

# Оценка синергетического эффекта комбинации доксорубицина и вориностата в отношении опухолевых клеток молочной железы с помощью модели Loewe

\*М. Р. МОЛЛАЕВА<sup>1</sup>, Н. Г. ЯББАРОВ<sup>1</sup>, М. Б. СОКОЛ<sup>1</sup>,  
М. В. ЧИРКИНА<sup>1</sup>, Е. Д. НИКОЛЬСКАЯ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

## Evaluation of the Synergistic Effect of the Combination of Doxorubicin and Vorinostat on Breast Tumor Cells Using the Loewe Model

\*MARIYA R. MOLLAEVA, NIKITA G. YABBAROV, MARIYA B. SOKOL,  
MARGARITA V. CHIRKINA, ELENA D. NIKOLSKAYA

Emanuel Institute of Biochemical Physics of the RAS (IBCP RAS), Moscow, Russia

### Резюме

Комбинация двух или более лекарственных средств находит всё большее применение при разработке новых схем лечения различных заболеваний. Так, использование комбинаций ингибиторов гистон деацетилаз с традиционными препаратами для лечения солидных злокачественных новообразований является актуальным направлением. Данное исследование посвящено поиску эффективного соотношения вориностата (SAHA) и доксорубицина (DOX) для терапии различных подтипов опухоли молочной железы. С помощью МТТ-теста оценили выживаемость клеток линий HCC-1954, SKBR-3, MCF-7, MCF-7/ADR, MDA-MB-231 в условиях инкубации с 64 вариантами концентрационных комбинаций SAHA и DOX, что позволило определить эффект взаимодействий комбинаций SAHA/DOX (антагонистический, аддитивный, синергетический). Провели расчёт индекса синергизма SAHA/DOX с помощью математической модели Loewe. Эффект соотношений SAHA/DOX, обладающих наибольшим индексом синергизма в отношении каждой линии опухолевых клеток, подтверждали с помощью метода Чоу–Талалай. Было показано, что наибольший синергизм комбинация SAHA/DOX проявляла в отношении клеток линий HCC-1954, MCF-7/ADR и SKBR-3, относящихся к HER2-позитивному подтипу. Среднее значение соотношений SAHA/DOX, обладающих наибольшим синергизмом в отношении опухолевых клеток, составило 30:1 (SAHA к DOX, соответственно). Способность выявленной комбинации эффективно стимулировать апоптоз была подтверждена на наиболее чувствительных к SAHA/DOX терапии клетках линии HCC-1954. Таким образом, модель Loewe позволила выявить комбинацию препаратов, обладающую синергетическим эффектом, что подтверждалось методом Чоу–Талалай, а полученные данные свидетельствуют о перспективности использования комбинации SAHA/DOX (30:1) в лечении HER2-позитивного подтипа опухолей молочной железы.

**Ключевые слова:** доксорубицин; вориностат; цитотоксическая активность; синергизм; апоптоз; рак молочной железы

**Для цитирования:** Моллаева М. Р., Яббаров Н. Г., Сокол М. Б., Чиркина М. В., Никольская Е. Д. Оценка синергетического эффекта комбинации доксорубицина и вориностата в отношении опухолевых клеток молочной железы с помощью модели Loewe. *Антибиотики и химиотер.* 2023; 68: 7–8: 53–61. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-53-61>.

### Abstract

The combination of two or more medications is increasingly more common in the development of new treatment guidelines for common diseases. Thus, the use of combinations of histone deacetylase inhibitors with chemotherapeutic agents is a current trend in solid tumor treatment. The aim of this study was to investigate an effective vorinostat (SAHA) to doxorubicin (DOX) ratio for the treatment of different subtypes of breast cancer. The survival of HCC-1954, SKBR-3, MCF-7, MCF-7/ADR, MDA-MB-231 cell lines was assessed under incubation conditions with 64 variants of SAHA and DOX combinations using the MTT assay. This made it possible to determine the effect of interactions of SAHA/DOX combinations (antagonistic, additive, synergistic), as well as calculate the SAHA/DOX synergy index using the Loewe additivity model. The effect of SAHA/DOX ratios with the highest synergistic index for each tumor cell line was confirmed using the Chou-Talalay method. It was shown that the SAHA/DOX combination exhibited the greatest synergism in relation to HCC-1954, MCF-7/ADR and SKBR-3 cell lines belonging to the HER2-positive subtype. The average value of SAHA/DOX ratio with the highest synergy against breast cancer cells was 30:1 (SAHA to DOX, respectively). The ability of SAHA/DOX combination to effectively trigger apoptosis was confirmed in the most sensitive to SAHA/DOX therapy HCC-1954 cells. Thus, the Loewe

© Коллектив авторов, 2023

\*Адрес для корреспонденции: ул. Косыгина, д. 4, ИБХФ, г. Москва, Россия, 119334. E-mail: mollaevamariia@gmail.com

© Team of Authors, 2023

\*Correspondence to: 4 Kosygina, st., Emanuel Institute of Biochemical Physics, Moscow, 119334 Russia. E-mail: mollaevamariia@gmail.com

model made it possible to identify the drug combination with the highest synergistic anticancer effect, which was confirmed using Chou-Talalay method. The data obtained demonstrates great potential of SAHA/DOX combination (30:1) for the treatment of HER2-positive breast cancer.

**Keywords:** doxorubicin; vorinostat; cytotoxic activity; synergy; apoptosis; breast cancer

**For citation:** Mollaeva M. R., Yabbarov N. G., Sokol M. B., Chirkina M. V., Nikolskaya E. D. Evaluation of the synergistic effect of the combination of doxorubicin and vorinostat on breast tumor cells using the Loewe model. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 7–8: 53–61. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-53-61>.

## Введение

Злокачественные опухоли молочной железы являются наиболее распространённым онкологическим заболеванием среди женщин [1]. В 2020 г. в России было зарегистрировано 65 тыс. новых случаев, что составило 21,2% от всех диагностированных злокачественных новообразований [2]. Сложность лечения данного заболевания состоит в гетерогенности опухоли молочной железы и наличии различных молекулярных подтипов. Среди них выделяют люминальный А и люминальный В (наличие рецепторов эстрогена и прогестерона, отсутствие экспрессии рецепторов эпидермального фактора роста человека 2-го типа (HER2)); HER2-позитивный подтип (характеризуется экспрессией HER2, может разделяться на подтипы ER+HER2+ или люминальный ERBB2+ в зависимости от наличия рецепторов гормонов); базально-подобный подтип или тройной негативный (отсутствие рецепторов гормонов и HER2). Молекулярный подтип опухоли молочной железы может в значительной мере влиять на прогноз заболевания и методы лечения [3, 4].

