиновая кислота защищала клетки меланомы от ФП ACSL3-зависимым образом и способствовала отдаленному метастазированию [19].

Недавние исследования показали, что уровни белка ACSL4 снижены в тканях и клетках глиомы человека, что указывает на его связь с ФП и пролиферацией клеток глиомы [20, 21]. Индукторы ФП увеличивают экспрессию ACSL4, усиливают выработку ω-6 полиненасыщенных жирных кислот и активируют ФП [22].

Таким образом, учитывая особенности экспрессии трех детерминант ФП — ACSL1, ACSL3 и ACSL4 — в СКГ и ДКГ, можно сделать вывод о том, что они имеют перспективу стать новыми терапевтическими мишенями для СКГ.

При исследовании ФП были открыты как его индукторы (эрастин, RSL3, RSL5), так и ингибиторы (хелаторы железа, витамин E) [23]. Ферроптоз по морфологическим, биохимическим и генетическим особенностям отличается от апоптоза, аутофагии и программируемого некроза. Для ФП характерны такие морфологические изменения, как сжатие клетки и сокращение размеров митохондрий, уменьшение и даже исчезновение митохондриальных крист. Наблюдается также повышение плотности внутренних мембран митохондрий, однако клеточное ядро остается интактным и лишено свертывания хроматина, в отличие от апоптоза [24].

Регулируемая гибель клетки по типу ФП индуцируется препаратами, снижающими уровень глутатиона

(GSH) в клетке или активность глутатион-пероксидазы (GPx) [25]. Помимо каталазы и супероксиддисмутазы, GPx представляют собой 1-ю линию защиты клеток от окислительного стресса, регулируя клеточный редокс-баланс [26]. Глутатионпероксидаза катализирует восстановление перекисей липидов в соответствующие спирты и пероксида водорода в воду [27]. Оба класса индукторов ФП ведут к аккумуляции в клетках АФК и продуктов ПОЛ биомембран.

Ингибирование системы xCT-Cys/Glu или уменьшение синтеза GSH инициирует ФП 1-го типа в раковых клетках [28]. С помощью системы xCT (цистин-глутамат антипортер) внутриклеточный глутамат выводится, а внеклеточный цистин транспортируется в клетку и участвует в синтезе GSH, который необходим для оптимальной активности глутатион-пероксидазы 4 (GPX4) — ключевого регулятора ФП. К настоящему моменту установлено, что транспортер является гетеродимером и состоит из субъединиц легкой (SLC7A11) и тяжелой (SLC3A2) цепи [29]. Экспрессия системы xCT часто активируется в раковых клетках, включая клетки глиобластомы, и ее экспрессия коррелирует с ростом опухоли и плохими показателями выживаемости [30]. Как видно из данных, представленных в таблице, экспрессия субъединицы SLC3A2 увеличена в СКГ в 4,3 раза по сравнению с ДКГ, что указывает на важность внутриклеточного транспорта цистина для предотвращения окислительного стресса и гибели СКГ. Однако то, как активность xCT регулируется в раковых клетках, до конца не изучено.

Прямое ингибирование GPX4 приводит к развитию ФП 2-го типа. Глутатион-пероксидазы — семейство 8 ферментов, защищающих организм от повреждения АФК [31]. Глутатион-пероксидаза 4 считается основным поглотителем гидроперекисей фосфолипидов или холестерина, в том числе включенных в липопротеины или биомембраны [32]. Она катализирует восстановление гидроперекисей липидов в соответствующие спирты, используя GSH как кофактор, и является главным внутриклеточным ингибитором ФП. Отмечен более высокий уровень GPX4 в тканях и клетках глиомы человека по сравнению со здоровой тканью и глиальными клетками, что указывает на снижение ФП при глиоме как *in vivo*, так и *in vitro*. Нокдаун *GPX4* ингибирует пролиферацию и миграцию клеток глиомы, а сайленсинг *GPX4* гена может индуцировать апоптоз [22]. Таким образом, GPX4 можно рассматривать как новый прогностический фактор при глиоме, который тесно коррелирует с пролиферацией, миграцией и апоптозом опухолевых клеток [33].

При сравнительном анализе протеомов CD133<sup>+</sup>-СКГ и CD133<sup>-</sup>-ДКГ идентифицированы 3 типа GPx: GPX1, GPX4 и GPX8.

