

НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, НИИ канцерогенеза
Лаборатория молекулярной эндокринологии
Московская школа на Юго-Западе №1543

**Исследование противоопухолевой активности
нового ингибитора Hsp90 и его комбинаций с
другими препаратами, проявляющими
противоопухолевую активность**

Г.К. Руденко
Н.В. Филатова
Научный руководитель:
Д.В. Сорокин

Москва 2025

Оглавление

Введение.....	3
Цели и задачи.....	5
Методика.....	5
Результаты.....	8
Обсуждение.....	12
Выводы.....	13
Благодарности.....	13
Список литературы.....	13

Введение

Химиотерапия – один из основных методов лечения онкологических заболеваний при помощи лекарственных препаратов. Она появилась еще в 1940-х годах, когда врачи решили использовать боевое отравляющее вещество иприт, проявляющее алкилирующие свойства, в качестве противоопухолевого средства (Ларионов, 1959). Его действие основано на разрушении ДНК раковых клеток. Впоследствии он дал начало целому семейству химиотерапевтических алкилирующих препаратов, которые используются в химиотерапии и по сей день.

На данный момент существуют противораковые препараты с принципиально разными механизмами действия. Исследуемое нами вещество N-(3-(2,4-Дигидрокси-5-изопропилфенил)-4,5,6,7-тетрагидробензи[d]изоксаксол-4-ил)-3-(1H-тетразол-1-ил)пропанамид (далее: #23) является ингибитором Hsp90. Белок Hsp90 – это шаперон, отвечающий за стабилизацию множества белков, в том числе неопластических. Шапероны – это широко распространенное семейство клеточных белков, которые обеспечивают правильное сворачивание других полипептидов и в некоторых случаях их сборку в олигомерные структуры, но не являющиеся компонентами этих конечных структур. Шапероны ингибируют непродуктивные пути сворачивания и сборки, которые привели бы к образованию неправильных структур. Они функционируют путем специфичного и нековалентного связывания с взаимодействующими белковыми поверхностями, которые временно обнажаются во время клеточных процессов. «Клиенты» Hsp90 в основном состоят из нестабильных сигнальных молекул, в частности киназ и факторов транскрипции, регулирующих передачу сигналов, транспорт белков, ремоделирование хроматина, аутофагию, пролиферацию клеток и выживание (Whitesell, Lindquist, 2005). Многие из этих «клиентов» - онкогенные белки, которые считаются ключевыми факторами возникновения и развития рака. Многие злокачественные процессы, включая рост опухоли, адгезию, инвазию, метастазирование и ангиогенез, неотделимы от регуляции и защиты HSP90 (Wu et al., 2017). Например, Hsp90 стабилизирует рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR), а также некоторые участники его сигнального пути. Эпидермальный фактор роста стимулирует пролиферацию и дифференцировку эпителиальных тканей, и изменения его сигнального пути могут приводить к развитию злокачественных опухолей. Несмотря на то, что ни один ингибитор Hsp90 пока не был одобрен FDA для лечения рака, их изучение остается приоритетной задачей (Birbo et al., 2021).

По состоянию на май 2024 года число известных ингибиторов Hsp90 доходило примерно до сотни соединений, но лишь 22 из них находились на стадии клинических испытаний (Rastogi et al., 2024). Ингибиторы Hsp90 обладают разными механизмами действия. Наиболее изученные, N-концевые ингибиторы АТФ-связывающего домена шаперона, конкурируют с АТФ, блокируя функцию Hsp90. Также ингибирование Hsp90 приводит к деградации «клиентов», блокируя их способность сворачиваться и/или стабилизироваться, что приводит к превращению белка при сворачивании в нестабильный мультибелковый комплекс, и в конечном итоге приводит к убиквитинированию и протеасомной деградации белкового субстрата (Blagg, 2005).

Главные недостатки химиотерапии – возникновение резистентности к препаратам и их высокая токсичность не только в отношении раковых клеток, но и всего организма в целом.

Зачастую противораковые препараты вызывают нежелательные побочные эффекты (Заридзе, 2004). Для борьбы с растущей резистентностью необходима повышенная доза препарата. Повышение дозы чревато усилением побочных эффектов, поэтому для увеличения терапевтического индекса лекарства (отношение максимальной не летальной дозы к минимальной дозе, дающей необходимый эффект) используется несколько препаратов в составе комбинированной терапии (Li et al., 2024). Действуя вместе, некоторые противораковые средства дают положительный синергический эффект: их суммарное действие превышает сумму эффектов каждого препарата по отдельности. Так можно достичь большей эффективности, подвергая организм меньшему токсическому воздействию. Обратная ситуация, когда препараты совместно работают хуже, называется «антагонистическим эффектом». Если же препараты не влияют на действие друг друга, это называется «аддитивным эффектом». В настоящий момент поиск комбинаций препаратов для комбинированного лечения рака – актуальная задача фармакологии. Мы поставили перед собой цель исследовать новый препарат на предмет синергии с уже известными и хорошо зарекомендовавшими себя в клинической практике противораковыми лекарствами. Для этой цели мы выбрали три популярных и хорошо зарекомендовавших себя в комбинированной терапии противораковых препаратов: цисплатин, доксорубицин и метформин. Все они применяются для лечения рака молочной железы и используются в составе разной комбинированной терапии. Последнее обусловлено в частности тем, что по отдельности цисплатин и доксорубицин вызывают крайне нежелательные побочные эффекты.