Наиболее распространёнными видами терапии пациентов с опухолью молочной железы являются хирургия, химиотерапия, радиотерапия и гормональная терапия. Хирургия и радиотерапия применяются для лечения опухоли молочной железы на ранней стадии; для лечения метастатического рака молочной железы используется комбинация химиотерапии и гормональной терапии [5]. Однако появление мутаций в опухолевых клетках, приводящих к изменению молекулярных мишеней, появлению лекарственной устойчивости и прогрессированию опухоли, может влиять на эффективность терапии, в связи с чем, оптимизация существующих схем лечения и поиск новых комбинаций лекарственных препаратов являются актуальными задачами для исследования [6, 7].

Использование полихимиотерапии (комбинационной химиотерапии) в лечении опухолевых заболеваний имеет значительные преимущества за счёт снижения доз вводимых препаратов, уменьшения побочных эффектов и преодоления лекарственной устойчивости опухолевых клеток [8–10]. На сегодняшний день полихимиотерапия находит широкое применение

в клинической практике [3]. Полихимиотерапия, включающая доксорубин (DOX), является стандартной терапией первой линии опухолевых заболеваний, обеспечивающей высокую частоту ремиссии. DOX и его аналоги (даунорубин, эпирубин) — известные антрациклиновые антибиотики, применяющиеся для лечения широкого ряда злокачественных новообразований, в том числе опухоли молочной железы [11]. Их механизм действия заключается в ингибировании клеточной пролиферации и стимулировании апоптоза, однако возникающая лекарственная устойчивость опухолевых клеток к ним зачастую может снижать эффективность лечения [12]. В настоящее время для повышения чувствительности к терапии DOX злокачественных новообразований активно исследуются вещества-прооксиданты, поскольку известно, что повышение активных форм кислорода может приводить к активации программируемой гибели клеток и ингибированию ферментов, ответственных за возникновение резистентности клеток к химиотерапевтическим препаратам [13].

Вориностат (SAHA) — ингибитор гистон деацетилазы, обладающий противоопухолевой активностью за счёт образования активных форм кислорода, ингибирования ангиогенеза, клеточной пролиферации и стимулирования апоптоза [13–15]. В источниках литературы указывается, что SAHA может способствовать снижению активности транскрипционного фактора NRF2, повышая тем самым, чувствительность опухолевых клеток к DOX [16, 17]. Показано, что применение SAHA повышает эффективность DOX в отношении клеток карциномы шейки матки человека HeLa, нейробластомы человека SK-N-BE(2)C и остеосаркомы человека MG-63; также известно, что комбинация SAHA/DOX находится на II стадии клинических испытаний для лечения острого лимфобластного лейкоза [18–22]. Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что DOX и SAHA являются перспективной комбинацией для лечения опухолевых заболеваний, а исследование их комбинированного влияния на опухолевые клетки может выявить новые мишени для полихимиотерапии и способствовать развитию новых протоколов лечения злокачественных новообразований.

Таким образом, анализ активности комбинаций SAHA/DOX в отношении различных подтипов

опухолевых клеток молочной железы позволит выявить наиболее чувствительные к препаратам клетки, а также оценить эффект их совместного действия (синергетический, аддитивный, антагонистический). Предполагается, что определение более чувствительных и резистентных к лечению подтипов клеток может способствовать появлению новых комбинаций препаратов, направленных на повышение эффективности химиотерапии, а также уточнению механизмов цитотоксической активности комбинации.

В последние годы, в различных областях науки набирает популярность использование математических подходов на основе построения многомерных матриц для выявления взаимосвязей: для оптимизации составов полимерных плёнок, волокон и частиц в химии полимеров; для оптимизации соотношений лекарственных препаратов в комбинационной терапии; для оптимизации условий проведения анализов в аналитической химии и т. д. [23]. На основе матриц зависимости были выбраны оптимальные соотношения SAHA и DOX, было подтверждено наличие сильного синергизма комбинаций препаратов в отношении опухолевых клеток молочной железы и рассчитано среднее значение соотношения концентраций между SAHA и DOX, оптимальное для всех исследованных линий. Подобный подход к определению соотношений веществ обеспечивает приоритетность эффективных комбинаций для дальнейших доклинических исследований, а также может применяться для дизайна новых носителей и созданию новых схем лечения в клинической практике. Также в отношении наиболее чувствительных клеток линии HCC-1954 был проведён сравнительный анализ способности оптимизированного соотношения SAHA/DOX и индивидуальных препаратов стимулировать апоптоз.

## Материал и методы

В работе использованы: вориностаг (SAHA, MedChem-Express, США); доксорубин (DOX, Sigma-Aldrich, США); DMEM (Sigma-Aldrich, США); RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, США); эмбриональная бычья сыворотка (ЭБС, Sigma-Aldrich, США); гентамицин (Sigma-Aldrich, США); фосфатно-солевой буфер (ФСБ, Amreso, США); диметилсульфоксид (ДМСО, Sigma-Aldrich, США); трипсин (Serva, Германия); этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА, Sigma-Aldrich, США), пропилий иодид (Biolegend, США); аннексин V (Biolegend, США); 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ил]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (MTT, Sigma-Aldrich, США).

**Культивирование клеток.** Клетки линий MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека), MCF-7/ADR (аденокарцинома молочной железы человека, устойчивая к адриамицину и обладающая фенотипом множественной лекарственной устойчивости) и MDA-MB-231 (аденокарцинома молочной железы человека) культивировали на среде DMEM или RPMI 1640 в случае клеток линий SKBR-3 (аденокарцинома молочной железы человека) и HCC-1954 (карцинома молочной железы человека). К культуральным средам добавляли 10% ЭБС и 50 мкг/мл гентамицина. Культивирование проводили в

пластиковых флаконах ёмкостью 25 см<sup>3</sup> при +37°C в увлажнённой атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Клетки рассевали до достижения 80% конfluence с использованием раствора трипсина-ЭДТА (0,05% трипсина-ЭДТА для MCF-7, MCF-7/ADR и 0,25% трипсина-ЭДТА для MDA-MB-231, SKBR-3 и HCC-1954).