По данным, представленным в таблице, экспрессия GPX4 в CD133<sup>+</sup>-СКГ больше в 3 раза по сравнению с CD133<sup>-</sup>-ДКГ, а GPX1 — примерно в 2 раза, тогда как экспрессия GPX8 достоверно не изменялась.

Повышенная экспрессия GPX1 и GPX4 делает СКГ более устойчивыми к ФП, чем ДКГ, и позволяет рассматривать эти детерминанты ФП в качестве потенциальных терапевтических мишеней для СКГ.

В настоящее время установлено, что потенциал-зависимые анионные каналы (voltage-dependent anion channels, VDAC) ответственны за поступление ионов и небольших молекул из цитоплазмы в межмембранное пространство митохондрий [34]. Регуляция активности этих каналов служит тем механизмом, который изменяет обмен метаболитами между митохондриями и цитоплазмой. Анализ протеомов СКГ и ДКГ идентифицировал 3 протеина этого семейства: VDAC1, VDAC2 и VDAC3. По ранее полученным данным, VDAC1 определен как многофункциональный белок и является динамическим регулятором глобальных митохондриальных функций [35], а также участвует в апоптозе [36]. Роль VDAC1 в ФП до конца не установлена. VDAC1 гиперэкспрессируется при многих типах рака [35], в том числе при МГБ [37]. Связывание VDAC1 с гексокиназой (HK1 и HK-II) регулирует гликолиз [38], а также, по-видимому, защищает опухолевые клетки от гибели [39]. Как видно из данных, представленных в таблице, экспрессия VDAC1 в СКГ повышена в 1,8 раза по сравнению с ДКГ. По нашим данным, увеличение экспрессии в 3,1 раза наблюдалось также и для HK1 в СКГ по сравнению с ДКГ.

Эрастин индуцирует ФП, непосредственно связываясь с VDAC2/3, изменяя проницаемость внешней митохондриальной мембраны и тем самым снижая уровень окисления никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) [40]. Однако механизм, с помощью которого эрастин вызывает специфическое подавление VDAC2/3, до конца не изучен.

По данным нашего протеомного анализа, повышенная экспрессия (выше в 2,5 раза) в СКГ наблюдалась в VDAC2, тогда как уровень VDAC3 достоверно не изменялся. Следует отметить, что сверхэкспрессия VDAC2 или VDAC3 по отдельности не влияла на эрастин-индуцированный ФП, но VDAC2 и VDAC3 вместе способствовали его возникновению [40].

Как уже отмечалось, ФП тесно связан с метаболизмом железа и ПОЛ. Наши исследования показали значительные изменения метаболизма железа в СКГ по сравнению с ДКГ. Согласно данным, представленным в таблице, дисрегуляция наблюдалась у рецептора трансферрина (transferrin receptor protein, TFR), FTH1, FTL. Из-за важной роли железа в клеточных процессах его уровни жестко контролируются с помощью сети белков, регулирующих его поглощение, хранение, рециркуляцию и утилизацию как на системном, так и на клеточном уровне [41]. Железо представлено в клетках в 2 формах: Fe (II) и Fe (III). Двухвалентное железо участвует в переносе электронов и обладает высокой растворимостью, Fe (II) — содержащие белки всегда служат кофакторами и катализаторами, участвующими

в различных окислительно-восстановительных реакциях, тогда как запасается и транспортируется железо в стабильной форме Fe (III). Железо может быть токсичным для клеток, и при избытке его атомы способны отдавать электроны  $O_2$  и  $H_2O_2$  для генерации супероксидного анион-радикала и гидроксильного радикала, повреждающих клетки [42]. Однако исследования показали, что избыток АФК, генерируемых железом, может способствовать опухолевой прогрессии [43, 44], в то время как железозависимое накопление АФК вызывает ФП. Для объяснения этого противоречия была выдвинута гипотеза, что в раковой клетке редокс-сигналы железа и тиола поддерживают баланс, помогая клетке избежать ФП [45].

Внутриклеточное поступление железа осуществляется в основном эндоцитозом комплекса трансферрина с Fe (III), связанного с высокоаффинным TFR1 на клеточной поверхности и последующим высвобождением железа в цитоплазму [46]. Рецептор трансферрина 1 высоко экспрессируется при многих видах рака, включая глиому, и участвует в росте опухоли, что указывает на повышенную потребность в железе раковых клеток [47]. По нашим данным (см. таблицу), экспрессия TFRC в СКГ была даже выше в 2 раза, чем в ДКГ. Тем не менее остается неясным, как железо управляет опухолеспецифическими сигнальными каскадами и/или предпочтительно ли железо используется отдельными клетками в гетерогенной популяции опухоли, такой как глиобластома.