Цисплатин (цис-диаминдихлорплатина) – неорганическое комплексное соединение платины (рис. 1А). Цисплатин в организме переходит в активное состояние, когда два хлоридных лиганда в результате спонтанной реакции замещаются молекулами воды. В активной форме цисплатин связывается с пуриновыми основаниями ДНК, образуя межцепочечные и внутрицепочечные сшивки. Повреждения, вызванные цисплатином распознаются различными белками, например, белками системы mismatch репарации. При этом ингибирование транскрипции и обнаружение повреждений ДНК активируют и проапоптотические сигнальные пути. Таким образом, несмотря на то, что вследствие связывания цисплатина с ДНК активируются системы репарации, если повреждения оказываются критическими, происходит индукция апоптоза. Химиотерапия на основе цисплатина применяется для лечения множества разных онкологических заболеваний, в том числе рака молочной железы. Несмотря на то, что химиотерапия с цисплатином во многих случаях становится основным методом лечения, высока вероятность рецидива с приобретением резистентности. Так как токсическое действие цисплатина охватывает множество процессов, от проникновения вещества в клетку до апоптоза, на каждой из стадий этого каскада может возникнуть биохимическое изменение, которое усилит устойчивость клетки к препарату. Это делает резистентность к цисплатину многофакторной и усложняет решение этой проблемы. (Siddik, 2023) Цисплатин часто является основой для комплексной химиотерапии в синергии с множеством других препаратов. (Dasari, Tchounwou, 2014). Это дает нам повод надеяться на его положительный синергический эффект с новым препаратом, поэтому второй задачей нашей работы стало выявление этого эффекта.

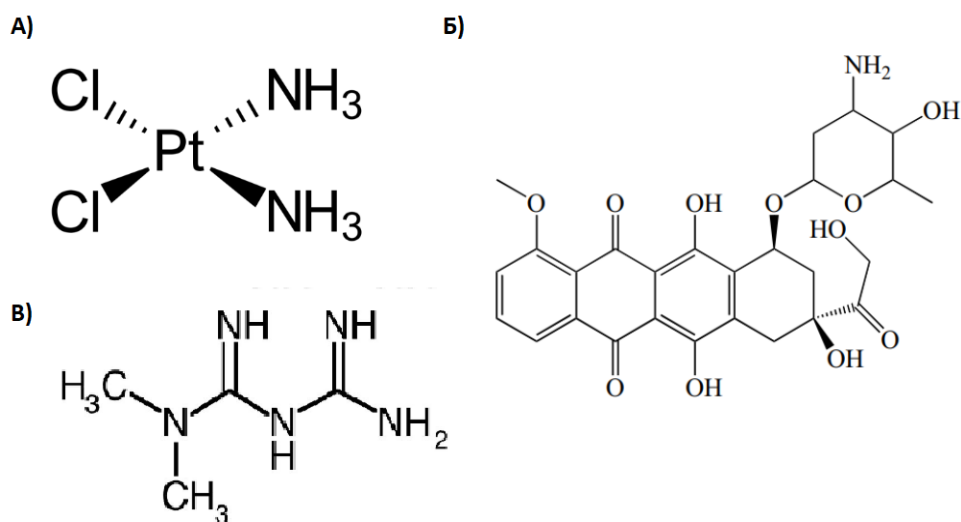


Рис. 1. Структурные формулы цисплатина (А), доксорубина (Б) и метформина (В). Изображения взяты с сайта Wikipedia.org.

Доксорубин (DOX) - распространенный противоопухолевый препарат антрациклинового ряда (рис. 1Б). Впервые Доксорубин был выделен из мутантного штамма бактерий *Streptomyces peucetius*. При попадании в клетку доксорубин способен как взаимодействовать непосредственно с ДНК (интеркалировать ДНК за счет образования водородных связей с гуанином, или образовывать DOX-ДНК аддукты посредством ковалентных связей), так и ингибировать топоизомеразу II. Интеркалирование приводит к изменению топологии ДНК, что негативно влияет на экспрессию генов (Kściuk et al., 2023). Образование аддуктов, в свою очередь, активирует системы ответа на геномные повреждения (DNA Damage Response = DDR). При связывании DOX с топоизомеразой II, её работа нарушается и образуются одно- и двухцепочечные разрывы ДНК. Такие разрывы тоже запускают каскад системы DDR, который приводит к остановке клеточного цикла и апоптозу. Наряду с сильным противоопухолевым действием, Доксорубин, как и остальные антрациклины обладает широким спектром побочных эффектов. Самый известный из них – кардиотоксичность. Кардиотоксичность DOX представляет собой совокупность множества биохимических процессов. Она обусловлена в основном образованием активных форм кислорода (АФК) и повышением уровня кальция, что, в свою очередь тоже приводит к повышению уровня АФК и апоптозу (Rawat et al, 2021).

Метформин (рис. 1В) – распространенный препарат для лечения сахарного диабета второго типа. Его эффективность в лечении диабета в основном объясняется подавлением глюконеогенеза (метаболического пути, приводящего к синтезу глюкозы из неуглеводных соединений) в печени. Считается, что метформин подавляет I комплекс дыхательной цепи, что приводит к увеличению соотношения концентраций аденозинмонофосфата и аденозинтрифосфата (АМФ/АТФ) и активации АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК), которая оказывает множество эффектов на энергетический метаболизм, включая подавление экспрессии генов глюконеогенеза (Ильиных и др., 2021). Клинические исследования показали, что применение метформина связано со значительным снижением заболеваемости раком у пациентов с сахарным диабетом. Известно, что кроме влияния на углеводный метаболизм, метформин повреждает метаболизм фолиевой кислоты в раковых клетках.

Целью настоящей работы стало выявить потенциальный синергетический эффект комбинаций препарата #23 с вышеупомянутыми противоопухолевыми препаратами. Для этого мы поставили следующую задачу:

1. Оценить эффективность комбинаций препарата #23 с цисплатином, метформином и доксорубицином.

Методика

Клеточная линия MCF-7

В 1970 году клеточная линия MCF-7 (Michigan cancer foundation) была получена из плеврального выпота пациентки с инвазивной протоковой карциномой молочной железы. (Levenson et al., 1997.) MCF-7 представляет собой не иммортализованную адгезивную клеточную линию, культивируемую в виде монослоя на пластмассовых чашках Петри (Долгих, Заморина, 2024). Использование этой клеточной линии в работе обусловлено ее популярностью, простотой в культивировании и высокой скоростью роста.

