

<https://doi.org/10.35401/2500-0268-2021-23-3-19-23>© В.И. Вошедский*, П.Г. Сакун, Е.А. Дженкова, А.А. Пушкин,
А.О. Ситковская, И.В. Межевова, С.Г. Власов, Т.С. Рогова

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК РАКА ЛЕГКОГО H1299 ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ВЫСОКИМИ ДОЗАМИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Национальный медицинский исследовательский центр онкологии, г. Ростов-на-Дону, Россия

✉ *В.И. Вошедский, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии, 344037, Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63, vvoshed@mail.ru

Поступила в редакцию 20 февраля 2021 г. Исправлена 20 апреля 2021 г. Принята к печати 15 мая 2021 г.

- Цель исследования** Изучить копияность генов-компонентов сигнальных каскадов, вовлеченных в репарацию ДНК, регуляцию клеточного цикла и апоптоза при воздействии высоких доз ионизирующего излучения.
- Материал и методы** Исследование проведено на культуре клеток немелкоклеточного рака легкого H1299. Клеточные линии культивировали в инкубаторе Binder (Германия) 24 ч (при 37 °С, 5% CO₂), а затем разделили группы на терапевтическую и контрольную. Первая группа облучалась на линейном ускорителе NovalisTx, Varian дозами от 18 до 24 Гр, вторая не подвергалась облучению. Во время исследования осуществляли: контроль жизнеспособности клеток, оценку апоптотической активности, затем проводили амплификацию каждой из проб в двух повторностях. Определение относительной копияности генетических локусов осуществляли методом Real-Time qPCR (RT-qPCR).
- Результаты** При сравнении относительной копияности в генетических локусах культуры клеток немелкоклеточного рака легкого H1299 после воздействия высокой дозой ионизирующего излучения было обнаружено статически достоверное снижение относительной копияности генов *CASP3* и *RBBP8*, что может свидетельствовать о снижении потенциала каспаза-опосредованной репопуляции опухоли и повышении радиочувствительности опухолевых клеток.
- Выводы** Воздействие высоких доз ионизирующего излучения приводит к губительному воздействию на опухолевые клетки и позволяет преодолеть один из механизмов радиорезистентности – репопуляцию опухолевых клеток.
- Ключевые слова:** немелкоклеточный рак легкого, метастатическое поражение головного мозга, лучевая терапия, радиохирurgia, культура клеток, комплексная терапия
- Цитировать:** Вошедский В.И., Сакун П.Г., Дженкова Е.А., Пушкин А.А., Ситковская А.О., Межевова И.В., Власов С.Г., Рогова Т.С. Молекулярные изменения в культуре клеток рака легкого H1299 при воздействии высокими дозами ионизирующего излучения. *Инновационная медицина Кубани*. 2021;(3):19–23. <https://doi.org/10.35401/2500-0268-2021-23-3-19-23>

© Vitaly I. Voshedskiy*, Pavel G. Sakun, Elena A. Genkova, Anton A. Pushkin,
Anastasia O. Sitkovskaya, Irina V. Mezhevova, Stanislav G. Vlasov, Tatyana S. Rogova

MOLECULAR ALTERATIONS IN THE CULTURE OF LUNG CANCER CELLS H1299 AFTER EXPOSURE TO HIGH DOSES OF IONIZING RADIATION

National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

✉ *Vitaly I. Voshedskiy, National Medical Research Centre for Oncology, 63, 14th Line st, Rostov-on-Don, 344037, vvoshed@mail.ru

Received: February 20, 2021. Received in revised form: April 20, 2021. Accepted: May 15, 2021.