После попадания в клетку железо в виде Fe (III) связывается с ферритином, выполняющим роль основного внутриклеточного депо железа. Ферритин представляет собой гетерополимер, образованный субъединицами FTH1 и FTL. Высвобождение железа из ферритина жестко контролируется [48]. Клиническое значение ферритина для опухолевого роста продемонстрировано при некоторых видах рака. Ферритин участвует в онкогенезе, действуя как аутокринный фактор роста [49]. Таргетирование ферритина повышает чувствительность клеток глиомы к химиотерапии [50]. По мнению D.L. Schonberg и соавт., изменение доступности железа в СКГ устраняет драйверы фенотипа стволовых клеток, а ферритин представляет собой важную мишень для уничтожения зависимых от железа СКГ [51]. Результаты нашего исследования подтверждают увеличение уровня ферритина в СКГ. Согласно данным, представленным в таблице, экспрессия FTH1 и FTL повышена в CD133<sup>+</sup>-СКГ по сравнению с CD133<sup>-</sup>-ДКГ в 2,1 и 19,3 раза соответственно. Эти результаты показывают, что накопление железа имеет решающее значение для образования опухолей. Не связанный с ферритином избыток неконтролируемого железа, вероятно, блокирует шаги, необходимые для размножения СКГ, и создает среду, благоприятную для формирования опухолей [51].

Ранее показано, что PCBP1 [52] и COPZ1 [53] участвуют в ФП. Поли (rC) — связывающий протеин 1 подавляет аутофагию, важную для ФП, и является основным шапероном железа, облегчающим его загрузку в ферритины. Супрессия PCBP1 активирует синтез липидов и изменение клеточного липидного состава, создающее благоприятные условия для ПОЛ и ФП в раковых клетках [54]. Белок COPZ1 регулирует внутриклеточный транспорт, созревание эндосом, липидный гомеостаз, аутофагию [55] и связан с метаболизмом железа через регуляцию уровня трансферрина [56]. Уровни COPZ1 значительно повышены при МГБ по сравнению с неопухолевыми образцами ткани головного мозга. Нокдаун *COPZ1* приводил к деградации ферритина и последующему увеличению внутриклеточного уровня Fe (II) и в конечном счете к ФП [57]. По нашим данным (см. таблицу), экспрессия PCBP1 увеличена в СКГ в 1,8 раза, а COPZ1 — в 2,2 раза по сравнению с ДКГ. Таким образом, супрессия PCBP1 и COPZ1 является перспективным подходом к стимулированию ФП в СКГ.

Основываясь на полученных результатах, можно сделать вывод о том, что метаболизм железа и ПОЛ являются центральными медиаторами ФП как в СКГ, так и в ДКГ, индукция которого находится в прямой зависимости от пула GSH — эндогенного антиоксиданта клетки. Представленные данные показывают, что сигнальный каскад ФП менее активен в CD133<sup>+</sup>-СКГ по сравнению с CD133<sup>-</sup>-ДКГ. Этот феномен имеет большое значение для более эффективного уничтожения СКГ при использовании терапевтических схем, содержащих индукторы ФП.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения проведено сравнительное картирование протеомов CD133<sup>+</sup>-СКГ и CD133<sup>-</sup>-ДКГ. Основное внимание уделялось изучению сигнального каскада ФП, играющего важную роль в программируемой клеточной гибели. Из 1970 идентифицированных белков 15 являлись детерминантами сигнального каскада ФП. В СКГ по сравнению с ДКГ обнаружена положительная регуляция 12 протеинов ФП, 10 из которых (ACSL1, ACSL3, COPZ1, FTH1, FTL, GPX1, GPX4, SLC3A2, TFRC, VDAC2) имели повышенную более чем в 2 раза экспрессию и могут рассматриваться в качестве потенциальных терапевтических мишеней для СКГ. Отмечена дисрегуляция в уровнях белков ФП 1-го и 2-го типов, регуляторных протеинов и белков, участвующих в метаболизме железа. Согласно представленным данным сигнальный каскад ФП менее активен в CD133<sup>+</sup>-СКГ по сравнению с CD133<sup>-</sup>-ДКГ, что имеет важное значение для более эффективного уничтожения СКГ при использовании терапевтических схем, содержащих индукторы ФП.



## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Huse J.T., Holland E.C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer* 2010;10(5):319–31. DOI: 10.1038/nrc2818
- Chinnaiyan P., Won M., Wen P.Y. et al. A randomized phase II study of everolimus in combination with chemoradiation in newly diagnosed glioblastoma: results of NRG Oncology RTOG 0913. *Neuro Oncol* 2018;20(5):666–73. DOI: 10.1093/neuonc/nox209
- Roos A., Ding Z., Loftus J.C., Tran N.L. Molecular and microenvironmental determinants of glioma stem-like cell survival and invasion. *Front Oncol* 2017;7:120. DOI: 10.3389/fonc.2017.00120
- Chen J., McKay R.M., Parada L.F. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models and stem cells. *Cell* 2012;149(1):36–47. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.009
- Muftuoglu Y., Pajonk F. Targeting glioma stem cells. *Review Neurosurg Clin N Am* 2021; 32(2):283–9. DOI: 10.1016/j.nec.2021.01.002
- 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
- Zaffagnini G., Martens S. Mechanisms of selective autophagy. *J Mol Biol* 2016;428(9):1714–24. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.02.004
- Winterbourn C.C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett* 1995;82–83:969–74. DOI: 10.1016/0378-4274(95)03532-x
- 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
- Bryukhovetskiy A., Shevchenko V., Kovalev S. et al. To the novel paradigm of proteome-based cell therapy of tumors: through comparative proteome mapping of tumor stem cells and tissue-specific stem cells of humans. *Cell Transplant* 2014;23:151–70. DOI: 10.3727/096368914X684907
- Fan Z., Wirth A.K., Chen D. et al. Nrf2-Keap1 pathway promotes cell proliferation and diminishes ferroptosis. *Oncogenesis* 2017;6(8):e371. DOI: 10.1038/oncsis.2017.65
- Chen D., Fan Z., Rauh M. et al. ATF4 promotes angiogenesis and neuronal cell death and confers ferroptosis in a xCT-dependent manner. *Oncogene* 2017;36(40):5593–608. DOI: 10.1038/ncr.2017.146
- Buccarelli M., Marconi M., Pacioni S. et al. Inhibition of autophagy increases susceptibility of glioblastoma stem cells to temozolomide by igniting ferroptosis. *Cell Death Dis* 2018;9(8):841. DOI: 10.1038/s41419-018-0864-7
- Dahlmanns M., Yakubov E., Dahlmanns J.K. Genetic profiles of ferroptosis in malignant brain tumors and off-target effects of ferroptosis induction. *Front Oncol* 2021;11:783067. DOI: 10.3389/fonc.2021.783067
- Zhou N., Bao J. FerrDb: a manually curated resource for regulators and markers of ferroptosis and ferroptosis-disease associations. *Database (Oxford)* 2020;2020:baaa021. DOI: 10.1093/database/baaa021
- Yang W.S., Kim K.J., Gaschler M.M. et al. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113(34):E4966–75. DOI: 10.1073/pnas.1603244113
- Hauck A.K., Bernlohr D.A. Oxidative stress and lipotoxicity. *J Lipid Res* 2016;57(11):1976–86. DOI: 10.1194/jlr.R066597
- Zhang Q., Zhou W., Yu S. et al. Metabolic reprogramming of ovarian cancer involves ACSL1-mediated metastasis stimulation through upregulated protein myristoylation. *Oncogene* 2021;40:97–111. DOI: 10.1038/s41388-020-01516-4
- Ubellacker J.M., Tasdogan A., Ramesh V. et al. Lymph protects metastasizing melanoma cells from ferroptosis. *Nature* 2020;585:113–8. DOI: 10.1038/s41586-020-2623-z
- Ma L.L., Liang L., Zhou D. et al. Tumor suppressor miR-424-5p abrogates ferroptosis in ovarian cancer through targeting ACSL4. *Neoplasma* 2021;68:165–73. DOI: 10.4149/neo\_2020\_200707N705
- Cheng J., Fan Y.Q., Liu B.-H. et al. ACSL4 suppresses glioma cells proliferation via activating ferroptosis. *Oncology Reports* 2020;43:147–58. DOI: 10.3892/or.2019.7419
- Yuan H., Li X., Zhang X. et al. Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;478:1338–43. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.08.124
- Lachiaer E., Louandre C., Godin C. et al. Sorafenib induces ferroptosis in human cancer cell lines originating from different solid tumors. *Anticancer Res* 2014;34(11):6417–22.
- Dixon S.J. Ferroptosis: bug or feature? *Immunol Rev* 2017;277(1):150–7. DOI: 10.1111/imr.12533
- Meister A. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* 1995;251:3–7. DOI: 10.1016/0076-6879(95)51106-7
- Ighodaro O.M., Akinloye O.A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alex J Med* 2019;54(4):287–93. DOI: 10.1016/j.ajme.2017.09.001
- Brigelius-Flohe R., Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(5):3289–303. DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020
- Yang W.S., SriRamaratnam R., Welsch M.E. et al. Regulation of ferroptotic cancer death by GPX4. *Cell* 2014;156(1–2):317–31. DOI: 10.1016/j.cell.2013.12.010
- Bridges R.J., Natale N.R., Patel S.A. System xc(-) cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. *Br J Pharmacol* 2012;165(1):20–34. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01480.x
- Takeuchi S., Wada K., Toyooka T. et al. Increased xCT expression correlates with tumor invasion and outcome in patients with glioblastoma. *Neurosurgery* 2013;72(1):33–41. DOI: 10.1227/NEU.0b013e318276b2de
- Farinati F., Cardin R., Maria N.D. et al. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. *J Hepatol* 1995;22(4):449–56. DOI: 10.1016/0168-8278(95)80108-1
- Thomas J.P., Maiorino M., Ursini F., Girotti A.W. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J Biol Chem* 1990;265(1):454–61.
- Zhao H., Ji B., Chen J. et al. Gpx 4 is involved in the proliferation, migration and apoptosis of glioma cells. *Pathol Res Pract* 2017;213(6):626–33. DOI: 10.1016/j.prp.2017.04.025
- Maldonado E.N., Sheldon K.L., DeHart D.N. et al. Voltage-dependent anion channels modulate mitochondrial metabolism in cancer cells: regulation by free tubulin and erastin. *J Biol Chem* 2013;288(17):11920–9. DOI: 10.1074/jbc.M112.433847
- Shoshan-Barmatz V., Ben-Hail D., Admoni L. et al. The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1 in tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 2015;1848(10):2547–75. DOI: 10.1016/j.bbame.2014.10.040
- Shoshan-Barmatz V., De Pinto V., Zweckstetter M. et al. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol Aspects Med* 2010;31(3):227–85. DOI: 10.1016/j.mam.2010.03.002
- Feichtinger R.G., Weis S., Mayr J.A. et al. Alterations of oxidative phosphorylation complexes in astrocytomas. *Glia* 2014;62(4):514–25. DOI: 10.1002/glia.22621
- Pedersen P.L. Voltage dependent anion channels (VDACs): a brief introduction with a focus on the outer mitochondrial compartment's roles together with hexokinase-2 in the “Warburg effect” in cancer. *J Bioenerg Biomembr* 2008;40(3):123–6. DOI: 10.1007/s10863-008-9165-7