**Анализ выживаемости клеток.** Клетки линий MCF-7, MCF-7/ADR, HCC-1954, SKBR-3 и MDA-MB-231 рассевали на 96-луночные планшеты (5×10<sup>3</sup> клеток на лунку) за 24 ч до эксперимента и инкубировали в стандартных условиях. DOX и SAHA индивидуально и в комбинации добавляли к клеткам в диапазоне концентраций 0,01–816 мкМ и 3,4–430 мкМ, соответственно, для клеток линии MCF-7; 0,55–70 мкМ и 0,03–3,2 мкМ, соответственно, для клеток линии MCF-7/ADR; 0,004–0,5 мкМ и 2,9–370 мкМ, соответственно, для клеток линии HCC-1954; 0,001–0,14 мкМ и 0,04–4,5 мкМ, соответственно, для клеток линии SKBR-3; 0,08–1 мкМ и 0,31–40 мкМ, соответственно, для клеток линии MDA-MB-231. Далее клетки инкубировали в течение 72 ч. Выживаемость клеток определяли с помощью стандартного МТТ анализа [24]. Жизнеспособность клеток определяли по формуле 1:

$$\text{Выживаемость} = \frac{A_{\text{образца}}}{A_{\text{контроль}}} \times 100\% \quad (1),$$

где  $A_{\text{образца}}$  — значение оптической плотности клеток, инкубированных с экспериментальными образцами;  $A_{\text{контроль}}$  — значение оптической плотности контрольных клеток, инкубированных только в культуральной среде.

На основе кривых выживаемости определяли концентрацию вещества, при которой наблюдалась гибель 50% клеток (значение IC<sub>50</sub>). Средние значения выживаемости рассчитывались в Excel (Microsoft Corporation, Редмонд, Вашингтон, округ Колумбия, США), а значения IC<sub>50</sub> рассчитывались в OriginPro (версия 2020b, OriginLab Corp., Нортгемптон, Массачусетс, США).

**Анализ синергетического эффекта комбинаций DOX/SAHA, определение индекса синергизма и комбинационного индекса.** Для построения матрицы зависимости доз DOX и SAHA, оценки синергетических взаимодействий DOX/SAHA и чувствительности клеток линий MCF-7, MCF-7/ADR, HCC-1954, SKBR-3 и MDA-MB-231 использовалось программное обеспечение SynergyFinder 2.0 (<http://www.synergyfinder.org/>). На основе значений IC<sub>50</sub> SAHA и DOX, полученных в отношении каждой клеточной линии для каждого соединения (индивидуально), составляли матрицу планирования эксперимента, где значения IC<sub>50</sub> являлись исходными значениями для последующих совместных разведений SAHA и DOX. Так, для клеток MCF-7 матрица (рис. 1) состояла из 8 концентраций DOX (по горизонтали, справа налево: 0,82–0,006 мкМ) и 8 концентраций SAHA (по вертикали, снизу вверх: 3,4–430,0 мкМ); для MCF-7/ADR использовали концентрации DOX в диапазоне 0,55–70,00 мкМ и SAHA — 0,03–3,20 мкМ; для MDA-MB-231 диапазон концентраций DOX составил 0,08–1,00 мкМ, а SAHA — 0,31–40,00 мкМ; для HCC-1954 концентрация DOX была в диапазоне 0,004–0,500 мкМ, а SAHA — 2,9–370,0 мкМ; для SKBR-3 диапазон концентраций DOX был 0,001–0,140 мкМ, а SAHA — 0,04–4,50 мкМ. Далее с помощью МТТ теста оценивали выживаемость клеток в условиях инкубации с 64 комбинациями SAHA и DOX. Рассчитанные значения выживаемости вносили в программу SynergyFinder 2.0, с помощью которой получали матрицы зависимости доз DOX/SAHA (см. рис. 1) и определяли индекс синергизма для 64 комбинаций SAHA/DOX.

Для оценки комбинационного индекса выбранных соотношений SAHA и DOX использовалось программное обеспечение CompuSyn version 1.0 (Biosoft, Сан-Франциско, Калифорния, США), позволяющее с помощью уравнения медианного эффекта определить синергизм совместного действия (модель Чоу–Талалай) DOX и SAHA [25]. Для этого результаты выживаемости опухолевых клеток молочной железы после инкубации с 64 комбинациями SAHA/DOX вно-

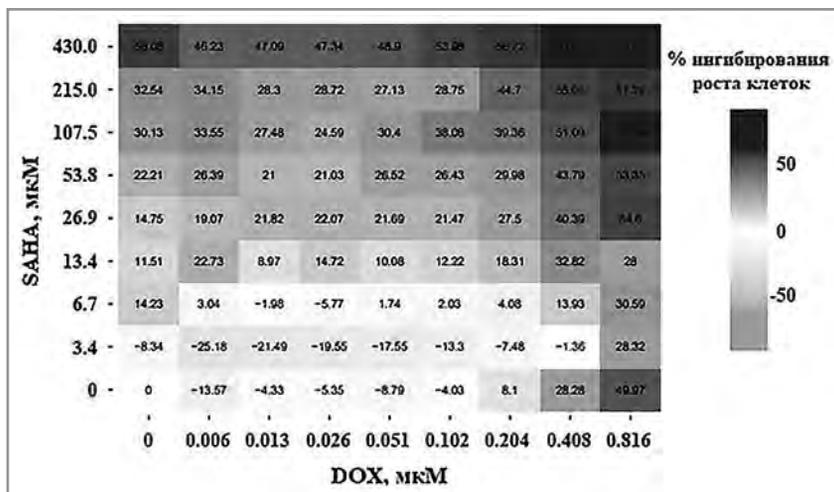
силы в программу CompuSyn version 1.0 и определяли комбинационный индекс для выбранных соотношений.