- Objective** To study the copy number of genes-components of signaling cascades involved in DNA repair, cell cycle regulation and apoptosis under the influence of high doses of ionizing radiation.
- Material and Methods** The study was carried out on a culture of H1299 non-small cell lung cancer cells. Cell lines were cultured in a Binder incubator (Germany) for 24 h (at 37 °C, 5% CO₂), and then the groups were divided into therapeutic and control. The first one was irradiated with a NovalisTx, Varian linear accelerator at doses from 18 to 24 Gy, the second was not exposed to radiation. During the study, we monitored cell viability and evaluated apoptotic activity, then each sample was amplified in two iterations. During the study, cell viability was monitored, apoptotic activity was assessed, and then each sample was amplified in two replicates. The relative copy number of genetic loci was determined by Real-Time qPCR (RT-qPCR).
- Results** When comparing the relative copy number in the genetic loci of the H1299 non-small cell lung cancer cell culture after exposure to a high dose of ionizing radiation, a statistically significant decrease in the relative copy number of the *CASP3* and *RBBP8* genes was found, which may indicate a decrease in the potential of caspase-mediated tumor repopulation and an increase in the radiosensitivity of tumor cells.



Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License.

Conclusion	Exposure to high doses of ionizing radiation leads to a detrimental effect on tumor cells and allows to overcome one of the mechanisms of radioresistance – tumor cell repopulation.
Keywords:	non-small cell lung cancer, metastatic brain lesion, radiation therapy, radiosurgery, cell culture, complex therapy
Cite this article as:	Voshedskiy V.I., Sakun P.G., Genkova E.A., Pushkin A.A., Sitkovskaya A.O., Mezhevova I.V., Vlasov S.G., Rogova T.S. Molecular alterations in the culture of lung cancer cells H1299 after exposure to high doses of ionizing radiation. <i>Innovative Medicine of Kuban</i> . 2021;(3):19–23. https://doi.org/10.35401/2500-0268-2021-23-3-19-23

ВВЕДЕНИЕ

Рак легких (РЛ) во всем мире занимает первое место в структуре смертности от злокачественных новообразований как у мужчин, так и у женщин. Около 1,6 миллиона человек ежегодно умирают от рака легких, а общая 5-летняя выживаемость составляет всего 15% [1, 2]. В структуре общей заболеваемости злокачественными новообразованиями в России РЛ входит в тройку ведущих (9,4%), а среди мужского населения занимает первое место (16,3%) [3].

РЛ является заболеванием пожилых людей, средний возраст трети пациентов составляет 75 лет, причем многие больные имеют значительные сопутствующие заболевания вследствие влияния различных факторов в течение жизни [4]. В связи с чем лечение таких пациентов представляет сложную задачу. Основным методом лечения ранних стадий РЛ является хирургический, однако примерно 25% пациентов с ранней стадией немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) не являются кандидатами на операцию, которая остается основным методом терапии из-за тяжелых сопутствующих заболеваний. Этот факт требует поиска новых терапевтических подходов для такой категории больных [4].

Перспективным направлением лечения пациентов с ранней стадией РЛ является стереотаксическая гипофракционированная лучевая терапия (SBRT). Принципиальным отличием SBRT от традиционной лучевой терапии является применение существенно больших доз во время каждого сеанса.

Неотъемлемой частью комплексного лечения генерализованных больных с НМРЛ является стереотаксическая радиохирurgia (SRS), которая продемонстрировала свою высокую эффективность при лечении больных с метастатическим поражением головного мозга [18]. Большие дозы ионизирующего излучения при SBRT обладают более мощным биологическим воздействием и приводят к высоким показателям местного контроля опухоли. По данным проспективных исследований, 3-летний локальный контроль составил примерно 90% при SBRT НМРЛ I стадии [6–13].

Успешное применение ионизирующего воздействия при радиотерапевтическом лечении связано, главным образом, с возможностью активирования механизмов клеточной гибели. Считается, что основным механиз-

мом при воздействии ионизирующего излучения является апоптоз. Он инициируется нарушениями внеклеточного микроокружения, которые обнаруживаются рецепторами плазматической мембраны, сигнализируются и реализуются исполнительными каспазами, главным образом *CASP3*.

Основным способом оценки молекулярных процессов, происходящих в опухолевых клетках, является анализ изменения копийности генов (Copy Number Variation или CNV). Копийность генов – вид генетического полиморфизма, возникающий в результате несбалансированных хромосомных перестроек, таких как делеции и дупликации. Результатом вариации может явиться уменьшение или повышение числа копий определенного гена, и, следовательно, изменение экспрессии продукта гена-белка или не кодирующей РНК. CNV представляют собой критические генетические события, которые способствуют развитию и прогрессированию злокачественных новообразований у человека [13].