Культивирование клеток

Мы работали с клеточной культурой в ламинарном шкафу в стерильном боксе для исключения возможности контаминации образцов. Для культивирования клеточной линии MCF-7 мы использовали среду DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) с концентрацией глюкозы 4,5 г/л, FBS (fetal bovine serum) и добавлением антибиотика гентамицина для предотвращения развития бактерий в питательной среде. Мы культивировали клетки в инкубаторе при температуре 37 градусов по Цельсию, меняя питательную среду каждые 2-3 дня. Мы меняли среду по мере ее закисления, о чем свидетельствовало изменение ее цвета с розового на прозрачный, за счет присутствия фенолового красного.

Для проведения экспериментов мы пересаживали клетки из чашки Петри в пластмассовый планшет. Для этого из чашки Петри с клеточной культурой возрастом 3-5 дней мы удаляли среду и добавляли 100 мкл раствора трипсина-ЭДТА, разрушающего межклеточные контакты и контакты клеток с субстратом. После добавления раствора трипсина чашка Петри помещалась в лабораторный инкубатор на 10 минут. После этого мы сливали трипсин и отделенные клетки помещали в пробирку типа «Фалькон» с питательной средой. Число клеток мы определяли с помощью счетчика и анализатора жизнеспособности клеток, после чего устанавливали фиксированное их число для всех «лунок» планшета и добавляли их в него. Для экспериментов мы использовали культуральные планшеты на 24 лунки. Оставшиеся клетки мы помещали в новые чашки Петри для поддержания культуры (рис. 2).

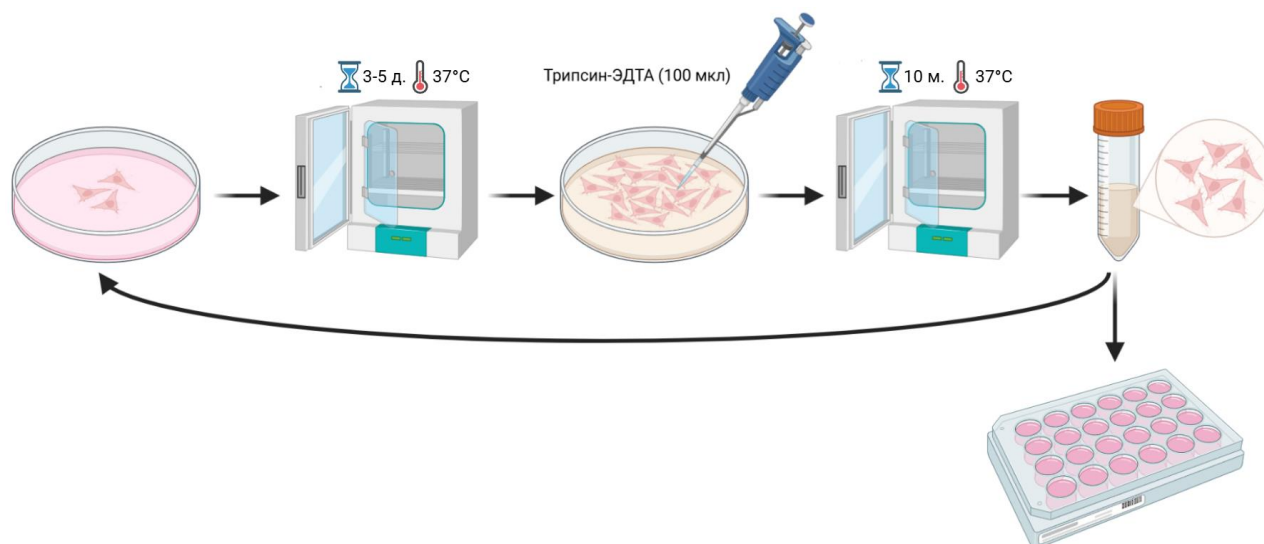


Рис. 2. Методика пересадки клеток. Изображение создано с помощью программы BioRender.

Между рассевом клеток и добавлением препаратов мы ожидали 48 часов, чтобы клетки прикрепились к субстрату и не находились в состоянии стресса. Для получения нужных концентраций препаратов мы использовали ряды разведений, пример которых отображен на рис. 3. При выборе действующих концентраций мы опирались на исследования, предшествующие нашему. Для метформина были выбраны концентрации 10, 20 и 30 mM (Щербаков, 2016), для доксорубина — 0,5, 0,1 и 0,15 mM (Müller, et al, 1996) а для цисплатина — 1,5, 3 и 6 mM. Концентрации препарата #23 мы подбирали экспериментально. В комбинации с цисплатином и доксорубином: 0,015625, 0,03125, 0,0625, 0,125 и 0,25 mM, а для эксперимента с метформином 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 и 1 mM.

Выживаемость клеток во всех экспериментах мы оценивали с помощью МТТ-теста и последующей спектрофотометрии. МТТ-тест основан на способности живых клеток восстанавливать анион тетразола желтого цвета до нерастворимого формазана синего цвета с помощью митохондриальной сукцинатдегидрогеназы (Mosmann, 1983).

Мы удаляли питательную среду из лунок и добавляли раствор тетразола. Клетки с раствором мы оставляли в инкубатора на 30-40 минут, после чего удаляли раствор и лизировали клетки с помощью DMSO (Dimethyl sulfoxide), который также служил и растворителем для формазана. Образовавшийся раствор с формазаном мы анализировали с помощью спектрофотометра на длине волны 415 нм.

