

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-54-65>

Влияние нового ингибитора HSP90 на сигнальные пути рецептора эстрогенов α в клетках рака молочной железы

А.М. Щербаков^{1,2}, Д.В. Сорокин¹, Д.И. Сальникова^{1,3}, М.В. Гудкова¹, О.Е. Андреева¹, А.Л. Михайлова¹, А.О. Воробьева⁴, Ю.А. Пивень⁴

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБУН «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»; Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11;

³ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук»; Россия, 119991 Москва, Ленинский пр-кт, 47;

⁴ГНУ «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси»; Беларусь, 220084 Минск, ул. Академика Купревича, 5/2

Контакты: Александр Михайлович Щербаков alex.scherbakov.2010@ya.ru

Введение. Белки теплового шока (heat shock proteins, HSP), также известные как молекулярные шапероны, представляют собой большое семейство белков, регулирующих процессы гистогенеза и гомеостаза, а также влияющих на фолдинг и функциональную активность множества клиентских белков. Особый интерес в этом семействе представляет шаперон 90 (HSP90), который значительно поддерживает рост злокачественных клеток. Он оказывает комплексное влияние на сигнальные пути канцерогенеза, включая BCR-ABL, Raf-1, AKT, рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа (ERBB2/HER2), индуцируемый гипоксией фактор 1 α (HIF-1 α), янус-киназу 2 (JAK2), STAT3, p53 и рецептор эстрогена α (ER α). Именно поэтому поиск новых селективных ингибиторов этого шаперона является актуальной задачей медицинской химии и онкологии.

Цель исследования – изучение антипролиферативной активности нового ингибитора HSP90 THB5T-1 на линиях клеток ER α -положительного рака молочной железы и оценка его антиэстрогенного потенциала и селективности.

Материалы и методы. Исследование проводили на линиях гормонозависимых клеток рака молочной железы MCF7 и T47D и нормальных фибробластов hFB-hTERT. Антипролиферативную активность соединения определяли посредством МТТ-теста. Для анализа влияния ингибирования HSP90 на сигнальные пути клеток использовали иммуноблоттинг. Оценка антиэстрогенной активности THB5T-1 проводили в клетках MCF7 методом репортерного анализа. Для построения модели взаимодействия THB5T-1 с лигандсвязывающим доменом ER α применяли молекулярное моделирование.

Результаты. Концентрация THB5T-1, необходимая для полумаксимального ингибирования роста клеток (IC₅₀), составила 4,3 мкМ для линии MCF7 и 5,6 мкМ для линии T47D. Увеличение концентрации THB5T-1 до 25 мкМ приводило к снижению выживаемости клеток до 20 %. Индекс селективности THB5T-1 для различных клеток рака молочной железы варьировал от 3,7 до 5 у.е. Влияние соединения THB5T-1 на гормональные пути в клетках MCF7, выявленное с помощью репортерного анализа и иммуноблоттинга, оказалось дозозависимым. Способность THB5T-1 напрямую связываться с ER α подтверждена данными молекулярного моделирования. Антипролиферативные эффекты THB5T-1 в клетках MCF7 ассоциированы со снижением экспрессии регуляторов клеточного цикла, таких как циклин D1 и циклин-зависимая киназа 4 (CDK4). Также выявлена значительная эффективность соединения THB5T-1 в комбинации с селективным ингибитором AKT.

Заключение. Соединение THB5T-1 оказывает антипролиферативное воздействие на клетки ER α -положительного рака молочной железы и демонстрирует высокую селективность. Антиэстрогенные эффекты THB5T-1 подтверждают его значительный потенциал как селективного ингибитора пути HSP90/ER α /GREB1 и блокатора ER α -опосредованной пролиферации опухолевых клеток.

Ключевые слова: рак молочной железы, HSP90, рецептор эстрогенов α , антипролиферативный агент

Для цитирования: Щербаков А.М., Сорокин Д.В., Сальникова Д.И. и др. Влияние нового ингибитора HSP90 на сигнальные пути рецептора эстрогенов α в клетках рака молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(4):54–65.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-54-65>

Effects of a novel HSP90 inhibitor on estrogen receptor α signaling pathways in breast cancer cells

A.M. Scherbakov^{1,2}, D.V. Sorokin¹, D.I. Salnikova^{1,3}, M.V. Gudkova¹, O.E. Andreeva¹, A.L. Mikhaylova¹, N.A. Varabyeva⁴, Yu.A. Piven⁴

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, 115522 Moscow, Russia;

²G.F.Gauze Institute of New Antibiotics; 11 Bol'shaya Pirogovskaya St., 119021 Moscow, Russia;

³N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences; 47 Leninsky Prospekt, 119991 Moscow, Russia;

⁴Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus; 5/2 Akademika Kuprevicha St., 220084 Minsk, Belarus

Contacts: Alexander Mikhailovich Scherbakov alex.scherbakov.2010@ya.ru

Introduction. Heat shock proteins (HSP), also known as molecular chaperones, are a large family of proteins that play crucial roles in histogenesis, homeostasis, and the folding and functional regulation of numerous client proteins. Among them, HSP90 is a key player, particularly in supporting the growth of tumor cells. HSP90 impacts multiple carcinogenic signaling pathways, including BCR-ABL, Raf-1, AKT, human epidermal growth factor receptor 2 (ERBB2/HER2), hypoxia-inducible factor 1- α (HIF-1 α), janus kinase 2 (JAK2), STAT3, p53, and estrogen receptor α (ER α). As a result, the search for new, selective inhibitors of this chaperone is a high priority in medicinal chemistry and oncology.

Aim. To evaluate the antiproliferative activity of a novel HSP90 inhibitor, THB5T-1, on ER α -positive breast cancer cell lines and assess its anti-estrogenic potential and selectivity.

Materials and methods. The study was conducted on hormone-dependent breast cancer cell lines MCF7 and T47D, along with the normal fibroblast line hFB-hTERT. The antiproliferative activity of THB5T-1 was measured using the MTT assay, while immunoblotting was employed to analyze the effects of HSP90 inhibition on cell signaling pathways. Anti-estrogenic activity was assessed in MCF7 cells via a reporter assay, and molecular modeling was used to construct a model of THB5T-1 interaction with the ligand-binding domain of ER α .

Results. The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of THB5T-1 was determined to be 4.3 μ M for MCF7 cells and 5.6 μ M for T47D cells. At a concentration of 25 μ M, cell survival decreased to 20%. The selectivity index for THB5T-1 varied from 3.7 to 5.0 in different breast cancer cell lines. The compound's effects on hormonal pathways in MCF7 cells, as observed via reporter assay and immunoblotting, were dose-dependent. These findings were further supported by molecular docking studies, showing THB5T-1 interaction with the ligand-binding domain of ER α . Additionally, the antiproliferative activity of THB5T-1 in MCF7 cells was associated with reduced expression of cell cycle regulators cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 (CDK4). Significant efficacy of compound THB5T-1 in combination with a selective AKT inhibitor was revealed.

Conclusion. Compound THB5T-1 demonstrated significant antiproliferative effects on ER α -positive breast cancer cells and exhibited high selectivity. Its anti-estrogenic effects highlight its potential as a selective inhibitor of the HSP90/ER α /GREB1 pathway, effectively blocking ER α -mediated cell proliferation.

Keywords: breast cancer, HSP90, estrogen receptor α , antiproliferative agent

For citation: Scherbakov A.M., Sorokin D.V., Salnikova D.I. et al. Effect of a novel HSP90 inhibitor on estrogen receptor α signaling pathways in breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(4):56–65. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-54-65>

ВВЕДЕНИЕ

Белки теплового шока (heat shock proteins, HSP) представляют собой большое семейство эволюционно консервативных белков с молекулярной массой от 8 до 150 кДа, обнаруживаемых в клетках всех живых организмов. Одной из наиболее часто встречающихся в клетках млекопитающих является изоформа HSP весом 90 кДа (HSP90) [1, 2]. Некоторые HSP экспрессируются конститутивно, в то время как другие активируются в ответ на клеточный стресс, играя ключевую роль в поддержании клеточного гомеостаза, пролиферации, выживания и дифференцировки [3].