Точная характеристика числа копий генов позволит раскрыть процессы, происходящие в опухолевой клетке при воздействии на нее высокими дозами лучевой терапии. На основании вышеизложенных данных целью нашего опыта стало исследование относительной копийности генетических локусов, ответственных за репарацию ДНК, регуляцию клеточного цикла и апоптоза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на культуре немелкоклеточного рака легкого H1299. Во флаконы T75 с поверхностью культивирования 75 см² (Corning, USA) пассировали клетки H1299 по 5×10⁶ кл/фл в среду DMEM (Gibco, USA) с добавлением 10%-й эмбриональной бычьей сыворотки (Биолот, Россия), 0,5%-го гентамицина (Биолот, Россия). Клеточную линию культивировали 24 ч в инкубаторе Binder (Германия) при 37 °С, 5% CO₂. Облучение клеточной линии H1299 осуществлялось на линейном ускорителе NovalisTx, Varian дозами от 18 до 24 Гр с шагом 1 Гр, контроль оставался без облучения. Экспозицию проводили в течение 24 ч при 37 °С, 5% CO₂. Жизнеспособность клеток определяли в автоматическом анализаторе EVE (NanoEntec, Корея) окрашиванием трипановым синим 0,4%-м (NanoEntec, Корея). Оцен-

ку апоптотической активности проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (BD, США) с использованием Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen, США).

Геномную ДНК экстрагировали из культур немелкоклеточного рака легкого H1299 с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия) и станции автоматического выделения нуклеиновых кислот QIAcube Connect (Qiagen, Германия). Концентрацию полученных препаратов ДНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0® (Invitrogen, США) с использованием набора Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity (HS) Assay Kit (Invitrogen, США). Для проведения Real-Time qPCR концентрацию образцов ДНК нормализовывали до величины 2 нг/мкл.

Определение относительной копийности генетических локусов проводили методом Real-Time qPCR (RT-qPCR). Принцип метода заключается в одновременной амплификации гена-мишени и референтного гена в опытной и контрольной пробах. Вывод об изменении копийности гена делается на основании анализа соотношения сигналов, продуцируемых ампликонами изучаемой и референсных последовательностей. В качестве референсных локусов использовались АСТВ, В2М и GAPDH. Стабильность референсных локусов проверялась с использованием пакета «GENorm». Относительная величина определялась методом $\Delta\Delta Ct$ [16]. Каждые 15 мкл ПЦР-смеси для анализа содержали 10 нг геномной ДНК, 0,2 mM dNTP's, по 500 нМ прямого и обратного праймеров для референтных генов или гена-мишени, 2 mM MgCl₂, ПЦР-буфер, 0,05 u/μl HS Taq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами (Евроген, Россия). В качестве красителя использовали EvaGreen (Invitrogen, США). Амплификация каждой из проб осуществлялась в двух повторностях. Первичные данные RT-qPCR получали

с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager ver 3.1.

Количественная RT-PCR амплификация проводилась с использованием термоциклера Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, USA) в соответствии с инструкциями производителя по следующей программе: 95 °C 3 мин, и 40 циклов при 95 °C 10 сек., 58 °C 30 сек. и 72 °C 30 сек. (чтение оптического сигнала FAM для красителя EvaGreen). Для оценки специфичности ПЦР-продукты подвергались плавлению в диапазоне температур 65–95 °C, инкремент – 0,5 °C. Прямой и обратный праймеры для каждого локуса были разработаны с использованием референтных последовательностей ДНК NCBI GenBank [17].

Статистический анализ проводился с использованием пакетов среды R. Наличие значительной разницы между средними показателями копийности исследуемых генов в экспериментальных условиях оценивали с помощью одностороннего теста ANOVA. Для расчета попарных сравнений между группами применяли парный Т-тест с корректировкой р-значения методом Бенджамини-Хохберга.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В опыте была определена копийность генов-компонентов сигнальных каскадов, вовлеченных в репарацию ДНК, регуляцию клеточного цикла и апоптоза: *AKT1*, *ATM*, *BIRP1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDKN1B*, *CCND1*, *RBBP8*, *RAD50*, *TP53*, *XRCC4*, *BAX*, *CASP7*, *CASP8*, *CASP3*, *CASP9*, *C-FLIP*, *MDM2*, *BCL2*.