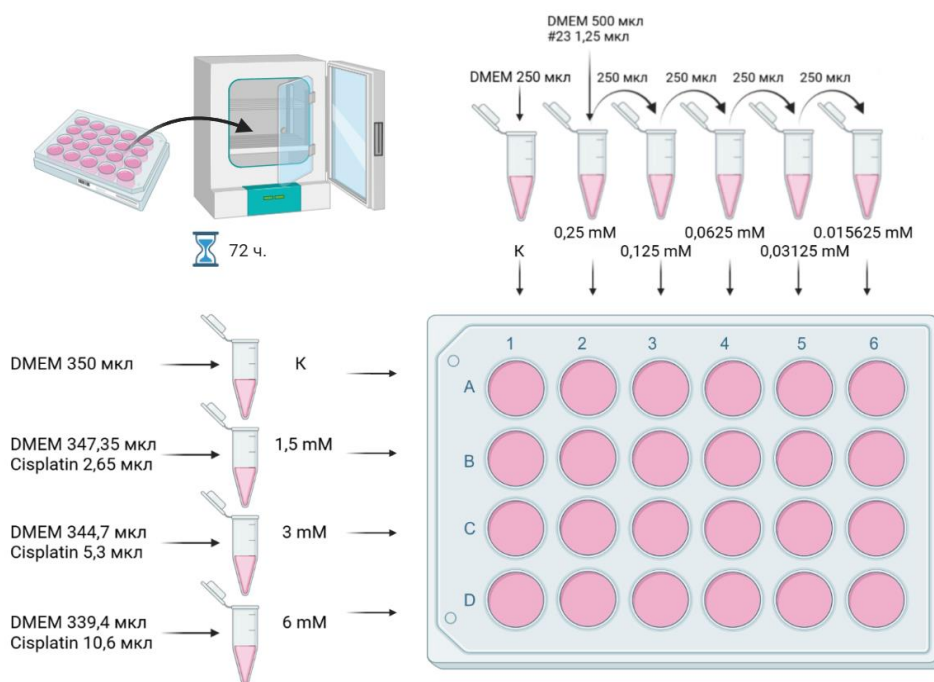


Рис. 3. Дизайн эксперимента для комбинации препарата #23 и цисплатина
Изображение создано с помощью программы BioRender.

Спектрофотометрия — это измерение поглощения атомом или молекулой электромагнитного излучения в диапазоне длин волн ультрафиолетового (УФ), видимого и ближнего инфракрасного (ИК) света для определения количества или идентичности присутствующего вещества (Bachmann, Miller, 2020)

Полученные после спектрофотометрии матрицы со значениями оптической плотности обрабатывались в программе Microsoft Excel. Образцы DMSO с красителем из каждой лунки культурального планшета мы добавляли в две разные лунки на планшет для спектрофотометрии. Это позволяло уменьшить погрешность спектрофотометра. В итоговых матрицах этих экспериментов каждое значение выживаемости – среднее арифметическое двух измерений спектрофотометра. Так как значения оптической плотности отражают выживаемость клеток, за 100% выживаемости мы принимали значение, полученное в контрольной лунке. Нормализованные таким образом матрицы экспериментов оформлялись по шаблону для дальнейшей обработки программой SynergyFinder 3.0 для выявления синергических, аддитивных или антагонистических отношений препаратов. SynergyFinder позволяет оценить эффект комбинации препаратов с помощью нескольких референсных математических моделей. (Ianevski et al., 2022) Такие модели отражают ожидаемый эффект комбинации препаратов, при условии, что их действие независимо (наша нулевая гипотеза). Так как разные референсные модели основаны на разных предположениях о действии лекарственных препаратов, интерпретация результатов напрямую зависит от выбора наиболее подходящей модели (Duarte, Vale, 2022). SynergyFinder 3.0 реализует 5 таких моделей: Bliss independence, HSA, Loewe, ZIP и Bliss_Loewe.

При интерпретации данных мы опирались на индекс синергии по каждой из моделей. Он может принимать значения от -20 до 20 и отражает средний избыточный ответ в процентах при взаимодействии двух препаратов. Например, индекс синергии 5 говорит о том, что ответ комбинации препаратов в среднем на 5% выше ожидаемого. Значения от -20 до -10 свидетельствуют об антагонистических отношениях препаратов, от 10 до 20 свидетельствуют

о синергических отношениях, а значения от -10 до 10 говорят о том, что отношения препаратов скорее всего аддитивные.

Для визуализации результатов мы также использовали SynergyFinder. С помощью него были составлены тепловые карты, графикам зависимости ответа от концентрации препарата, двумерные и трехмерные графики.

Результаты

Цисплатин + #23

На рис. 4 А и Б представлены соответственно графики зависимости смертности от концентраций цисплатина и #23 и тепловая карта смертности клеток. Графики аппроксимированы с помощью алгоритма LL4 (). Далее (рис. 5) – тепловая карта смертности клеток. На рис. 6 представлены тепловые карты и индексы синергии для пяти различных референсных моделей. Все референсные модели показывают положительные значения индекса синергии: Bliss independence (3,919), Loewe (3,125), Bliss_Loewe (1,994), HSA (6,071), ZIP (3,89). Значения индексов для каждой из моделей <10, поэтому по этим данным нельзя достоверно утверждать, что комбинация цисплатина и #23 в данных концентрациях демонстрирует синергию.

Метформин + #23

На рис. 7 представлены графики зависимости смертности клеток от концентрации каждого из препаратов. Здесь стоит отметить, что ряд разведений для препарата #23 отличается от того, что использовался в предыдущем эксперименте. График из первого эксперимента (рис. 4А) показывает, что значительный рост ответа происходит на максимальных концентрациях, поэтому мы решили использовать большие концентрации препарата #23 в этом эксперименте. На рис. 8 показана тепловая карта смертности клеток. Далее приведены тепловые карты синергии для этой комбинации с использованием всех доступных в SynergyFinder 3.0 референсных моделей (рис. 9). Четыре из пяти использованных нами референсных моделей показывают отрицательный индекс синергии: ZIP (-4,165), Bliss independence (-4,329), Loewe (-1,666) и Bliss_Loewe (-5,644). В отличие от них, индекс HSA слабо положительный. Ни одно из этих значений не выходит за пределы промежутка от -10 до 10, следовательно, нельзя достоверно утверждать, что препарат #23 в комбинации с Метформином проявляет антагонизм или синергию. Несмотря на это, все референсные модели, кроме HSA, показывают слабый антагонизм, в основном при больших концентрациях препарата #23.

Доксорубин + #23

Для комбинации доксорубина и #23 приведена исключительно тепловая карта смертности клеток в зависимости от концентраций препаратов. К сожалению, низкое качество полученных данных по этой комбинации не позволило нам проанализировать совместный эффект этих препаратов.