39. Arzoine L., Zilberberg N., Ben-Romano R., Shoshan-Barmatz V. Voltage-dependent anion channel 1-based peptides interact with hexokinase to prevent its anti-apoptotic activity. *J Biol Chem* 2009;284(6):3946–55. DOI: 10.1074/jbc.M803614200
40. Yagoda N., Rechenberg M., Zaganjor E. et al. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature* 2007;447(7146):864–8. DOI: 10.1038/nature05859
41. Hentze M.W., Muckenthaler M.U., Galy B., Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 2010;142(1):24–38. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.028
42. Pignatello J.J., Oliveros E., MacKay A. Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the fenton reaction and related chemistry. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2006;36(1):1–84. DOI: 10.1080/10643380500326564
43. Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 1997;387(3):147–63. DOI: 10.1016/S1383-5742(97)00035-5
44. Toyokuni S. Iron and carcinogenesis: from fenton reaction to target genes. *Redox Rep* 2002;7(4):189–97. DOI: 10.1179/135100002125000596
45. Toyokuni S., Ito F., Yamashita K. et al. Iron and thiol redox signaling in cancer: an exquisite balance to escape ferroptosis. *Free Radic Biol Med* 2017;108:610–26. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.024
46. Torti S.V., Torti F.M. Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat Rev Cancer* 2013;13(5):342–55. DOI: 10.1038/nrc3495
47. Daniels T.R., Delgado T., Rodriguez J.A. et al. The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin Immunol* 2006;121(2):144–58. DOI: 10.1016/j.clim.2006.06.010
48. Kurz T., Terman A., Gustafsson B. et al. Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. *Histochem. Cell Biol* 2008;129:389–406. DOI: 10.1007/s00418-008-0394-y
49. Coffman L.G., Parsonage D., D'Agostino R. et al. Regulatory effects of ferritin on angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:570–5. DOI: 10.1073/pnas.0812010106
50. Liu X., Madhankumar A.B., Slagle-Webb B. et al. Heavy chain ferritin siRNA delivered by cationic liposomes increases sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 2011;71:2240–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1375
51. Schonberg D.L., Miller T.E., Wu Q. et al. Preferential iron trafficking characterizes glioblastoma stem-like cells. *Cancer Cell* 2015;28(4):441–55. DOI: 10.1016/j.ccr.2015.09.002
52. Ryu M.S., Zhang D., Protchenko O. et al. PCBP1 and NCOA4 regulate erythroid iron storage and heme biosynthesis. *J Clin Invest* 2017;127(5):1786–97. DOI: 10.1172/JCI90519
53. Beck R., Ravet M., Wieland F.T., Cassel D. The COPI system: molecular mechanisms and function. *FEBS Lett* 2009;583(17):2701–9. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.07.032
54. Protchenko O., Baratz E., Jadhav S. et al. Iron chaperone poly rC binding protein protects mouse liver from lipid peroxidation and steatosis. *Hepatology* 2021;73(3):1176–93. DOI: 10.1002/hep.31328
55. Razi M., Chan E.Y., Tooze S.A. Early endosomes and endosomal coatome are required for autophagy. *J Cell Biol* 2009;185(2):305–21. DOI: 10.1083/jcb.200810098
56. Collinet C., Stoter M., Bradshaw C.R. et al. Systems survey of endocytosis by multiparametric image analysis. *Nature* 2010;464(7286):243–9. DOI: 10.1038/nature08779
57. Zhang Y., Kong Y., Ma Y. et al. Loss of COPZ1 induces NCOA4 mediated autophagy and ferroptosis in glioblastoma cell lines. *Oncogene* 2021;40(8):1425–39. DOI: 10.1038/s41388-020-01622-3