При сравнении относительной копийности в генетических локусах культуры клеток немелкоклеточного рака легкого H1299 обнаружено статически достоверное изменение относительной копийности генов *CASP3* и *RBBP8*.

Снижение копийности гена *CASP3* (рис. 1) после воздействия высокой дозы ионизирующего излуче-

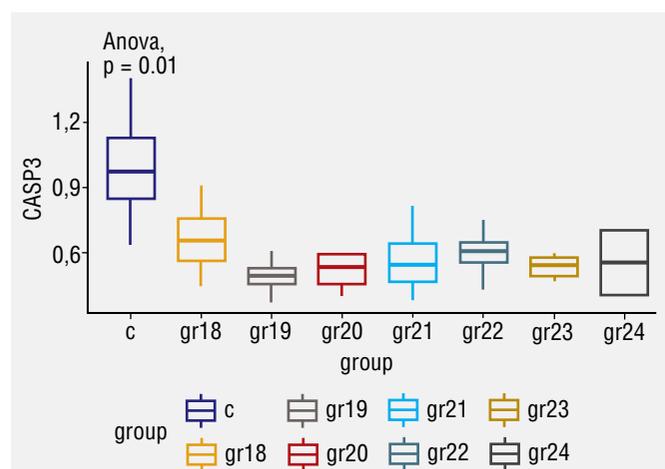


Рисунок 1. Изменение относительной копийности гена *CASP3*

Figure 1. Change in the relative copy number of the *CASP3* gene

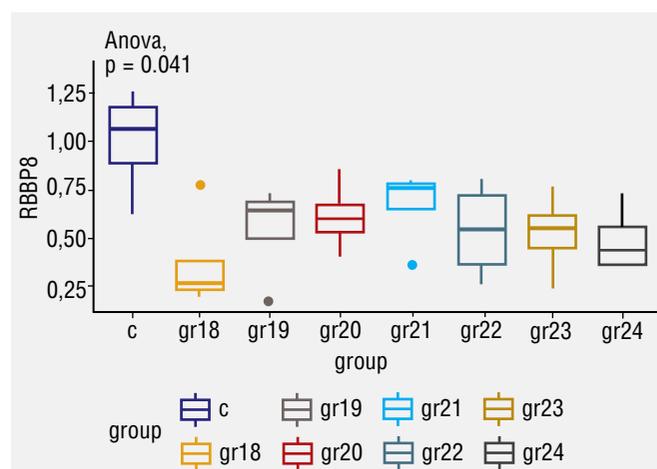


Рисунок 2. Изменение относительной копийности гена *RBBP8*

Figure 2. Change in the relative copy number of the *RBBP8* gene

ния может свидетельствовать о снижении потенциала каспаза-опосредованной репопуляции опухоли и повышает радиочувствительность опухоли, что согласуется с данными литературы [15].

CtIP/RBBP8 в настоящее время более известен своей ролью в репарации двухцепочечного разрыва ДНК и стабильности генома. *CtIP* является взаимодействующим партнером белкового комплекса датчика повреждения ДНК *Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN)*, который распознает двухцепочечные разрывы ДНК. *CtIP* участвует в этих путях, поддерживающих начальные этапы обработки ДНК, а также в рекрутировании дополнительных белков репарации ДНК. Снижение копияности гена *RBBP8* после воздействия высокой дозы ионизирующего излучения (рис. 2) может свидетельствовать о снижении потенциала репарации ДНК, что доказывает высокую эффективность подобного воздействия.