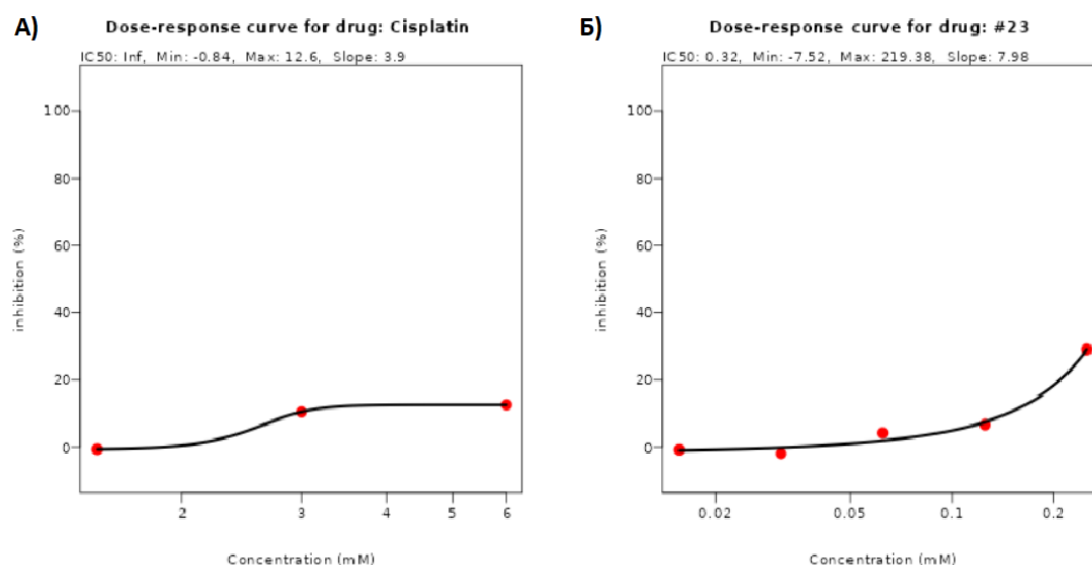


Рис. 4. Графики зависимости процента смертности клеток от дозы А) цисплатина Б) препарата #23. Изображение создано с помощью программы SynergyFinder 3.0.

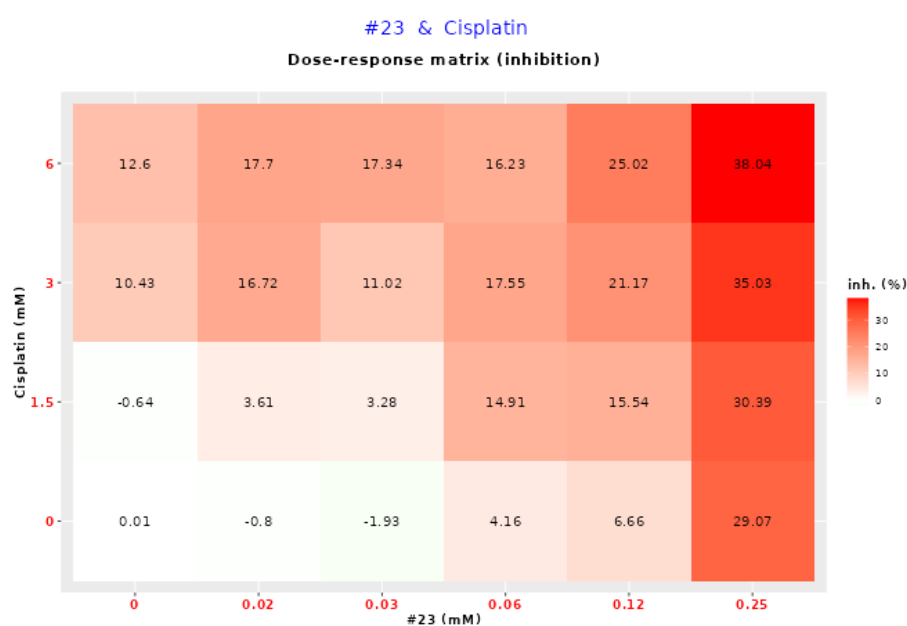


Рис. 5. Тепловая карта процента смертности клеток для комбинации препарата #23 и цисплатина. Каждая клетка соответствует одной экспериментальной лунке. Оттенками цвета от зелёного до красного обозначается смертность. Оттенки красного – положительные значения, оттенки зелёного – отрицательные. Изображение создано с помощью программы SynergyFinder 3.0.