HSP90 имеет 4 изоформы, присутствующие как в цитозоле (HSP90 α и HSP90 β), так и в специфических органеллах: TRAP1 — в митохондриях, GRP94 — в эндоплазматической сети. Результаты ряда исследований свидетельствуют о включении белков HSP в клеточные мембраны [4]. С помощью экзосом возможен

перенос HSP90 во внеклеточную среду [5]. В опухолевых клетках наблюдается повышенная экспрессия этого шаперона, причем его конформация более чувствительна к селективным ингибиторам по сравнению с нормальными клетками. Кроме того, показано, что опухолевый супрессор p53 при возникновении мутаций индуцирует секрецию HSP90 α [6]. Этот механизм участвует в поддержании синтеза белков, важных для выживаемости опухолевых клеток.

HSP90 влияет на множество мишеней, включая BCR-ABL, Raf-1, AKT, рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа (ERBB2/HER2), индуцируемый гипоксией фактор 1 α (HIF-1 α), янус-киназу 2 (JAK2), STAT3, p53 и стероидные рецепторы. Связывание или подавление экспрессии этого шаперона приводит не только к изменениям в самой сигнальной цепи шаперонов, но и к нарушению конформации и возможному протеолизу клиентских белков.

HSP90 необходим для димеризации рецепторов эстрогенов (ER) ER α / α и ER α / β , а также играет большую роль в эстрогензависимой транскрипционной активности гомодимера рецептора, регулируя ER-опосредованную пролиферацию клеток. Ингибирование HSP90 в опухолевых клетках с высокой экспрессией ER α приводит к быстрому уменьшению времени полураспада рецептора [7].

Вовлеченность HSP90 в разнообразные биологические процессы и влияние примерно на 400 клиентских белков сделали его перспективной мишенью для терапии различных заболеваний, включая онкологические. Однако точное прогнозирование воздействия ингибиторов HSP90 на нормальные клетки организма является сложной задачей, поскольку их фармакологическая активность также регулируется рядом ко-шаперонов [8].

С 1994 г., когда был описан первый ингибитор HSP90, количество подобных молекул значительно возросло, а их классификация расширилась [9–11]. Однако далеко не все такие агенты прошли проверку на селективность, таргетность механизма действия и безопасность [12]. Результаты клинических испытаний ряда агентов также показали множество нецелевых эффектов. С учетом развития лекарственной резистентности, низкой селективности и дозозамещающей токсичности сегодня монотерапия ингибиторами HSP90 в клинической практике не применяется. Тем не менее поиск новых ингибиторов шаперонов остается актуальной задачей медицинской химии и фармакологии.

Цель исследования — изучение антипролиферативной активности нового ингибитора HSP90 — TNB5T-1 — на линиях клеток ER α -положительного рака молочной железы (PMЖ) и оценка его антиэстрогенного потенциала и селективности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты и синтез ингибитора HSP90. Схема синтеза и характеристики TNB5T-1 описаны в работе N.A. Varabyeva и соавт. [13]. Реагенты для работы с клеточными линиями приобретены в компании «ПанЭко» (Россия), первичные антитела — в Cell Signaling Technology (США), сыворотка — в HyClone (США). Липофектамин 2000 предоставлен Thermo Fisher Scientific (США).

Линии клеток и культивирование. Клетки гормонозависимого PMЖ человека линий MCF7 и T47D получены из American Type Culture Collection (США) и до проведения экспериментов хранились в биобанке Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Идентичность линий подтверждали с помощью анализа коротких tandemных повторов (Gordiz, Россия). Фибробласты hFB-hTERT и протокол для работы с ними предоставлены Э.Б. Дашинимаевым и В.В. Татарским [14].

Клетки MCF7 и hFB-hTERT культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM), T47D — в среде RPMI-1640. Среда для культур клеток содержала 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, пенициллин (50 Ед/мл) и стрептомицин (50 мкг/мл). В среду RPMI-1640 добавляли смесь витаминов для культур клеток («ПанЭко», Россия). Инкубацию проводили при температуре 37 °C в 5 % CO₂ при относительной влажности 85–90 %. В экспериментах использовали культуры на логарифмической стадии роста.

Оценка антипролиферативной активности соединений. Этот показатель определяли с помощью МТТ-теста, основанного на восстановлении жизнеспособными клетками 3-[4,5-диметилтиазол-2]-2,5-дифенилтетразолбромидом [15]. Тест проводили с модификациями, описанными ранее в работе [16]. Значение концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) вычисляли в GraphPad Prism методами нелинейной регрессии.

Оценка ER α -зависимой транскрипции гена-репортера. Для определения транскрипционной активности ER α клетки линии MCF7 трансфицировали плазмидой, содержащей репортерный ген люциферазы под контролем эстроген-чувствительных элементов. Плазмида ERE-TK-LUC предоставлена G. Reid и F. Gannon [17]. Для трансфекции использовали Липофектамин 2000. Эффективность и потенциальную токсичность трансфекции контролировали с помощью котрансфекции клеток плазмидой, содержащей ген β -галактозидазы, под контролем промотора цитомегаловируса (pCMV-beta-gal). Определение активности люциферазы проводили на планшетном люминометре TECAN Infinite M200Pro согласно рекомендациям производителя набора реагентов (Promega, США). Уровень β -галактозидазы определяли по стандартному протоколу [18] на планшетном спектрофотометре MultiSkan FC (Thermo Fisher Scientific, США). ER α -зависимую транскрипцию выражали в условных единицах как отношение активности люциферазы к активности β -галактозидазы. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$; каждый эксперимент воспроизводили не менее 3 раз. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программ DATAPLOT и GraphPad Prism.

Иммуноблоттинг. Для проведения иммуноблоттинга клетки MCF7 на стадии 70 % монослоя лизировали в буфере следующего состава: 50 мМ Трис-HCl pH 7,4; 1 % Igepal CA-630; 150 мМ NaCl; 1 мМ этилендиаминтетраацетата; 1 мМ дитиотреитол; 1 мкг/мл аprotинина; 1 мкг/мл леупептина; 1 мкг/мл пепстатина; 1 мМ фторида натрия; 1 мМ ортованадата натрия. Образцы инкубировали на льду 20 мин, затем центрифугировали (8000g, 10 мин, при температуре 4 °C), проводили электрофорез в 10 % полиакриламидном геле, а также перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану Protran и иммуноблоттинг.

Содержание ER α , GREB1, p53, циклина D1, циклинзависимой киназы 4 (CDK4), p-AKT, AKT, HSP60, HSP40, кальнексина и протеиндисульфидизомеразы (PDI) в полученных образцах определяли с помощью антител Cell Signaling Technology (США). Детекцию выполняли со вторичными антителами к иммуноглобулину кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch, США), в системе для анализа ImageQuant LAS 4000 (GE HealthCare, США).

Молекулярный докинг. Молекулы обоих энантиомеров соединения THB5T-1 и 4-гидрокситаксофена (4-OHT) подготовлены в программе DataWarrior [19] с использованием силового поля MMFF94S+. Полученные sdf-файлы последовательно конвертированы в mol2-файлы с помощью OpenBabel [20] и далее в pdbqt-файлы с использованием скрипта prepare_ligand4.py из программного пакета AutoDockTools [21]. Для подготовки рецептора из комплекса лигандсвязывающего домена ER α с 4-OHT (PDB ID 3ERT) в программе Discovery Studio Visualizer удаляли лиганд и воду, недостающие атомы реконструировали с помощью Swiss-PdbViewer и полученный pdb-файл конвертировали в pdbqt-файл в AutoDockTools. Установлены следующие параметры кармана для докинга: $\Delta X=18$ Å, $\Delta Y=\Delta Z=14$ Å с центром в $X=31$ Å, $Y=-3$ Å, $Z=25$ Å. Докинг осуществляли с использованием QVina2 [22]. Визуализацию результатов докинга выполняли с помощью PyMol и Discovery Studio Visualizer.