#### Вклад авторов

В.Е. Шевченко: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста статьи;

З.Н. Никифорова: подготовка образцов для анализа;

Т.И. Кушнир: статистический анализ данных;

И.А. Кудрявцев: получение протеома клеток мультиформной глиобластомы;

А.А. Митрофанов: обзор публикаций по теме статьи;

А.Х. Бекашев: научное редактирование статьи;

Н.Е. Арноцкая: получение масс-спектрометрических данных, редактирование статьи.

#### Authors' contributions

V.E. Shevchenko: developing the research design, analysis of the received data, article writing;

Z.N. Nikiforova: preparation of samples for analysis;

T.I. Kushnir: statistical data analysis;

I.A. Kudryavtsev: obtaining proteome of glioblastoma multiforme cells;

A.A. Mitrofanov: review of publications on the topic of the article;

A.Kh. Bekyashev: scientific editing;

N.E. Arnotskaya: obtaining mass spectrometric data, editing editing.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

В.Е. Шевченко / V.E. Shevchenko: <https://orcid.org/0000-0002-0401-9900>

З.Н. Никифорова / Z.N. Nikiforova: <https://orcid.org/0000-0001-7657-3735>

Т.И. Кушнир / T.I. Kushnir: <https://orcid.org/0000-0001-9626-6847>

И.А. Кудрявцев / I.A. Kudryavtsev: <https://orcid.org/0000-0001-7588-1066>

А.А. Митрофанов / A.A. Mitrofanov: <https://orcid.org/0000-0002-4125-7342>

А.Х. Бекашев / A.Kh. Bekyashev: <https://orcid.org/0000-0002-4160-9598>

Н.Е. Арноцкая / N.E. Arnotskaya: <https://orcid.org/0000-0002-0154-8604>

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

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

**Финансирование.** Финансируется в рамках госбюджетной темы № 2021-76.

**Funding.** It is funded under the state budget theme No. 2021-76.

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

**Compliance with patient rights and principles of bioethics.** This article does not describe any research involving humans or animals as subjects.

**Статья поступила:** 17.05.2022. **Принята к публикации:** 27.06.2022.

**Article submitted:** 17.05.2022. **Accepted for publication:** 27.06.2022.