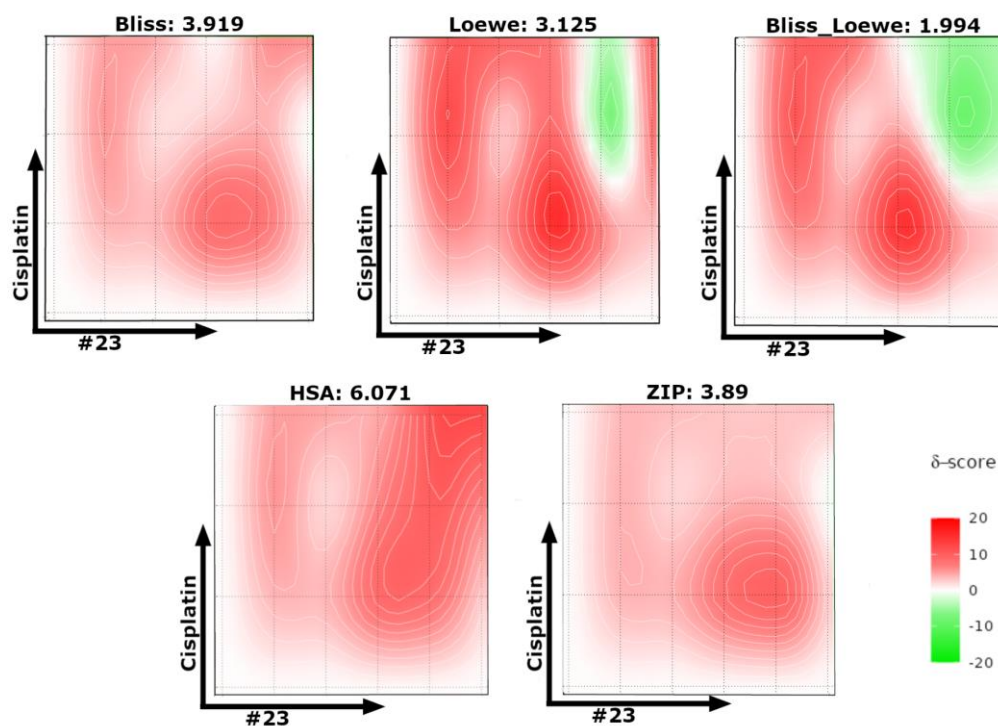


Рис. 6. Тепловые карты уровня синергии и индексы синергии для комбинации препарата #23 и цисплатина, посчитанные с помощью моделей Bliss independence, Loewe, Bliss_Loewe, HSA и ZIP. Оттенками зелёного показан отрицательный индекс синергии, красным – положительный. Изображение создано с помощью программы SynergyFinder 3.0.

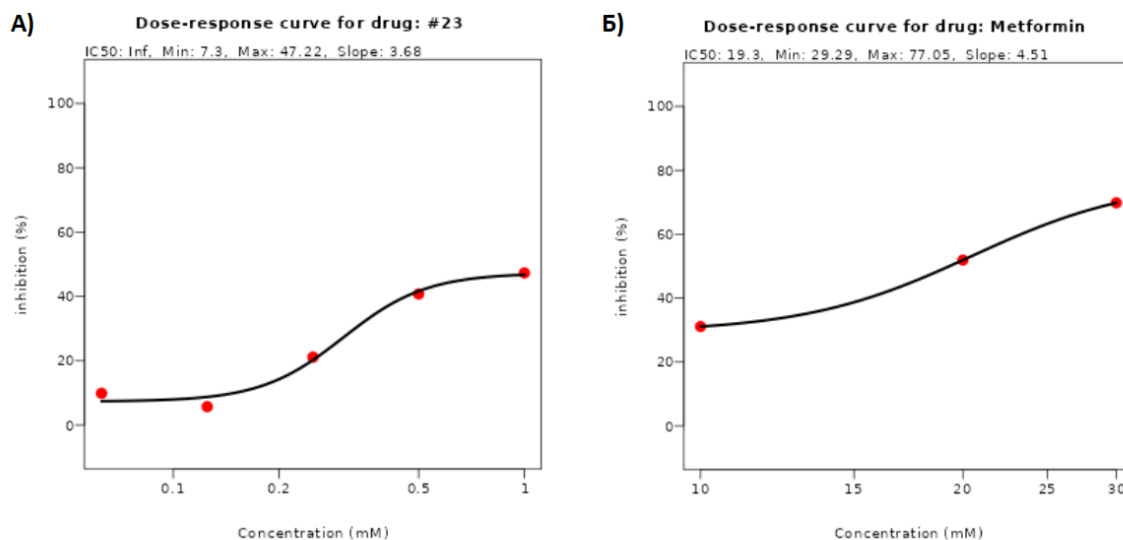


Рис. 7. Графики зависимости процента смертности клеток от дозы А) препарата #23 Б) метформина. Изображение создано с помощью программы SynergyFinder 3.0.

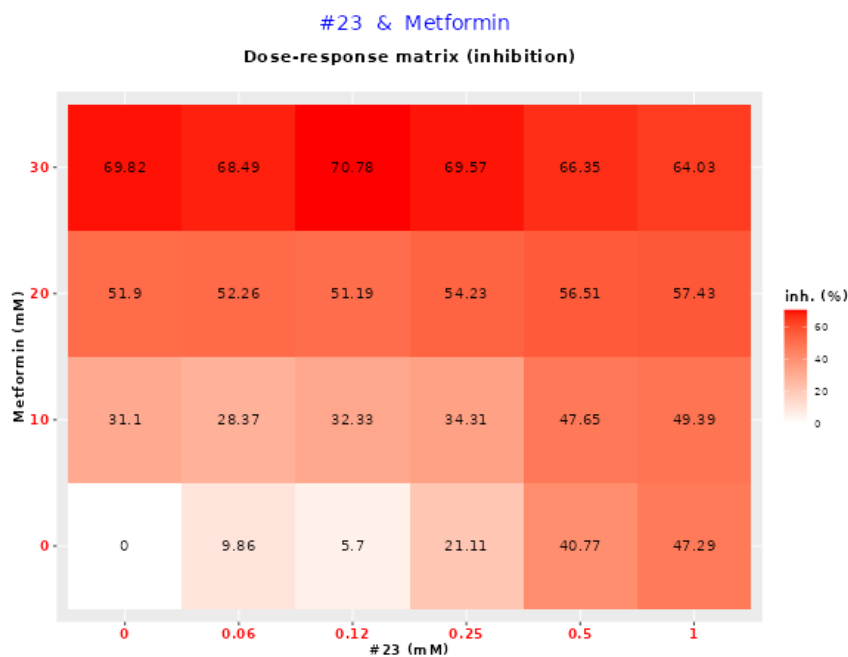


Рис. 8. Тепловая карта процента смертности клеток для комбинации препарата #23 и метформина. Каждая клетка соответствует одной экспериментальной лунке. Оттенками цвета от зелёного до красного обозначается смертность. Оттенки красного – положительные значения, оттенки зелёного – отрицательные. Изображение создано с помощью программы SynergyFinder 3.0.