**Анализ клеточной гибели.** Клетки линии HCC-1954 рассеивали на чашки Петри в количестве  $1 \times 10^5$  в 1,5 мл культуральной среды за 24 ч до эксперимента. DOX, SAHA и их комбинации добавляли к клеткам в концентрации 500 нМ (для DOX) и 15 мкМ (для SAHA) и инкубировали 2 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Затем клетки переносили в пробирки типа эппендорф и центрифугировали в течение 5 мин при 400 g, +4°C и удаляли питательную среду. После чего клетки инкубировали с 10 мкл пропидий йодида в концентрации 20 мкг/мл и 10 мкл аннексина V в концентрации 5 мкг/мл в течение 15 мин. Клетки дважды промывали ФСБ и измеряли их интенсивность флуоресценции на проточном цитофлуориметре Cyan ADP (lex 488 нм, lex 617 нм — для пропидий йодида и lex 525 нм — для аннексина V) [26].

**Статистический анализ.** Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Редмонд, Вашингтон, округ Колумбия, США) и в OriginPro (версия 2020b, OriginLab Corp., Нортгемптон, Массачусетс, США). Значения показателей при  $p < 0,05$  считались статистически значимыми.

## Результаты и обсуждение

Для определения наиболее чувствительной линии опухолевых клеток молочной железы человека для комбинированной терапии препаратами SAHA и DOX в работе были исследованы линии различных подтипов: MCF-7 (люминальный А подтип); MCF-7/ADR (обладающий фенотипом множественной лекарственной устойчивости HER2-позитивный подтип), SKBR-3 и HCC-1954 (HER2-позитивные подтипы); MDA-MB-231 (базально-подобный подтип) (табл. 1) [26–28]. Поскольку механизмы действия SAHA и DOX отличаются, необходимо выявить закономерности влияния препаратов на различные подтипы опухолевых клеток молочной железы и оценить эффективность воздействия комбинаций препаратов на опухолевые клетки. Выполнение поставленных задач позволит определить оптимальное соотношение SAHA/DOX для выбранных



**Рис. 1.** Матрица зависимости доз DOX и SAHA для оценки синергизма в отношении клеток линии MCF-7, построенная с помощью программы SynergyFinder 2.0.

**Примечание.** Принцип построения матриц сохранялся для всех опухолевых клеток молочной железы (за исключением концентраций).

**Fig. 1.** Dose dependence matrix of DOX and SAHA for assessing synergy in relation to MCF-7 cells, constructed using the SynergyFinder 2.0 program.

**Note.** The principle of matrices construction was the same for all breast tumor cells (with the exception of concentrations).

опухолевых клеток молочной железы и вычислить среднюю эффективную комбинацию SAHA и DOX в отношении всех линий (подтипов) опухолевых клеток молочной железы. Такой подход позволит проводить персонализированное лечение при определённом подтипе опухоли молочной железы, с выбором оптимальной комбинации для конкретного случая, а также назначать общее лечение комбинацией препаратов, которая является одинаково эффективной для всех подтипов опухоли молочной железы.

Первый этап работы заключался в определении индивидуальных значений IC<sub>50</sub>, концентраций SAHA и DOX, при которых наблюдалась гибель 50% клеток. Цитотоксическую активность SAHA и DOX по отдельности в отношении вышеуказанных опухолевых линий клеток оценивали с помощью МТТ теста, значения IC<sub>50</sub> приведены в табл. 2.

Значения индивидуальных действующих концентраций IC<sub>50</sub> для SAHA и DOX (см. табл. 2), являлись начальными значениями для составления матрицы зависимости доз между 8 кон-

**Таблица 1.** Классификация подтипов опухолей молочной железы в соответствии с особенностями экспрессии генов [26–28]

**Table 1.** Classification of breast tumor subtypes according to gene expression patterns [26–28]

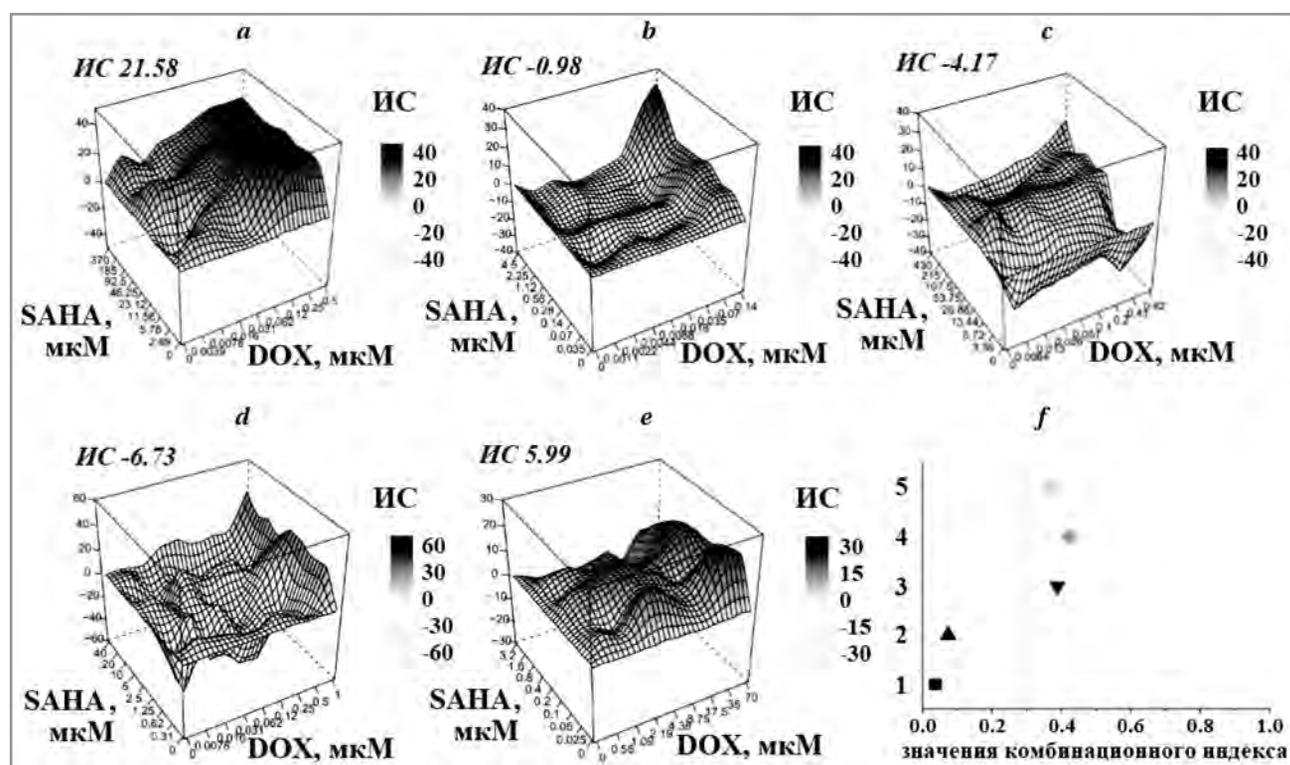
Линия клеток/Статус	Рецептор эстрогена	Рецептор прогестерона	HER2
HCC-1954	—	—	+
MCF-7	+	+	—
MCF-7/ADR	—	—	+
MDA-MB-231	—	—	—
SKBR-3	—	—	+