ВЫВОДЫ

Высокие дозы ионизирующего излучения приводят к губительному воздействию на опухолевые клетки и позволяют преодолеть один из механизмов радиорезистентности – репопуляцию опухолевых клеток.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008;58(2):71–96. PMID: 18287387. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-14-14-ed>
2. Cancer fact sheet. *World Health Organization.* 2010. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
3. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой Злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность). – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2020; 252 с.
4. Kaprina AD, Starinsky VV, Shakhzadova AO, ed. Malignant neoplasms in Russia in 2019 (morbidity and mortality). *National Medical Research Center of Radiology of the Russian Ministry of Health.* 2020; 252 p.
4. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER cancer statistics review, 1975–2014. *National Cancer Institute.* 2017. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx030>
5. Donington J, Ferguson M, Mazzone P, et al. American college of chest physicians and society of thoracic surgeons consensus statement for evaluation and management for high-risk patients with stage I non-small cell lung cancer. *Chest.* 2012;142:1620–1635. PMID: 23208335. <https://doi.org/10.1378/chest.12-0790>
6. Hoyer M., Roed H., Hansen A.T., et al. Prospective study on stereotactic radiotherapy of limited-stage non-small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006;66(4):S128–S135. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.01.012>
7. Fakiris AJ, McGarry RC, Yiannoutsos CT, et al. Stereotactic body radiation therapy for early-stage non-small-cell lung carcinoma: four-year results of a prospective phase II study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009;75:677–682. PMID: 19251380. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.11.042>
8. Baumann P, Nyman J, Hoyer M, et al. Outcome in a prospective phase II trial of medically inoperable stage I non-small-cell lung cancer patients treated with stereotactic body

radiotherapy. *J Clin Oncol.* 2009;27(20):3290–3296. [https://doi.org/10.1016/s8756-3452\(09\)79376-4](https://doi.org/10.1016/s8756-3452(09)79376-4)

9. Timmerman R, Paulus R, Galvin J, et al. Stereotactic body radiation therapy for inoperable early stage lung cancer. *JAMA.* 2010;303(11):1070–1076. PMID: 20233825. PMID: PMC2907644. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.261>
10. Ricardi U, Filippi AR, Guarneri A, et al. Stereotactic body radiation therapy for early stage non-small cell lung cancer: results of a prospective trial. *Lung Cancer.* 2010;68:72–77. PMID: 19556022. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2009.05.007>
11. Bral S, Gevaert T, Linthout N, et al. Prospective, risk-adapted strategy of stereotactic body radiotherapy for early-stage non-small-cell lung cancer: results of a phase II trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011;80(5):1343–1349. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.04.056>
12. Nagata Y, Hiraoka M, Shibata T, et al. Prospective trial of stereotactic body radiation therapy for both operable and inoperable T1N0M0 non-small cell lung cancer: Japan Clinical Oncology Group study JCOG0403. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2015;93(5):989–996. PMID: 26581137. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.07.2278>
13. Sun B, Brooks ED, Komaki RU, et al. 7-year follow-up after stereotactic ablative radiotherapy for patients with stage I non-small cell lung cancer: results of a phase 2 clinical trial. *Cancer.* 2017;123(16):3031–3039. PMID: 28346656. PMID: PMC5544582. <https://doi.org/10.1002/cncr.30693>
14. Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Гудуева Е.Н. Изменение копияности генетических локусов при раке желудка. *Молекулярная биология.* 2015;49(4):658–666.
- Kit OI, Vodolazhsky DI, Kutilin DS, Gudueva EN. Change in copy number of genetic loci in stomach cancer. *Molecular Biology.* 2015;49(4):658–666.
15. Huang Q, Li F, Liu X, et al. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med.* 2011;17(7):860–866. PMID: 21725296. PMID: PMC3132290. <https://doi.org/10.1038/nm.2385>
16. Кит О.И., Пушкин А.А., Росторгуев Э.Е., Тимошкина Н.Н., Кузнецова Н.С., Кавицкий С.Э., Нальгиев А.М. (2019). Дифференциальная экспрессия 15-ти генов в глиальные опухоли различной степени злокачественности. *Современные проблемы науки и образования.* 2019;5:66–66.
- Kit OI, Pushkin AA, Rostorguev EE, Timoshkina NN, Kuznetsova NS, Kavitsky SE, Nalgiev AM. Differential expression of 15 genes in glial tumors of various degrees of malignancy. *Modern problems of science and education.* 2019;5:66–66. (In Russ.)
17. Кит О.И., Водолажский Д.И., и др. CNV генов в качестве биомаркера и терапевтической мишени при раке желудка. *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки.* 2017;4(2):196–2.
- Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Tatimov M.Z, et al. CNV genes as a biomarker and therapeutic target in gastric cancer. Proceedings of higher educational institutions. North Caucasian region. *Natural Sciences.* 2017;4(2):196–2. (In Russ.)
18. Кит О.И., Вошедский В.И., Сакун П.Г., и др. Опыт применения радиохирургического комплекса Novalis Tx в практике ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. *Южно-российский онкологический журнал.* 2020; 1(4):32–37. <https://doi.org/10.37748/2687-0533-2020-1-4-4>
- Kit OI, Voshedskii VI, Sakun PG, et al. Novalis Tx radiosurgical platform experience in National Medical Research Centre for Oncology of the Russian Ministry of Health. *South Russian Journal of Cancer.* 2020;1(4):32–37. <https://doi.org/10.37748/2687-0533-2020-1-4-4>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Вошедский Виталий Игоревич, врач-радиотерапевт, НМИЦ онкологии (Ростов-на-Дону, Россия). <https://orcid.org/0000-0003-1405-8329>