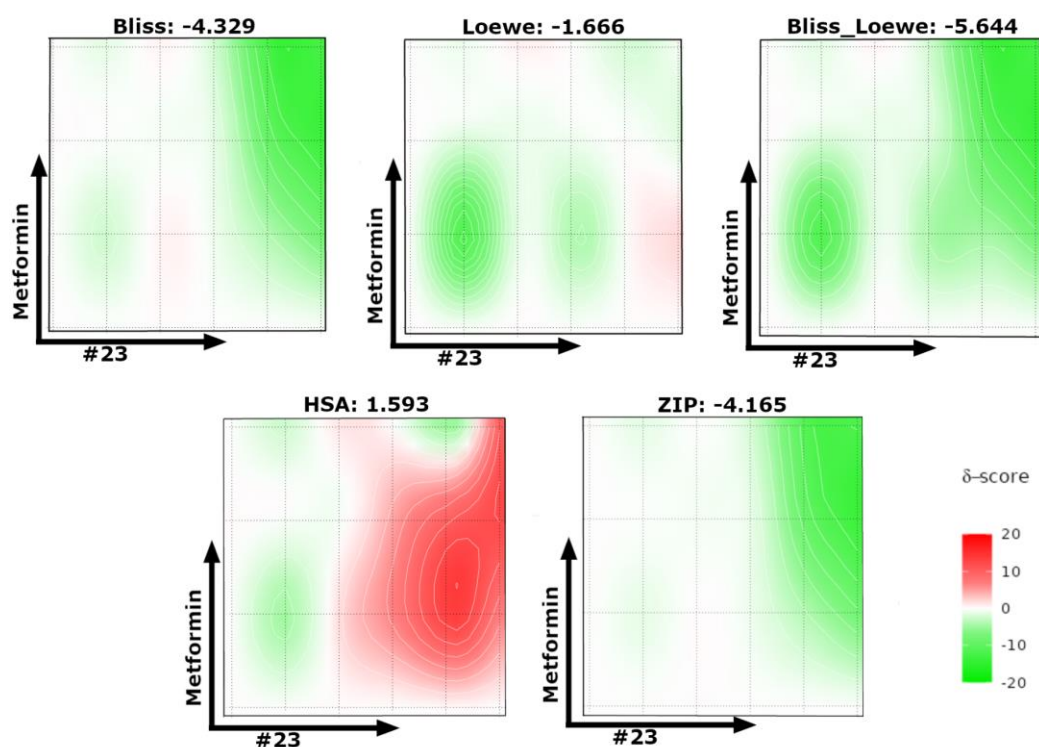


Рис. 9. Тепловые карты уровня синергии и индексы синергии для комбинации препарата #23 и метформина, посчитанные с помощью моделей Bliss independence, Loewe,

Bliss_Loewe, HSA и ZIP. Оттенками зелёного показан отрицательный индекс синергии, красным – положительный. Изображение создано с помощью программы SynergyFinder 3.0.

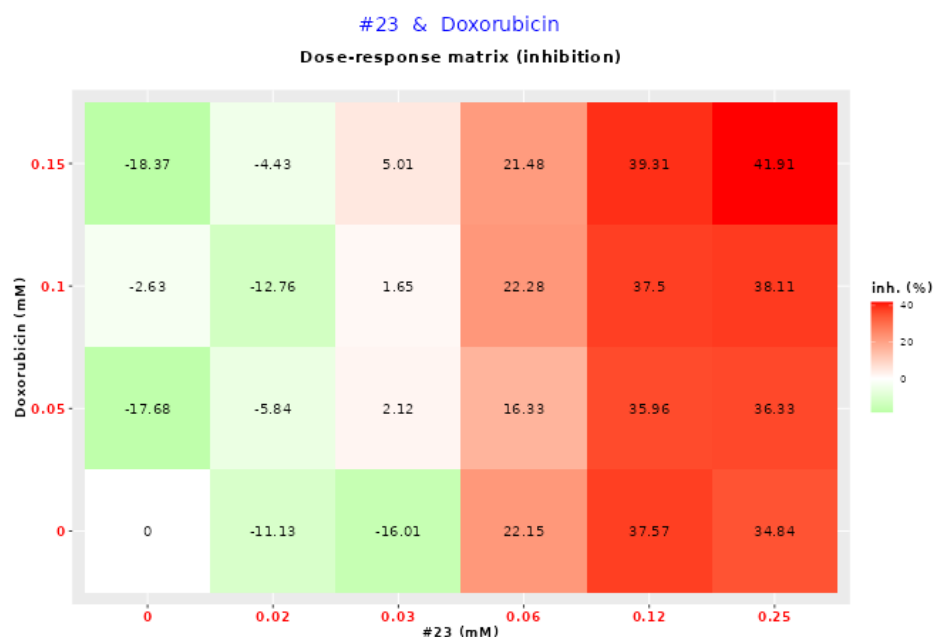


Рис. 10. Тепловая карта процента смертности клеток для комбинации препарата #23 и доксорубина. Каждая клетка соответствует одной экспериментальной лунке. Оттенками цвета от зелёного до красного обозначается смертность. Оттенки красного – положительные значения, оттенки зелёного – отрицательные. Изображение создано с помощью программы SynergyFinder 3.0.

Обсуждение

Мы оценили несколько референсных моделей, чтобы понять, какие из них наиболее показательны в нашем случае. Рассматриваемые нами модели делятся на доза-эффект-ориентированные и эффект-ориентированные. Первая из них – HSA (Highest Single Agent). В этой модели эффект комбинации лекарственных средств сравнивается только с наиболее эффективным отдельным средством, не принимая во внимание ожидаемый эффект от обоих средств в комбинации (Foucquier and Guedj, 2015). По этой причине она менее подходящая для нас. Модель Loewe Additivity основана на принципе эквивалентности доз: доза первого препарата эквивалентна дозе другого препарата для любого заданного эффекта. (Lederer et al., 2019). Loewe имеет некоторые ограничения, в основном связанные с кривыми зависимости дозы от эффекта каждого отдельного препарата (Duarte et al, 2022) Мы не имели возможности построить данные кривые в связи с нехваткой ресурсов, поэтому для нас эта модель не столь показательна. Bliss independence предполагает, что оба препарата, используемые в комбинации, способны действовать независимо. (Greco et al., 1995). Модели Bliss_Loewe и ZIP (Zero interaction potency) являются комбинациями моделей Bliss independence и Loewe Additivity. Мы считаем, что для наших условий наиболее удачной будет Bliss independence, потому что она менее требовательна к качеству результатов и работает на подходящих нам допущениях.