**Таблица 2. Результаты анализа цитотоксической активности DOX и SAHA (добавленных индивидуально)**  
**Table 2. Results of DOX and SAHA cytotoxic activity analysis (added individually)**

Линия клеток	SAHA	DOX
	IC <sub>50</sub> , мкМ	
HCC-1954	370	0,5
MCF-7	430	0,8
MCF-7/ADR	3,2	70
MDA-MB-231	40	1
SKBR-3	4,5	0,1

центрациями SAHA и 8 концентрациями DOX (см. рис. 1). На основе составленной матрицы проводили эксперимент по определению выживаемости опухолевых клеток молочной железы человека после внесения комбинаций препаратов с помощью МТТ теста.

Полученные значения выживаемости вносили в программу SynergyFinder 2.0 и определяли индексы синергизма (ИС) для 64 вариантов комбинаций SAHA и DOX. Матрицы позволяли оценить степень синергизма препаратов по модели аддитивности Loewe (рис. 2, a–e) [29]. Модель Loewe широко используется для оценки синергизма препаратов и позволяет выявить отсутствие синергетического или антагонистического эффекта между ними [29]. Значения индекса синергизма, ниже –10 указывают на антагонистический эффект между препаратами, значения, находящиеся в диапазоне от –10 до +10, свидетельствуют об аддитивном эффекте взаимодействия, а значения выше +10 характеризуют синергетические взаимодействия между препаратами [31].



**Рис. 2. Трёхмерные плоскости индекса синергизма (ИС), построенные с использованием модели аддитивности Loewe (средние значения ИС для каждой линии клеток указаны слева сверху) и описывающие синергическое и антагонистическое влияние концентраций SAHA и DOX на клетки культур опухолевых линий HCC-1954 (a); SKBR-3 (b); MCF-7 (c); MDA-MB-231 (d) и MCF-7/ADR (e).**

**Примечание.** Точечный график, демонстрирующий значения комбинационного индекса (по оси X: значения показателя больше 1 указывают на небольшой синергизм, 0,7–1,0 – синергизм, 0,3–0,7 – сильный синергизм) для выбранных (на основе математической модели Loewe) комбинаций DOX и SAHA в отношении клеток (по оси Y) HCC-1954 (1), SKBR-3 (2), MCF-7 (3), MDA-MB-231 (4), MCF-7/ADR (5) (e) [30].

**Fig. 2. Three-dimensional synergy index (SI) planes constructed using the Loewe additivity model (average SI values for each cell line are indicated at the top left); the planes describe the synergistic and antagonistic effects of SAHA and DOX concentrations on cells from HCC-1954 (a); SKBR-3 (b); MCF-7 (c); MDA-MB-231 (d) and MCF-7/ADR (e) tumor cell lines.**

**Note.** Scatter plot showing combination index values (X-axis: index values greater than 1 indicate slight synergism, 0.7–1.0 — synergism, 0.3–0.7 — strong synergism) for selected (based on Loewe additivity model) combinations of DOX and SAHA on cells (Y-axis) HCC-1954 (1), SKBR-3 (2), MCF-7 (3), MDA-MB-231 (4), MCF-7/ADR (5) (e) [30].

Построенные на основе дозозависимых матриц графические трёхмерные диаграммы Loewe (см. рис. 2) указывают на выраженное синергетическое действие широкого диапазона комбинаций SAHA и DOX в отношении клеток HCC-1954 (см. рис. 2, *a*) и аддитивный эффект в отношении линий SKBR-3 и MCF-7/ADR (см. рис. 2, *b* и *e* — тёмные, выпуклые области в диаграммах), в то время как шероховатая поверхность диаграмм на рис. 2, *c* и *d* свидетельствует о слабом синергизме и преимущественном аддитивном эффекте SAHA и DOX в отношении клеток линий MCF-7 и MDA-MB-231 [31].

На основе данных литературы известно, что SAHA снижает жизнеспособность HER2-позитивных опухолевых клеток и часто используется в комбинации с противоопухолевыми препаратами для повышения чувствительности клеток к химиотерапии [33]. Поскольку клетки линии HCC-1954, SKBR-3 и MCF-7/ADR относятся к HER2-позитивному подтипу (см. табл. 1), можно предположить, что синергизм комбинации SAHA/DOX достигается за счёт того, что SAHA ингибирует сигнальный путь Akt/NF- $\kappa$ B в клетках, что приводит к снижению клеточной пролиферации и повышению их чувствительности к DOX [27, 34, 35]. Стоит отметить, что механизм, при котором SAHA повышает чувствительность резистентных опухолевых клеток к DOX не изучен полностью, но существуют данные о том, что SAHA снижает экспрессию антиапоптотических белков BCL-2 и BCL-XL и способствует активации апоптоза наряду с воздействием DOX. Такой механизм синергетического действия SAHA/DOX также может являться одной из причин чувствительности клеток линии MCF-7/ADR к комбинации SAHA/DOX [36]. Также в источниках литературы отмечено, что SAHA может образовывать активные формы кислорода, которые способствуют преодолению устойчивости опухолевых клеток к DOX [37].

Таким образом, исходя из результатов построенной математической модели синергизма

Loewe (см. рис. 2, *a–e*) можно сделать вывод о синергетическом эффекте комбинации SAHA и DOX в отношении HER2-положительного подтипа опухолевых клеток молочной железы. Корреляция между показателями синергизма и подтипами клеток свидетельствует о перспективности данного подхода в определении мишеней для эффективной терапии.