Симуляции молекулярной динамики и расчеты MM/GBSA. Симуляции молекулярной динамики, полученные в результате докинга комплексов или экспериментального комплекса 4-OHT с ER α , выполняли с использованием GROMACS [23] и силового поля AMBER99SB-ILDN. Лиганды параметризовали с помощью ACPYPE [24] (силовое поле GAFF и заряды BCC). Комплексы помещали в додекаэдрический бокс и растворяли в воде (TIP3P). В системы добавляли ионы Na⁺, чтобы сделать их электрически нейтральными. Минимизацию энергии проводили с использованием алгоритма градиентного спуска. Системы уравнивали в ансамбле NVT (1 нс), за которым следовало уравнивание в ансамбле NPT (1 нс) с ограничениями, приложенными ко всем атомам, кроме атомов водорода. Затем все ограничения снимали и проводили симуляцию 200 нс в ансамбле NPT при температуре 300 °K и давлении 1 бар.

Изменение энтальпии (ΔH), энтропийный фактор ($T\Delta S$) и изменение свободной энергии Гиббса (ΔG) рассчитаны на основе полученных из симуляций траекторий с использованием программного обеспечения gmx_MMPBSA [25]. MM/GBSA ΔH рассчитывался с помощью однотоакторного подхода и модели GB-HCT [26] на основе 15 000 последних кадров (начиная с 50 нс). Терм $T\Delta S$ рассчитывали с использованием метода нормальных колебаний (normal-mode entropy) на основе 11 кадров (начиная с кадра 15 000, интервал — 1500).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка антипролиферативной активности и селективности ингибитора HSP90 THB5T-1. Ранее нами были описаны новые ингибиторы HSP90 на основе 5-триазилил-замещенных 4,5,6,7-тетрагидробензо[d]-изоксазолов и 6,7-дигидробензо[d]изоксазол-4(5H)-онов [13]. Исследование их антипролиферативных свойств выполнено на клетках РМЖ MCF7 и HCC1954. Среди синтезированных веществ наибольшую активность в отношении HER2-положительного РМЖ HCC1954 проявило соединение THB5T-1 ($IC_{50} < 5$ мкМ) (рис. 1, а, табл. 1).

Антипролиферативную активность THB5T-1 на клетках ER α -положительного РМЖ линий MCF7 и T47D оценивали в диапазоне концентраций от 3,1 до 50 мкМ посредством МТТ-теста. Соединение THB5T-1 в концентрации 3,1 мкМ вызывало снижение выживаемости клеток на 20–30 %. Значения IC_{50} составили 4,3 мкМ для линии MCF7 и 5,6 мкМ для линии T47D, что говорит о схожей чувствительности клеток к соединению. Увеличение концентрации THB5T-1 до 25 мкМ приводило к практически полному подавлению роста клеток РМЖ; их выживаемость составила около 20 % (рис. 1, б).

Оценка селективности антипролиферативных агентов является важным этапом доклинических исследований [27]. В таких экспериментах используют линии нормальных клеток, способных к пролиферации в условиях *in vitro*. Токсичность соединения на нормальных клетках оценивают в том же тесте, что и для линии малигнизированных клеток, и затем проводят сравнение выявленных эффектов. В наших экспериментах фибробласты hFB-hTERT инкубировали с соединением THB5T-1 для оценки его потенциальной токсичности. Кривая роста hFB-hTERT проходит выше, чем кривые роста, полученные для линий РМЖ (см. на рис. 1, б). Установлено, что IC_{50} на линии hFB-hTERT для соединения THB5T-1 составляет >20 мкМ. Селективность оценивалась как отношение значений IC_{50} для hFB-hTERT к значениям для опухолевых клеток. Индексы селективности указаны в табл. 1. Они варьировали от 3,7 до 5, опережая аналогичные показатели для известных химиопрепаратов, описанные ранее [28–30]. Так, в нашей недавней работе [28] показано, что доксорубин проявляет высокую активность в отношении как злокачественных клеток, так и нормального эпителия. Обнаруженные эффекты данного препарата подчеркивают необходимость дальнейших разработок химиотерапевтических средств с низкой токсичностью и высокой селективностью. Таким образом, соединение THB5T-1 оказывает значительное антипролиферативное влияние на клетки РМЖ и демонстрирует высокую селективность воздействия.

Влияние ингибитора HSP90 THB5T-1 на сигнальные пути клеток гормонозависимого рака MCF7. Эксперименты следующего этапа были нацелены на опреде-

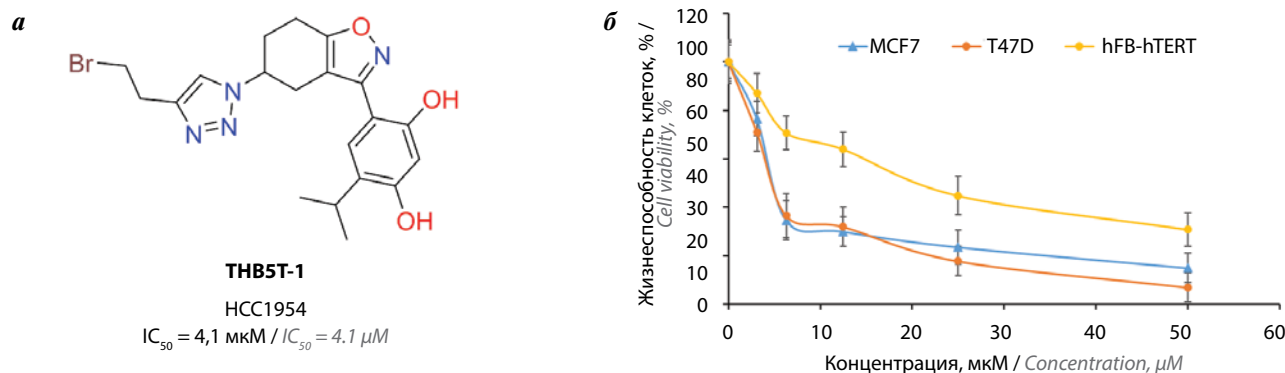


Рис. 1. Структура (а) и антипролиферативная активность THB5T-1 в отношении клеток гормонозависимого рака молочной железы и фибробластов. Синтез THB5T-1 описан в [13]. Оценка выживаемости клеток ER α -положительного (ER α – рецептор эстрогенов α) рака молочной железы MCF7 и T47D и фибробластов hFB-hTERT после инкубации с THB5T-1 в течение 72 ч; результаты MTT-теста (б). IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования

Fig. 1. Structure (a) and antiproliferative activity of THB5T-1 against hormone-dependent breast cancer cells and fibroblasts. The synthesis of THB5T-1 has been previously described in reference [13]. The survival of ER α -positive (ER α – estrogen receptor α) breast cancer cell lines MCF7 and T47D, as well as hFB-hTERT fibroblasts, was assessed after a 72-hour incubation with THB5T-1; the results of the MTT assay (b). IC₅₀ – half-maximal inhibitory concentration

Таблица 1. Антипролиферативная активность и селективность THB5T-1

Table 1. Antiproliferative activity and selectivity of THB5T-1

Линия клеток Cell line	Значение IC ₅₀ ,* (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение), мкМ IC ₅₀ values (mean $\pm$ standard deviation), μM	Индекс селективности, у.е. Selectivity index, r.u.
MCF7	4,3 $\pm$ 0,7 *	4,8
T47D	5,6 $\pm$ 0,8	3,7
HCC1954	4,1 $\pm$ 0,7 *	5,0
hFB-hTERT	20,6 $\pm$ 1,5	—

*Значение концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) получено в работе [13].

*The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value was obtained in [13].

ление изменений сигналинга клеток MCF7 после инкубации с соединением THB5T-1. Клетки MCF7 инкубировали с THB5T-1 в течение 24 ч, затем обрабатывали лизирующим буфером и использовали для приготовления образцов и проведения белкового электрофореза. Уровень экспрессии сигнальных белков в полученных образцах определяли методом иммуноблоттинга. Известно, что фармакологическое воздействие на HSP90 приводит к перестройке всей сигнальной цепи шаперонов. Результаты исследования K. Tokui и соавт. показали, что ингибитор HSP90 17-DMAG значительно усиливает экспрессию шаперонов HSP70 и HSP40 в клетках SH-SY5Y [31]. Результаты анализа белков, описанные в нашей предыдущей работе, также свидетельствуют об увеличении экспрессии HSP70 в клетках РМЖ HCC1954 после их обработки синтезированным соединением THB5T-1 [13]. Рост экспрессии HSP70 является одним из фармакологических маркеров ингибирования пути HSP90 [32, 33], что подтверждает селективность нового ингибитора HSP90.