Сакун Павел Георгиевич, к. м. н., врач-радиотерапевт, НМИЦ онкологии (Ростов-на-Дону, Россия). <https://orcid.org/0000-0001-8061-6259>

Дженкова Елена Алексеевна, д. б. н., доцент, Ученый секретарь, НМИЦ онкологии (Ростов-на-Дону, Россия). <https://orcid.org/0000-0002-3561-098X>

Пушкин Антон Андреевич, научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии, НМИЦ онкологии (Ростов-на-Дону, Россия). <https://orcid.org/0000-0003-2385-6285>

Ситковская Анастасия Олеговна, В.р.и.о. заведующей лабораторией клеточных технологий, НМИЦ онкологии (Ростов-на-Дону, Россия). <https://orcid.org/0000-0002-6035-1756>

Межевова Ирина Валентиновна, младший научный сотрудник Лаборатории клеточных технологий, НМИЦ онкологии (Ростов-на-Дону, Россия). <https://orcid.org/0000-0002-7902-7278>

Власов Станислав Григорьевич, аспирант, НМИЦ онкологии (Ростов-на-Дону, Россия) <https://orcid.org/0000-0002-4680-8991>

Рогова Татьяна Сергеевна, клинический ординатор, НМИЦ онкологии (Ростов-на-Дону, Россия). <https://orcid.org/0000-0003-0074-0044>

Финансирование

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

AUTHOR CREDENTIALS

Vitaly I. Voshedskiy, Radiotherapist, National Medical Research Centre of Oncology (Rostov-on-Don, Russian Federation). <https://orcid.org/0000-0003-1405-8329>

Pavel G. Sakun, Cand. of Sci. (Med.), Radiotherapist, National Medical Research Centre of Oncology (Rostov-on-Don, Russian Federation). <https://orcid.org/0000-0001-8061-6259>

Elena A. Genkova, Dr. of Sci. (Biol.), Associate Professor, Scientific Secretary, National Medical Research Centre of Oncology (Rostov-on-Don, Russian Federation). <https://orcid.org/0000-0002-3561-098X>

Anton A. Pushkin, Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, National Medical Research Centre of Oncology of the Ministry (Rostov-on-Don, Russian Federation). <https://orcid.org/0000-0003-2385-6285>

Anastasia O. Sitkovskaya, Head of the Laboratory of Cell Technologies, National Medical Research Centre of Oncology (Rostov-on-Don, Russian Federation). <https://orcid.org/0000-0002-6035-1756>

Irina V. Mezhevova, Researcher, Laboratory of Cell Technologies, National Medical Research Centre of Oncology (Rostov-on-Don, Russian Federation). <https://orcid.org/0000-0002-7902-7278>

Stanislav G. Vlasov, Postgraduate Student, National Medical Research Centre of Oncology (Rostov-on-Don, Russian Federation). <https://orcid.org/0000-0002-4680-8991>

Tatyana S. Rogova, Resident Medical Practitioner, National Medical Research Centre of Oncology (Rostov-on-Don, Russian Federation). <https://orcid.org/0000-0003-0074-0044>

Funding: *the study was not sponsored.*

Conflict of interest: *none declared.*