Далее на основе модели Loewe и рассчитанных значений ИС для каждой из 64 комбинаций SAHA/DOX в отношении всех исследуемых опухолевых линий клеток были выбраны самые высокие показатели ИС для каждой линии и отмечены соотношения SAHA/DOX, при которых они были получены (табл. 3).

Из отмеченных концентраций SAHA и DOX было выбрано одно соотношение SAHA/DOX для каждой линии клеток молочной железы (см. табл. 3, выделено шрифтом). На основе выбранных соотношений SAHA/DOX определяли комбинационный индекс в программе CompuSyn version 1.0, по аналогии с программным обеспечением SynergyFinder 2.0 (см. рис. 2, *f*). С помощью данного метода также было доказано, что выбранные соотношения SAHA/DOX (см. табл. 3) обладали значительным синергизмом в отношении HER2-положительных клеток линий HCC-1954 и SKBR-3, что коррелирует с результатами полученных моделей синергизма (см. рис. 2, *a*, *b*, *f*). Предполагается, что более низкие значения синергизма комбинации в отношении клеток линии MCF-7/ADR по сравнению с SKBR-3 связаны с разницей в оптимальных соотношениях SAHA и DOX (для MCF-7/ADR требуется большая концентрация DOX, чем для остальных линий клеток).

После подтверждения синергетического эффекта выбранных соотношений SAHA/DOX, было рассчитано среднее соотношение SAHA и DOX (30:1, соответственно), которое, как предполагается, будет обладать значительным синергизмом в отношении всех подтипов опухоли молочной железы.

**Таблица 3.** Максимальные значения ИС и соотношения SAHA/DOX, при которых они были получены с помощью модели Loewe, в отношении линий опухолевых клеток молочной железы

**Table 3.** Maximum SI values and SAHA/DOX ratios at which they were obtained using the Loewe model for breast tumor cell lines

Линия клеток	DOX, мкМ	SAHA, мкМ	ИС
HCC-1954	0,50	370,00	31,45
	<b>0,50</b>	<b>23,12</b>	31,82
SKBR-3	<b>0,14</b>	<b>4,50</b>	32,73
MCF-7	0,41	107,50	6,91
	<b>0,82</b>	<b>26,88</b>	3,15
	<b>1,00</b>	<b>40,00</b>	35,01
MDA-MB-231	<b>35,00</b>	<b>3,20</b>	3,46
MCF-7/ADR	2,19	0,20	8,47
	<b>35,00</b>	<b>0,10</b>	7,50

**Примечание.** Полуужирный шрифт — объяснения в тексте.

**Note.** Bold font — explanations in the article.

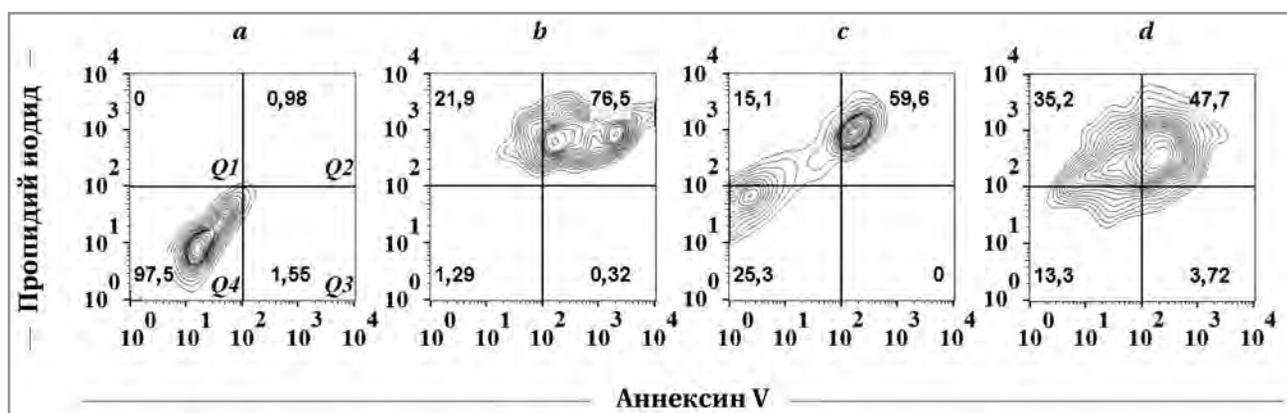


Рис. 3. Уровень апоптоза в клетках HCC-1954 после инкубации с 15 мкМ SAHA (b), 500 нМ DOX (c) и комбинацией SAHA/DOX (30:1, концентрации 15 мкМ для SAHA и 500 нМ для DOX) (d) в течении 48 ч. Клетки, без добавления препаратов (a).

Fig. 3. Level of apoptosis in HCC-1954 cells after incubation with 15 μM SAHA (b), 500 nM DOX (c) and a combination of SAHA/DOX (30:1, 15 μM concentration for SAHA and 500 nM for DOX) (d) within 48 hours. Cells without adding the medications (a).

Оптимальное соотношение SAHA и DOX (30:1) для терапии всех исследуемых линий опухолевых клеток молочной железы далее было использовано для изучения типа гибели клеток методом двойного окрашивания аннексином V и пропидий йодидом (рис. 3). В процессе апоптоза изменяется состав маркеров мембраны клеток. Одним из таких маркеров является фосфатидилсерин, с которым связывается аннексин в присутствии ионов кальция. Пропидий йодид является маркером некроза и попадает в мёртвые клетки вследствие изменения проницаемости мембраны. Пропидий йодид не способен окрашивать живые клетки и клетки в состоянии раннего апоптоза из-за наличия неповреждённой плазматической мембраны [38]. Для данного эксперимента были выбраны опухолевые клетки линии HCC-1954.