В настоящей работе первая группа исследованных белков включала HSP60, HSP40, кальнексин и PDI. GAPDH был использован в качестве контроля загрузки проб в гель. Согласно данным, представленным на рис. 2, соединение THB5T-1 не влияло на экспрессию HSP60. Незначительное снижение экспрессии HSP40 определено в клетках MCF7 после инкубации с высокой дозой THB5T-1 (5 мкМ). Кальнексин – шаперон, регулирующий фолдинг белков и участвующий в контроле их качества [34], он специфически взаимодействует с N-связанными олигосахаридами, содержащими один остаток глюкозы, удерживая их в развернутом или несобранном виде в эндоплазматическом ретикулеуме. Согласно данным иммуноблоттинга кальнексин не был вовлечен в ответ клеток MCF7 на ингибитор HSP90 THB5T-1. Также не обнаружено изменений экспрессии еще одного фермента эндоплазматического ретикулеума – PDI [35]. Таким образом, не выявлено значительных перестроек в сигнальных путях исследованных шаперонов, за исклю-

чением HSP70, рассмотренного в нашей более ранней работе [13].

Вторая группа проанализированных белков, связанных с HSP90, относилась к гормональным путям клеток РМЖ. Молекулярная ось, соединяющая HSP90 с рецепторами стероидных гормонов, детально описана в литературе [36]. Неактивный рецептор стероидных гормонов находится в цитозоле в комплексе с HSP90. Взаимодействие рецепторов со своими физиологическими лигандами, к которым относятся дигидротестостерон, 17β -эстрадиол и другие стероиды, приводит к их многоступенчатой активации, происходящей с непосредственным участием ряда шаперонов. Мы обнаружили дозозависимое воздействие соединения THB5T-1 на экспрессию ER α , который является ключевым драйвером роста клеток MCF7 (см. рис. 2). Соединение THB5T-1 в дозах 2,5 и 5 мкМ практически полностью блокировало экспрессию этого рецептора. Оценка функциональной активности ER α возможна с применением анализа экспрессии генов, содержащих эстроген-чувствительные элементы [37]. Экспрессия таких генов повышается при инкубации клеток с гормоном (эстрогеном) и, напротив,

снижается при обработке клеток антиэстрогенами. Выявленный высокий базальный уровень экспрессии GREB1 косвенно подтверждает высокую активность ER α в клетках MCF7. Антиэстрогенные эффекты соединения THB5T-1, обнаруженные по снижению экспрессии GREB1 в концентрациях 0,63 мкМ и выше, доказывают его значительный потенциал как селективного ингибитора пути HSP90/ER α /GREB1.

В третью группу, представленную на рис. 2, вошли белки, участвующие в регуляции пролиферации и выживаемости опухолевых клеток. Инкубация клеток с соединением THB5T-1 не приводила к изменению экспрессии p53 — основного опухолевого супрессора. Клетки млекопитающих экспрессируют 3 циклина D (D1, D2 и D3), которые координированно функционируют как регуляторы CDK4/CDK6 при переходе клеточного цикла из фазы G1 в фазу S [38]. Действие широкого ряда химиотерапевтических агентов на опухолевые клетки реализуется через направленное снижение экспрессии циклинов D и активности CDK. Например, U. De и соавт. обнаружили значительное снижение экспрессии циклина D1 в клетках РМЖ MCF7 после их инкубации с доксорубицином [39].

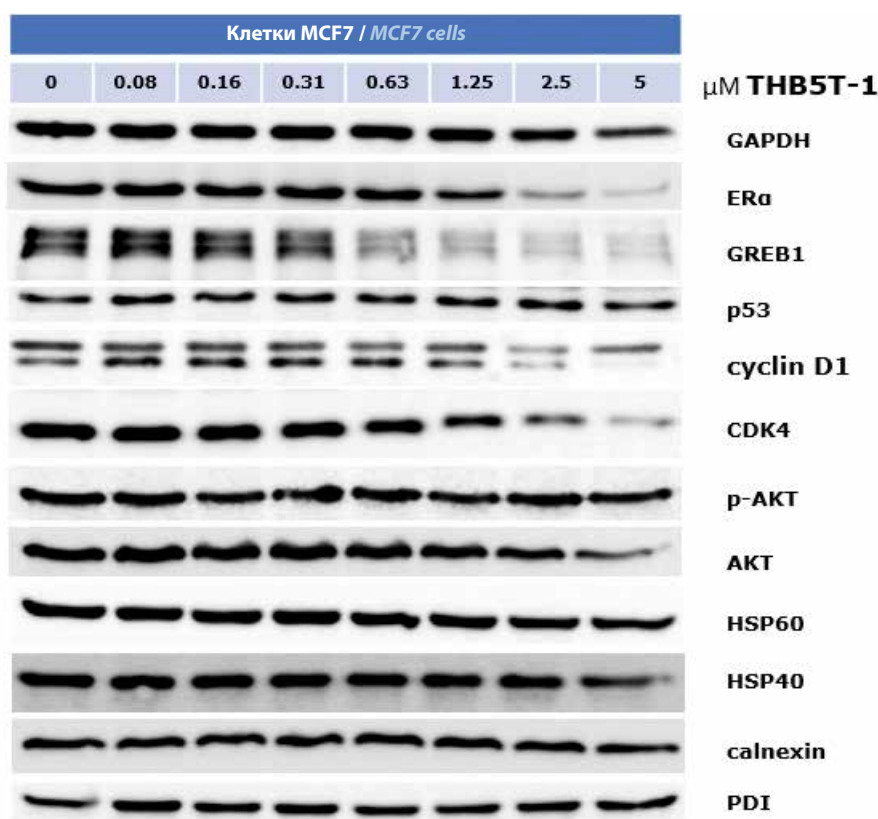


Рис. 2. Регуляция сигнальных путей клеток ER α -положительного (ER α — рецептор эстрогенов α) рака молочной железы MCF7 ингибитором HSP90 THB5T-1. Клетки MCF7 рассевали по 800 тыс. на чашки Петри (диаметр — 100 мм) и через 24 ч обрабатывали ингибитором HSP90 THB5T-1 в указанной концентрации, через 12 ч повторно проводили обработку клеток ингибитором. Образцы для иммуноблоттинга готовили через 12 ч после повторной обработки клеток соединением

Fig. 2. Regulation of signaling pathways in ER α -positive (ER α — estrogen receptor α) MCF7 breast cancer cells by the HSP90 inhibitor THB5T-1. MCF7 cells were seeded at a density of 800,000 cells per 100 mm Petri dish and treated with the HSP90 inhibitor THB5T-1 at the specified concentration 24 h post-plating. After 12 h, the cells were subjected to a second treatment with the inhibitor. Samples for immunoblot analysis were collected 12 h after the second treatment

Согласно данным, представленным на рис. 2, соединение THB5T-1 также вызывает изменение экспрессии циклина D1. В клетках MCF7, обработанных THB5T-1 в дозах 2,5 и 5 мкМ, обнаружено существенное снижение этого показателя. Митотические сигналы вызывают связывание циклина D1 с киназой CDK4, являющейся его ключевым эффектором. Инкубация клеток с THB5T-1 приводила к значительному снижению экспрессии CDK4. Киназа АКТ относится к сигнальным путям, поддерживающим выживаемость опухолевых клеток и их устойчивость к повреждающим воздействиям. В клетках MCF7, как правило, определяется высокий уровень активности АКТ, соединение THB5T-1 не вызывало значительного уменьшения ее активности.