По результатам проведенных экспериментов мы не можем доказать наличие синергического эффекта ни в одной из комбинаций.

В комбинации #23 с цисплатином мы можем наблюдать стабильный аддитивный эффект с тенденцией к слабому синергизму в определенных концентрациях. Можно предположить, что положительный индекс связан с тем, что элементы сигнальных путей опухолевой клетки, отвечающих за реакцию на повреждение ДНК цисплатином, являются клиентскими белками Hsp90, #23 ингибирует Hsp90, тормозя ответ на повреждения.

В комбинации с метформином эффект незначителен, потому мы не можем говорить как о синергии, так и об антогонизме.

К сожалению, точность экспериментов с доксорубицином недостаточна из-за многочисленных погрешностей во время их проведения, чтобы говорить о наличии или отсутствии синергии.

Выводы

1. В комбинациях препарата #23 с цисплатином и препарата #23 с метформином наблюдается аддитивный эффект

Благодарности

Большое спасибо НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина за предоставление возможности проведения исследований, в особенности Михаилу Александровичу Красильникову, заведующему лабораторией молекулярной эндокринологии. Благодарим Щербакова Александра Михайловича за научные идеи. Спасибо Семутникову Кириллу Сергеевичу за помощь в постановке экспериментов. Благодарим Глаголева Сергея Менделевича за организацию научной практики. А также спасибо Штутману Михаилу Соломоновичу за рецензирование работы.

Список литературы

1. Долгих М.Д., Заморина С.А. Клеточная линия MCF-7: характеристика и взаимодействие с наноматериалами разной структуры. Вестник Пермского университета, Серия Биология. 2024, 2, 231–247.
2. Заридзе Д.Г. Канцерогенез. Москва, Медицина, 2004. – 576 с., ил.
3. Ильиных М.Г., Бахтин В.М., Изможерова Н.В. Механизмы действия метформина. VI Международная (76 Всероссийская) научно-практическая конференция «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения», 2021, 982–986.
4. Ларионов Л.Ф. Современное состояние и перспективы химиотерапии злокачественных опухолей с помощью алкилирующих соединений. Вопросы онкологии, 1959, 5(3), 290–298.
5. Birbo B., Madu E.E., Madu C.O., Jain A., Lu Y. Role of HSP90 in Cancer. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22(19), 10317.

6. Blagg B.S.J., Kerr T.D. Hsp90 inhibitors: small molecules that transform the Hsp90 protein folding machinery into a catalyst for protein degradation. *Medicinal Research Reviews*, 2006, 26(3), 310-38.
7. Dasari S., Tchounwou P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* 2014, 740, 364–378.
8. Duarte D., Vale N. Evaluation of synergism in drug combinations and reference models for future orientations in oncology. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, 2022, 3, 100110.
9. Foucquier, J., Guedj, M., Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology Research & Perspectives*, 2015, 3 (3), e00149
10. Greco, W.R., Bravo, G., Parsons, J.C., The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacology Research & Perspectives*, 1995, 47 (2), 331–385.
11. Ianevski A., Giril A.K., Aittokallio T. SynergyFinder 3.0: an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(W1), W739–W743.
12. Kciuk M., Gielecińska A., Mujwar S., Kołat D., Kałuzińska-Kołat Ż., Celik I, Kontek R. Doxorubicin-An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells*, 2023 12(4), 659.
13. Lederer, S., Dijkstra, T.M.H., Heskes, T., Additive dose response models: defining synergy. *November Frontier in Pharmacology*, 2019, 10, 1–15.
14. Levenson A.S., Jordan V.C. MCF-7: The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line. *Perspectives in Cancer Research*, 1997, 57(15), 3071–3078.
15. Li Q., Chen S., Wang X., Cai J., Huang H., Tang S., He D. Cisplatin-Based Combination Therapy for Enhanced Cancer Treatment. *Curr Drug Targets*. 2024, 25(7), 473–491.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological Methods*, 1983, 65, 55–63.
17. Müller I., Jenner A., Bruchelt G., Niethammer D., Halliwell B. Effect of Concentration on the Cytotoxic Mechanism of Doxorubicin—Apoptosis and Oxidative DNA Damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 230(2), 254–257.
18. Rastogi S., Joshi A., Sato N., Lee S., Lee M.-J., Trepel J.B., Neckers L. An update on the status of HSP90 inhibitors in cancer clinical trials. *Cell Stress Chaperones*, 2024, 29(4), 519–539
19. Rawat P.S., Jaiswal A., Khurana A., Bhatti J.S., Navik U. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139, 111708.

20. Scherbakov A. M., Sorokin D. V., Tatarskiy V. V., Jr, Prokhorov N. S., Semina, S. E., Berstein L. M., & Krasilnikov, M. A. The phenomenon of acquired resistance to metformin in breast cancer cells: The interaction of growth pathways and estrogen receptor signaling. *IUBMB life*, 2016, 68(4), 281–292.
21. Siddik Z. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 2003 22, 7265–7279.
22. Varabyeva N.A., Scherbakov A.M., Salnikova D.I., Sorokin D.V., Khamidullina A.I., Mikhaylova A.L., Paulovich D.I., Lakhvich F.A., Piven Y.A. Novel N-(4,5,6,7-tetrahydrobenzisoxazol-4-yl)amides as HSP90 inhibitors: design, synthesis and biological evaluation. *RSC Medicinal Chemistry*, 2025, 16, 2697-2711.
23. Weiss R.B., Christian M.C. New cisplatin analogues in development: a review. *Drugs*, 1993, 46, 360–377.
24. Whitesell L., Lindquist S.L. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature Reviews Cancer* 2005, 5(10), 761-72.
25. Wu J., Liu T., Rios Z., Mei Q., Lin X., Cao, S. Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2017, 38, 226–256.
26. Yadav, B., Wennerberg, K., Aittokallio, T., Tang, J., Searching for drug synergy in complex dose-response landscapes using an interaction potency model. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2015, 13, 504–513.