Как показано на рис. 3, клетки линии HCC-1954, обработанные SAHA/DOX, находятся в четырёх квадрантах (Q1, Q2, Q3 и Q4). Квадрант Q1 свидетельствует об окрашенных пропидий йодидом клетках, находящихся в состоянии некроза. К квадранту Q2 относятся клетки, находящиеся на стадии позднего апоптоза и окрашиваются как аннексином V, так и пропидий йодидом. В квадранте Q3 клетки окрашиваются только аннексином V и находятся в стадии раннего апоптоза. Неокрашенные клетки являются живыми и относятся к квадранту Q4 [38]. Показано, что SAHA и DOX по отдельности способны стимулировать гибель клеток посредством апоптоза (76,5% и 59,6% клеток находились в стадии позднего апоптоза, соответственно, квадрант Q2) (см. рис. 3, b, c). Комбинация SAHA/DOX в меньшей степени демонстрировала индукцию апоптоза в клетках (47,7%, квадрант Q2, рис. 3, d) по сравнению с препаратами по отдельности, однако индуцировала в большей степени некроз (35,2%, квадрант Q1),

по сравнению с SAHA (21,9%, квадрант Q1) и DOX (15,1%, квадрант Q1), что свидетельствует о синергизме действия разработанного соотношения препаратов, а также изменении типа программируемой гибели клеток при использовании комбинации SAHA/DOX. Для лучшей интерпретации полученных результатов требуется дальнейшее исследование механизмов клеточной гибели, вызываемых SAHA, DOX и их комбинацией.

## Заключение

Использование комбинаций препаратов для лечения опухолевых заболеваний позволяет снизить дозы вводимых препаратов, уменьшить побочные эффекты и преодолеть лекарственную устойчивость опухолевых клеток. Применение модели Loewe и метода Чоу–Талалай может упростить поиск оптимальных соотношений веществ для исследований комбинаций различных препаратов *in vitro* и *in vivo*, использовать их для дальнейшей разработки новых носителей в качестве систем доставки или совместной инкапсуляции препаратов в микро- и наночастицы, а также для создания новых протоколов лечения опухолевых заболеваний. Расчёт индекса синергизма с помощью математической модели Loewe выявил синергетический эффект комбинаций SAHA и DOX в отношении HER2-положительного подтипа опухолевых линий клеток: HCC-1954, MCF-7/ADR и SKBR-3, а также аддитивный эффект в отношении линий MCF-7 и MDA-MB-231. На основе ИС были выбраны соотношения SAHA/DOX для каждого типа опухолевых клеток молочной железы, подтверждён их синергетический эффект с помощью метода Чоу–Талалай и рассчитано среднее оптимальное соотношение комбинации

SAHA/DOX. Полученная оптимальная комбинация SAHA/DOX (30:1) продемонстрировала высокую способность к активации программируемой гибели клеток линии HCC-1954. Таким образом, разработанная комбинация SAHA/DOX представляется перспективной схемой для лечения опухолей молочной железы, однако для подтверждения результатов *in vitro* необходимы дальнейшие исследования *in vivo*.

### Дополнительная информация

**Финансирование.** Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-25-00293, <https://rscf.ru/project/22-25-00293/>

### Литература/References

1. Морозов Д. А., Колядина И. В., Поддубная И. В. и др. Клинико-морфологические аспекты эффективности неoadъювантной химиотерапии у больных с агрессивным люминальным HER2-отрицательным раком молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы 2021;17(4):38–47. doi: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2021-17-4-38-47>. [Morozov D.A., Kolyadina I.V., Poddubnaya I.V., Ganshina I.P., Khokhlova S.V., Kometova V.V., Rodionov V.V. Clinical and morphological aspects of neoadjuvant chemotherapy efficacy in patients with aggressive luminal HER2-negative breast cancer. Tumors of the Female Reproductive System. 2021; 17 (4): 38–47. doi: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2021-17-4-38-47>. (in Russian)]
2. tass.ru [интернет]. Информационное агентство ТАСС [доступ от 15.10.2021]. Доступ по ссылке <https://n.tass.ru/obschestvo/12676163> [tass.ru [internet]. Informationsnoe agentstvo TASS [dostup ot 15.10.2021]. Dostup po ssylke <https://n.tass.ru/obschestvo/12676163>]
3. Fisusi EA, Akala E.O. Drug combinations in breast cancer therapy. Pharma Nanotechnol. 2019; 7 (1): 3–23. doi: 10.2174/2211738507666190122111224.
4. Dai X., Cheng H., Bai Z., Li J. Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. J Cancer. 2017; 8 (16): 3131. doi: 10.7150/jca.18457.
5. Wawruszak A., Borkiewicz L., Okon E., Kukula-Koch W., Afshan S., Halasa M. Vorinostat (SAHA) and breast cancer: an overview. Cancers. 2021; 13 (18): 4700. doi: 10.3390/cancers13184700.
6. Humphrey R.M., Brockway-Lunardi L.M., Bonk D.T., Dohoney K.M., Dorshow J.H., Meech S.J. et al. Opportunities and challenges in the development of experimental drug combinations for cancer. J Natl Cancer Inst. 2011; 103 (16): 1222–1226. doi: 10.1093/jnci/djr246.
7. Долгова Д.Р., Генинг Т.П., Абакумова Т.В., Генинг С.О., Антонева И.И., Песков А.Б., Федотова А.Ю. Маркеры первичной химиорезистентности эпителиальных клеток асцита у больных раком яичников. Антибиотики и химиотер. 2019; 64 (5–6): 18–21. doi: <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-10026>. [Dolgova D.R., Gening T.P., Abakumova T.V., Gening S.O., Antoneeva I.I., Pescov A.B., Fedotova A.Yu. Markers of primary chemoresistance of epithelial ascites cells in patients with ovarian cancer. Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy. 2019; 64 (5–6): 18–21. (In Russ.) <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-100026>. (in Russian)]
8. Pellosi D.S., Paula L.B., de Melo M.T., Tedesco A.C. Targeted and synergic glioblastoma treatment: multifunctional nanoparticles delivering verpofrin as adjuvant therapy for temozolomide chemotherapy. Mol Pharm. 2019; 16 (3): 1009–1024. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b01001.
9. Куделькина В.В., Халанский А.С., Алексеева А.И., Гореликов П.Л., Косырева А.М. Комбинация наносомальной формы доxorubicина, интерферона альфа и нитроглицерина в терапии крыс Вистар с глиобластомой 101.8. Антибиотики и химиотер. 2021; 66 (9–10): 17–23. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2021-66-9-10-17-23>. [Kudelkina V.V., Khalansky A.S., Alekseeva A.I., Gorelikov P.L., Kosyreva A.M. Combination of nanosomal form of doxorubicin, interferon alpha, and nitroglycerin in the treatment of 101.8 glioblastoma in Wistar rats. Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy. 2021; 66 (9–10): 17–23. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2021-66-9-10-17-23>]
10. Лебедев В.В., Новиков С.А., Рыбалкина Е.Ю., Заботина Т.Н. Гидрофильные регуляторы гексапептиды — ингибиторы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Антибиотики и химиотер. 2010; 55 (1–2): 3–5. [Lebedev V.V., Novikov S.A., Rybalkina