Анализ антиэстрогенной активности соединения THB5T-1. Анализ антиэстрогенной активности THB5T-1 проводили в клетках MCF7 после трансфекции плазмидами, содержащими ген люциферазы под контролем эстроген-чувствительных элементов. 17 β -эстрадиол — физиологический лиганд ER α — использовали для индукции активности люциферазы в клетках MCF7/ERE-LUC. Согласно данным, представленным на рис. 3, в клетках, обработанных 17 β -эстрадиолом, выявлен существенный рост активности люциферазы. Ингибитор HSP90 THB5T-1 вызывал дозозависимое снижение этого показателя. Таким образом, данные репортерного анализа подтверждают результаты иммуноблоттинга, свидетельствующие об антиэстрогенной активности ингибитора HSP90 THB5T-1.

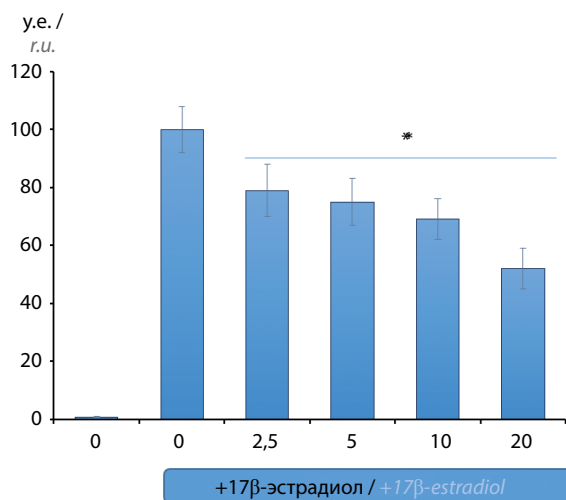


Рис. 3. Активность люциферазы в клетках MCF7/ERE-LUC. Клетки инкубировали с физиологическим лигандом рецептора эстрогенов α 17 β -эстрадиолом (10 нМ) и ингибитором HSP90 THB5T-1 в указанных концентрациях. Антиэстрогенный потенциал THB5T-1 оценивали как уровень ингибирования индуцированной активности люциферазы. * $p < 0,05$ при сравнении с клетками, обработанными только 17 β -эстрадиолом

Fig. 3. Luciferase activity in MCF7/ERE-LUC cells. The cells were incubated with the physiological estrogen receptor α ligand, 17 β -estradiol (10 nM), and the HSP90 inhibitor, THB5T-1, at the specified concentrations. The anti-estrogenic potential of THB5T-1 was assessed by measuring the degree of inhibition of luciferase activity induced by * $p < 0.05$ compared to cells treated with 17 β -estradiol alone)

Оценка сродства соединения THB5T-1 к ER α методами молекулярного моделирования. Для проверки того, может ли антиэстрогенная активность THB5T-1, описанная в предыдущих разделах, быть обусловлена не только ингибированием HSP90, но и прямым связыванием с ER α , мы провели молекулярный докинг, поместив THB5T-1 в сайт связывания лигандов ER α и последующие симуляции молекулярной динамики с расчетом значений ΔG методом MM/GBSA. В качестве рабочей структуры использован комплекс лиганд-связывающего домена ER α с 4-ОНТ (PDB ID 3ERT). Соединение THB5T-1 является рацематом, поэтому молекулярное моделирование осуществлено для обоих энантиомеров.

На рис. 4 представлены теоретические модели взаимодействия (R)-THB5T-1 (3D — см. рис. 4, а, 2D — см. рис. 4, б) и (S)-THB5T-1 (3D — см. рис. 4, в, 2D — см. рис. 4, г) с ER α , полученные в результате докинга. Также для сравнения приведена экспериментальная модель взаимодействия 4-ОНТ с ER α (3D — см. рис. 4, д, 2D — см. рис. 4, е). Скоринг-функцией Vina для (R)-THB5T-1 присвоено значение аффинности, равное $-7,4$ ккал/моль, а для (S)-THB5T-1 — $-7,7$ ккал/моль. Для 4-ОНТ данный показатель составил $-9,7$ ккал/моль в случае позы, практически идентичной экспериментальной.

Используемые в докинг-программах скоринг-функции позволяют лишь приблизительно оценить сродство малой молекулы к белку. Для более точного прогноза существует ряд методов, основанных на симуляциях молекулярной динамики, полученных в результате докинга комплексов. Ранее мы выявили хорошую сходимость прогноза с экспериментальными результатами при расчете значений ΔG образования межмолекулярных комплексов на основе длительных (200 нс) симуляций молекулярной динамики с использованием метода MM/GBSA и явным учетом энтропии [40]. Этот же подход использован для предсказания ΔG образования комплексов ER α с обоими энантиомерами THB5T-1 и сравнения ER α с 4-ОНТ. Полученные данные представлены в табл. 2.

Особенностью метода MM/GBSA является то, что расчетные значения ΔH в абсолютном выражении оказываются выше экспериментальных. Однако на основе полученных цифр можно ранжировать сродство различных малых молекул к белку. Согласно полученным данным, если оценивать аффинность обоих энантиомеров THB5T-1 к ER α только по ΔH , то она незначительно уступает таковой у 4-ОНТ. Если же учесть энтропийный вклад, то аффинность (R)-THB5T-1 оказывается даже чуть выше, чем у 4-ОНТ.

Разработка синергетических комбинаций THB5T-1. Активное развитие фармакотерапии во второй половине XX века привело к внедрению в практику ряда препаратов на основе гетероциклических соединений. Большинство одобренных лекарственных средств нацелены на клетки с высокой скоростью пролиферации,

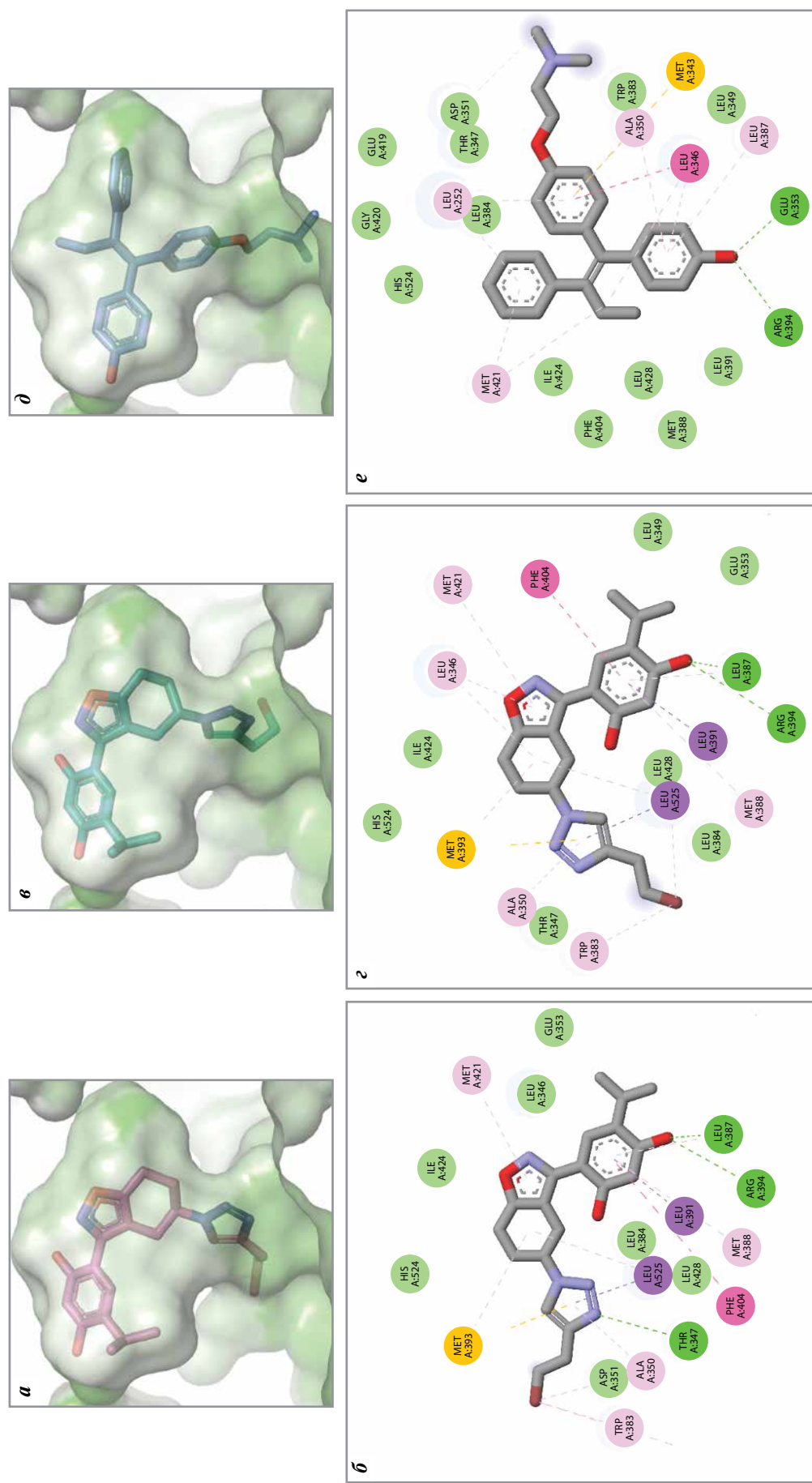


Рис. 4. Теоретические модели взаимодействия соединений (R)-THB5T-1 (3D – a, 2D – б) и (S)-THB5T-1 (3D – в, 2D – г) с лигандсвязывающим доменом рецептора эстрогенов α (ERα) (3D – в, 2D – г) и экспериментальная модель взаимодействия 4-OHT с лигандсвязывающим доменом ERα (3D – а, 2D – б, 2D – е)
Fig. 4. Theoretical models for the interaction of compounds (R)-THB5T-1 (3D – a, 2D – б) and (S)-THB5T-1 (3D – в, 2D – г) with the ligand-binding domain of estrogen receptor α (ERα) and an experimental model for the interaction of 4-OHT with the ligand-binding domain of ERα (3D – а, 2D – б, 2D – е)

Таблица 2. Значения ΔH , $T\Delta S$ и ΔG образования комплексов (R)-THB5T-1, (S)-THB5T-1 и 4-ОНТ с лигандсвязывающим доменом рецептора эстрогенов α , полученные с помощью метода ММ/ГБСА

Table 2. Values of ΔH , $T\Delta S$ and ΔG of the formation of complexes of (R)-THB5T-1, (S)-THB5T-1 and 4-OHT with the ligand-binding domain of estrogen receptor α obtained by the MM/GBSA method

Соединение Compound	ΔH , ккал/моль ΔH , kcal/mol	$T\Delta S$, ккал/моль $T\Delta S$, kcal/mol	ΔG , ккал/моль ΔG , kcal/mol
(R)-THB5T-1	−46,26	−22,84	−23,42
(S)-THB5T-1	−46,48	−24,75	−21,73
4-ОНТ	−47,20	−24,12	−23,08

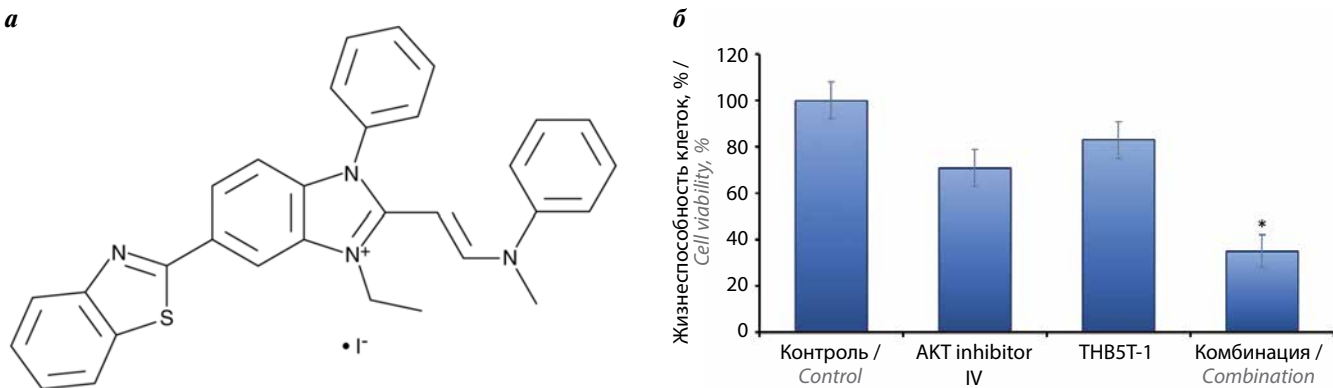


Рис. 5. Анализ воздействия комбинации THB5T-1 с ингибитором АКТ на выживаемость клеток MCF7: а – химическая структура АКТ inhibitor IV (AKT-IV); б – результаты МТТ-теста, проведенного после инкубации клеток MCF7 с 1,7 мкМ THB5T-1; 0,1 мкМ АКТ-IV или с их комбинацией. * $p < 0,05$ при сравнении с контрольными клетками и клетками, обработанными одним из соединений (ингибитором АКТ или THB5T-1)

Fig. 5. Analysis of the effects of the THB5T-1 combination with the AKT inhibitor on the survival of MCF7 cells: а – the chemical structure of AKT Inhibitor IV (AKT-IV); б – the results of the MTT assay, conducted after incubating MCF7 cells with 1.7 μM THB5T-1, 0.1 μM AKT-IV, or their combination, are presented. * $p < 0.05$ compared to control cells and cells treated with either of the compounds (AKT inhibitor or THB5T-1)

что, в свою очередь, определяет широкий спектр нежелательных явлений терапии, в частности, значительные повреждения слизистых оболочек органов [41, 42]. Одним из возможных подходов к снижению таких токсических эффектов является поиск синергетических комбинаций препаратов, обеспечивающих уменьшение доз [43]. Как указано выше, соединение THB5T-1 не оказывало влияния на активность киназы АКТ в клетках MCF7, на основе чего начата разработка его комбинаций с селективным ингибитором АКТ. Среди доступных малых молекул мы выбрали АКТ inhibitor IV (AKT-IV) [44] с высокой активностью как на клетках MCF7, так и на полученных из них клетках, резистентных к тамоксифену [45]. Клетки MCF7 инкубировали с THB5T-1, АКТ-IV или их комбинацией в течение 72 ч и затем оценивали выживаемость с помощью МТТ-теста (рис. 5). Обнаруженные эффекты каждого из соединений были незначительными: выживаемость клеток снизилась на 20–30 %. Анализ воздействия комбинации THB5T-1 с АКТ-IV на клетки MCF7 выявил синергию.

Моделирование сигнальных путей ER α , выполненное в базе STRING (рис. 6), иллюстрирует его значительные связи с HSP90 и другими белками-регуляторами

пролиферации и выживаемости опухолевых клеток. Одновременное ингибирование двух молекулярных узлов этой сети – ER α и HSP90, обнаруженное при воздействии THB5T-1 на опухолевые клетки, является перспективным подходом в разработке антипролиферативных средств.

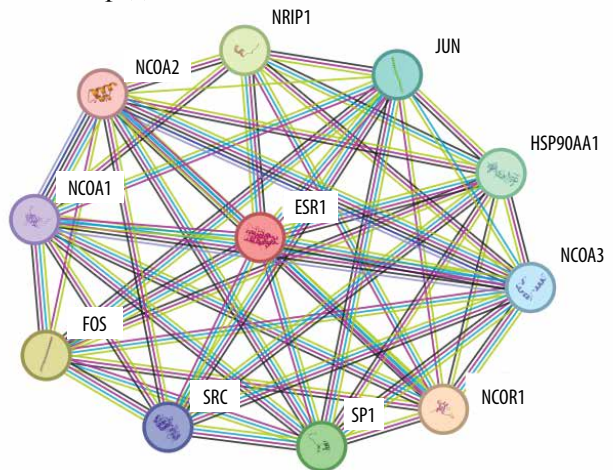


Рис. 6. Сигнальные пути рецептора эстрогенов α (схема построена в базе STRING: <https://string-db.org/>); ген ESR1 кодирует ER α

Fig. 6. The estrogen receptor α signaling pathways (the scheme is designed in STRING: base <https://string-db.org/>); ESR1 gene encodes ER α

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований получены данные о влиянии ингибитора HSP90 THB5T-1 на сигнальные пути и выживаемость клеток РМЖ. Соединение THB5T-1 относится к группе ранее синтезированных 5-триазолил-замещенных 4,5,6,7-тетрагидробензо[d]-изоксазолов, описанных в [13]. Ингибитор подавлял рост опухолевых клеток при низких микромолярных концентрациях, а также демонстрировал высокую селективность действия, как было показано в исследовании на нормальных фибробластах линии hFB-hTERT. Методами молекулярного докинга, репортерного анализа и иммуноблоттинга выявлены антиэстрогенные эффекты соединения THB5T-1, которые доказывают его значительный потенциал как селективного ингибитора пути HSP90/ER α /GREB1 и блокатора ER α -опосредованной пролиферации (см. рис. 6).

Следует отметить, что воздействие исследуемого соединения на опухолевые клетки не приводило

к изменению экспрессии p53, однако способствовало значительному снижению экспрессии киназы CDK4, которая играет ключевую роль в прохождении клеточного цикла через фазу G1. Кроме того, не было выявлено значительных изменений в сигнальных путях шаперонов, за исключением шаперона 70, подробно исследованного ранее в работе N.A. Varabyeva и соавт. [13]. Активность киназы АКТ также оставалась без изменений в клетках MCF7, обработанных THB5T-1. Обнаруженные эффекты послужили основанием для разработки синергетических комбинаций THB5T-1 с ингибитором АКТ-IV. Выявлена высокая эффективность комбинации соединений в отношении клеток гормонозависимого РМЖ линии MCF7.

Таким образом, ингибитор HSP90/ER α THB5T-1 является перспективным кандидатом для дальнейшего изучения и может стать важным компонентом в комбинированной терапии РМЖ или применяться в монотерапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Zagouri F., Bournakis E., Koutsoukos K. et al. Heat shock protein 90 (hsp90) expression and breast cancer. *Pharmaceuticals (Basel)* 2012;5(9):1008–20. DOI: 10.3390/ph5091008
- Birbo B., Madu E.E., Madu C.O. et al. Role of HSP90 in cancer. *Int J Mol Sci* 2021;22(19):10317. DOI: 10.3390/ijms221910317
- Whitley D., Goldberg S.P., Jordan W.D. Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. *J Vasc Surg* 1999;29(4):748–51. DOI: 10.1016/s0741-5214(99)70329-0
- Schwab M., Multhoff G. A Low membrane Hsp70 expression in tumor cells with impaired lactate metabolism mediates radiosensitization by NVP-AUY922. *Front Oncol* 2022;12:861266. DOI: 10.3389/fonc.2022.861266
- Li W., Tsen F., Sahu D. et al. Extracellular Hsp90 (eHsp90) as the actual target in clinical trials: intentionally or unintentionally. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013;303:203–35. DOI: 10.1016/b978-0-12-407697-6.00005-2
- Zhang S., Wang C., Ma B. et al. Mutant p53 drives cancer metastasis via RCP-mediated Hsp90 α secretion. *Cell Rep* 2020;32(1):107879. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107879
- Gougelet A., Bouclier C., Marsaud V. et al. Estrogen receptor alpha and beta subtype expression and transactivation capacity are differentially affected by receptor-, hsp90- and immunophilin-ligands in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;94(1–3):71–81. DOI: 10.1016/j.jsmb.2005.01.018
- Prodromou C. Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochem J* 2016;473(16):2439–52. DOI: 10.1042/bcj20160005
- Piven Y.A., Yastrebova M.A., Khamidullina A.I. et al. Novel O-acylated (E)-3-aryl-6,7-dihydrobenzisoxazol-4(5H)-one oximes targeting HSP90-HER2 axis in breast cancer cells. *Bioorgan Med Chem* 2022;53:116521. DOI: 10.1016/j.bmc.2021.116521
- Neckers L. Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol Med* 2002;8(4 Suppl.):S55–61. DOI: 10.1016/s1471-4914(02)02316-x
- Piven Yu.A., Scherbakov A.M., Yastrebova M.A. et al. Effective synthesis of novel dihydrobenzisoxazoles bearing the 2-aminothiazole moiety and evaluation of the antiproliferative activity of their acylated derivatives. *Org Biomol Chem* 2021;19(47):10432–43. DOI: 10.1039/d1ob01614h
- Pillai R.N., Ramalingam S.S. Throwing more cold water on heat shock protein 90 inhibitors in NSCLC. *J Thorac Oncol* 2018;13(4):473–4. DOI: 10.1016/j.jtho.2018.02.010
- Varabyeva N.A., Salnikova D.I., Krymov S.K. et al. Design and synthesis of novel 6,7-dihydrobenzo[d]isoxazol-4(5H)-one derivatives bearing 1,2,3-triazole moiety as potential Hsp90 inhibitors and their evaluation as antiproliferative agents. *Chem Select* 2024;9(12):e202304812. DOI: 10.1002/slct.202304812
- Egorov E.E., Moldaver M.V., Vishniakova Kh.S. et al. Enhanced control of proliferation in telomerized cells. *Ontogenez* 2007;38(2):105–19.
- Iselt M., Holtei W., Hilgard P. The tetrazolium dye assay for rapid *in vitro* assessment of cytotoxicity. *Arzneimittelforschung* 1989;39(7):747–9.
- Ilovaisky A.I., Scherbakov A.M., Chernoburova E.I. et al. Secosteroid diacylhydrazines as novel effective agents against hormone-dependent breast cancer cells. *J Steroid biochem Mol Biol* 2024;244:106597. DOI: 10.1016/j.jsmb.2024.106597
- Reid G., Hübner M.R., Métivier R. et al. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ER α on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 2003;11(3):695–707. DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00090-x
- Scherbakov A.M., Komkov A.V., Komendantova A.S. et al. Steroidal pyrimidines and dihydrotriazines as novel classes of anticancer agents against hormone-dependent breast cancer cells. *Front Pharmacol* 2017;8:979. DOI: 10.3389/fphar.2017.00979
- Sander T., Freyss J., von Korff M. et al. DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *J Chem Inf Model* 2015;55(2):460–73. DOI: 10.1021/ci500588j
- O'Boyle N.M., Banck M., James C.A. et al. Open babel: an open chemical toolbox. *J Cheminform* 2011;3:33. DOI: 10.1186/1758-2946-3-33
- Morris G.M., Huey R., Lindstrom W. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 2009;30(16):2785–91. DOI: 10.1002/jcc.21256
- Alhossary A., Handoko S.D., Mu Y. et al. Fast, accurate, and reliable molecular docking with QuickVina 2. *Bioinformatics* 2015;31(13):2214–6. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv082

23. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R. et al. GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 2015;1–2: 19–25. DOI: 10.1016/j.softx.2015.06.001
24. Sousa da Silva A.W., Vranken W.F. ACPYPE – AnteChamber PYthon Parser interface. *BMC Res Notes* 2012;5:367. DOI: 10.1186/1756-0500-5-367
25. Valdes-Tresanco M.S., Valdes-Tresanco M.E., Valiente P.A. et al. gmx_MMPBSA: a new tool to perform end-state free energy calculations with GROMACS. *J Chem Theory Comput* 2021;17(10):6281–91. DOI: 10.1021/acs.jctc.1c00645
26. Hawkins G.D., Cramer C.J., Truhlar D.G. Parametrized models of aqueous free energies of solvation based on pairwise descreening of solute atomic charges from a dielectric medium. *J Physical Chem* 1996;100(51):19824–39. DOI: 10.1021/jp961710n
27. El-Naggar M., Eldehna W.M., Almahli H. et al. Novel thiazolidinone/thiazolo[3,2-a]benzimidazolone-Isatin conjugates as apoptotic anti-proliferative agents towards breast cancer: one-pot synthesis and *in vitro* biological evaluation. *Molecules (Basel)* 2018;23(6):1420. DOI: 10.3390/molecules23061420
28. Illovaisky A.I., Scherbakov A.M., Merkulova V.M. et al. Secosteroid-quinoline hybrids as new anticancer agents. *J Steroid Biochem molecular Biol* 2023;228:106245. DOI: 10.1016/j.jsmb.2022.106245
29. Supasena W., Muangnoi C., Praengam K. et al. Enhanced selective cytotoxicity of doxorubicin to breast cancer cells by methoxypolyethylene glycol conjugation via a novel beta-thiopropionamide linker. *Eur Polymer J* 2020;141:110056. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2020.110056
30. Duarte D., Nunes M., Ricardo S. et al. Combination of antimalarial and CNS drugs with antineoplastic agents in MCF-7 breast and HT-29 colon cancer cells: biosafety evaluation and mechanism of action. *Biomolecules* 2022;12(10):1490. DOI: 10.3390/biom12101490
31. Tokui K., Adachi H., Waza M. et al. 17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in an SBMA model mouse. *Hum Mol Genet* 2009;18(5):898–910. DOI: 10.1093/hmg/ddn419
32. Kudryavtsev V.A., Khokhlova A.V., Mosina V.A. et al. Induction of Hsp70 in tumor cells treated with inhibitors of the Hsp90 activity: a predictive marker and promising target for radiosensitization. *PloS One* 2017;12(3):e0173640. DOI: 10.1371/journal.pone.0173640
33. Shimomura A., Yamamoto N., Kondo S. et al. First-in-Human phase I study of an oral HSP90 inhibitor, TAS-116, in patients with advanced solid tumors. *Mol Cancer Ther* 2019;18(3):531–40. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-18-0831
34. Ryan D., Carberry S., Murphy Á.C. et al. Calnexin, an ER stress-induced protein, is a prognostic marker and potential therapeutic target in colorectal cancer. *J Transl Med* 2016;14(1):196. DOI: 10.1186/s12967-016-0948-z
35. Powell L.E., Foster P.A. Protein disulphide isomerase inhibition as a potential cancer therapeutic strategy. *Cancer Med* 2021;10(8):2812–25. DOI: 10.1002/cam4.3836
36. Yadav M., Singh A.K., Kumar A. et al. An insight to heat shock protein 90: a remedy for multiple problems. *Curr Pharm Des* 2022;28(32):2664–76. DOI: 10.2174/1381612828666220829120630
37. Cheng M., Michalski S., Kommagani R. Role for growth regulation by estrogen in breast cancer 1 (GREB1) in hormone-dependent cancers. *Int J Mol Sci* 2018;19(9):2543. DOI: 10.3390/ijms19092543
38. Qie S., Diehl J.A. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J Mol Med (Berl)* 2016;94(12):1313–26. DOI: 10.1007/s00109-016-1475-3
39. De U., Chun P., Choi W.S. et al. A novel anthracene derivative, MHY412, induces apoptosis in doxorubicin-resistant MCF-7/Adr human breast cancer cells through cell cycle arrest and downregulation of P-glycoprotein expression. *Int J Oncol* 2014;44(1):167–76. DOI: 10.3892/ijo.2013.2160
40. Piven Y.A., Zinovich V.G., Shcherbakov D.N. et al. Computer-aided design, synthesis and evaluation of new SARS-CoV-2 Mpro inhibitors based on 1,5,6,7-tetrahydro-4H-indazol-4-one scaffold. *Med Chem Res* 2023;33(1):151–63. DOI: 10.1007/s00044-023-03174-z
41. Thorn C.F., Oshiro C., Marsh S. et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics* 2011;21(7):440–6. DOI: 10.1097/FPC.0b013e32833ffb56
42. O'Reilly M., Mellotte G., Ryan B. et al. Gastrointestinal side effects of cancer treatments. *Ther Adv Chronic Dis* 2020;11: 2040622320970354. DOI: 10.1177/2040622320970354
43. Jin H., Wang L., Bernards R. Rational combinations of targeted cancer therapies: background, advances and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2023;22(3):213–34. DOI: 10.1038/s41573-022-00615-z
44. Kau T.R., Schroeder F., Ramaswamy S. et al. A chemical genetic screen identifies inhibitors of regulated nuclear export of a Forkhead transcription factor in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell* 2003;4(6):463–76. DOI: 10.1016/s1535-6108(03)00303-9
45. Scherbakov A.M., Bogdanov F.B., Mikhaylova A.L. et al. Targeting AKT kinase in hydroxytamoxifen-resistant breast cancer cells. *Med Sci Forum* 2023;20(1):4. DOI: 10.3390/IECC2023-14224

Благодарность. Авторы выражают особую благодарность А. Тищенко за помощь в организации биологических экспериментов и проведении иммуноблоттинга, G. Reid и F. Gannon за предоставление плазмид для трансфекции, а также А. Хамидуллиной и Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБН «Институт биологии гена Российской академии наук» за предоставление оборудования (микропланшетного спектрофотометра).

Acknowledgment. The authors express special gratitude to A. Tishchenko for assistance in organizing biological experiments and conducting immunoblotting, G. Reid and F. Gannon for providing plasmids for transfection, as well as A. Hamidullina and the Center for High-Precision Editing and Genetic Technologies for Biomedicine of the Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences for providing equipment (microplate spectrophotometer).

Вклад авторов

А.М. Щербаков: идея и организация исследования, культивирование клеток, анализ полученных данных, статистическая обработка данных, написание текста статьи, подготовка иллюстраций;

Д.В. Сорокин: анализ полученных данных, электрофорез белков, проведение иммуноблоттинга, написание текста статьи, подготовка иллюстраций;

Д.И. Сальникова: культивирование клеток, проведение МТТ-теста, разработка синергетической комбинации, статистическая обработка данных, редактирование, подготовка иллюстраций;

М.В. Гудкова: обработка результатов экспериментов, написание текста статьи, редактирование;

О.Е. Андреева: проведение трансфекции и репортерного анализа;

А.Л. Михайлова: анализ полученных данных, написание текста статьи, подготовка иллюстраций;

А.О. Воробьева: дизайн и синтез соединения;

Ю.А. Пивень: дизайн соединения, молекулярное моделирование, написание текста статьи, подготовка иллюстраций.

Authors' contributions

A.M. Scherbakov: idea and organization of the study, cell culture, analysis of the data obtained, statistical data processing, article writing, preparation of illustrations;

D.V. Sorokin: analysis of the data obtained, protein electrophoresis, immunoblotting, article writing, preparation of illustrations;

D.I. Salnikova: cell cultivation, MTT test, development of a synergistic combination, statistical data processing, editing, preparation of illustrations;

M.V. Gudkova: processing the results of experiments, article writing, editing;

O.E. Andreeva: transfection and reporter analysis;

A.L. Mikhaylova: analysis of the data obtained, article writing, preparation of illustrations;

N.A. Varabyeva: design and synthesis of the compound;

Yu.A. Piven: compound design, molecular modeling, article writing, preparation of illustrations.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.М. Щербаков / A.M. Scherbakov: <https://orcid.org/0000-0002-2974-9555>

Д.В. Сорокин / D.V. Sorokin: <https://orcid.org/0000-0002-1264-7405>

Д.И. Сальникова / D.I. Salnikova: <https://orcid.org/0000-0002-0809-3710>

М.В. Гудкова / M.V. Gudkova: <https://orcid.org/0000-0003-2694-5232>

О.Е. Андреева / O.E. Andreeva: <https://orcid.org/0000-0002-6015-6619>

А.Л. Михайлова / A.L. Mikhaylova: <https://orcid.org/0000-0003-4022-6058>

А.О. Воробьева / N.A. Varabyeva: <https://orcid.org/0000-0003-4256-6646>

Ю.А. Пивень / Yu.A. Piven: <https://orcid.org/0000-0003-3640-0981>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (анализ сигнальных путей HSP90; проект № 24-15-00273) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (дизайн и синтез ингибитора HSP90; проект № X22MC-030).

Funding. This research was partly funded by the Russian Scientific Foundation (analysis of HSP90 signaling pathways; project No. 24-15-00273) and Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (HSP90 inhibitor design and synthesis; project No. X22MC-030).

Соблюдение правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The protocol of the study was approved by the committee on biomedical ethics of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.

Статья поступила: 25.10.2024. **Принята к публикации:** 01.11.2024. **Опубликована онлайн:** 11.12.2024.

Article submitted: 25.10.2024. **Accepted for publication:** 01.11.2024. **Published online:** 11.12.2024.