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

**Участие авторов.** Моллаева М. Р. — анализ и интерпретация результатов, написание текста; Яббаров Н. Г. — постановка проблемы, написание и редактирование текста; Сокол М. Б. — выполнение методик, интерпретация результатов; Чиркина М. В. — выполнение методик, анализ результатов; Никольская Е. Д. — постановка проблемы, написание, редактирование и финальное утверждение текста.

- E.Y., Zabolina T.N. Hydrophilic Regulator Hexapeptides as Inhibitors of Tumor Cell Multiple Drug Resistance. Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy. 2010; 55 (1–2): 3–5. (in Russian)]
11. Никольская Е.Д., Фаустова М.Р., Моллаев М.Д., Жунина О.А., Сокол М.Б., Яббаров Н.Г. и др. Разработка полимерной системы доставки даунорубина в опухолевые клетки для преодоления лекарственной устойчивости. Известия Академии наук. Серия химическая. 2018; 4: 747–756. doi: <https://doi.org/10.1007/s11172-018-2132-5>. [Nikolskaya E.D., Faustova M.R., Mollaev M.D., Zhunina O.A., Sokol M.B., Yabbarov N.G. et al. Development of a polymer system for the delivery of daunorubicin to tumor cells to overcome drug resistance. Russian Chemical Bulletin. 2018; 67: 747–756. doi: <https://doi.org/10.1007/s11172-018-2132-5>. (in Russian)]
12. Congras A., Caillet N., Torossian N., Quelen C., Daugrois C., Brousset P. et al. Doxorubicin-induced loss of DNA topoisomerase II and DNMT1-dependent suppression of MiR-125b induces chemoresistance in ALK-positive cells. Oncotarget. 2018; 9 (18): 14539. doi: 10.18632/oncotarget.24465.
13. El-Gowily A.H., Loutfy S.A., Ali E.M., Mohamed T.M., Mansour M.A. Tioconazole and chloroquine act synergistically to combat doxorubicin-induced toxicity via inactivation of PI3K/AKT/mTOR signaling mediated ROS-dependent apoptosis and autophagic flux inhibition in MCF-7 breast cancer cells. Pharmaceuticals. 2021; 14 (3): 254. doi: 10.3390/ph14030254.
14. Guo C., Wang Q., Zhang X., Lu F., Sun M., Zeng P. et al. Gelated Vorinostat with inner-lysosome triggered release for tumor-targeting chemotherapy. Colloids Surf B: Biointerfaces. 2020; 194: 111144. doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111144.
15. Miyamoto K., Watanabe M., Boku S., Sukeno M., Morita M., Kondo H. et al. xCT inhibition increases sensitivity to vorinostat in a ROS-dependent manner. Cancers. 2020; 12 (4): 827. doi: 10.3390/cancers12040827.
16. Leone A., Roca M.S., Ciardiello C., Terranova-Barberio M., Vitagliano C., Ciliberto G. et al. Vorinostat synergizes with EGFR inhibitors in NSCLC cells by increasing ROS via up-regulation of the major mitochondrial porin VDAC1 and modulation of the c-Myc-NRF2-KEAP1 pathway. Free Radic Biol Med. 2015; 89: 287–299. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.155.
17. Shim G.S., Manandhar S., Shin D.H., Kim T.H., Kwak M.K. Acquisition of doxorubicin resistance in ovarian carcinoma cells accompanies activation of the NRF2 pathway. Free Radic Biol Med. 2009; 47 (11): 1619–1631. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.006.
18. Lee S.J., Hwang S.O., Noh E.J., Kim D.U., Nam M., Kim J.H. et al. Trans-activation of bad by vorinostat-induced acetylated p53 enhances doxorubicin-induced cytotoxicity in cervical cancer cells. Exp Mol Med. 2014; 46 (2): e76–e76. doi: 10.1038/emm.2013.149.
19. Zheng X., Naiditch J., Czurylo M., Jie C., Lautz T., Clark S. et al. Differential effect of long-term drug selection with doxorubicin and vorinostat on neuroblastoma cells with cancer stem cell characteristics. Cell Death Dis. 2013; 4 (7): e740–e740. doi: 10.1038/cddis.2013.264.
20. Lautz T.B., Jie C., Clark S., Naiditch J.A., Jafari N., Qiu, Y.Y. et al. The effect of vorinostat on the development of resistance to doxorubicin in neuroblastoma. PLoS One. 2012; 7 (7): e40816. doi: 10.1371/journal.pone.0040816.
21. Pettke A., Hotfilder M., Clemens D., Klco-Brosius S., Schaefer C., Potratz J., Dirksen U. Suberanilohydroxamic acid (vorinostat) synergistically enhances the cytotoxicity of doxorubicin and cisplatin in osteosarcoma cell lines. Anticancer Drugs. 2016; 27 (10): 1001–1010. doi: 10.1097/CAD.0000000000000418.

22. *Patra S., Praharaj P.P., Klionsky D.J., Bhutia S.K.* Vorinostat in autophagic cell death: a critical insight into autophagy-mediated, -associated and -dependent cell death for cancer prevention. *Drug Discov Today*. 2022; 27 (1): 269–279. doi: 10.1016/j.drudis.2021.08.004.
23. *Mollaeva M.R., Yabbarov N., Sokol M., Chirkina M., Mollaev M.D., Zabolotskii A., et al.* Optimization, Characterization and Pharmacokinetic Study of Meso-Tetraphenylporphyrin Metal Complex-Loaded PLGA Nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (22): 12261. doi: 10.3390/ijms222212261.
24. *Zheng S., Wang W., Aldahdooh J., Malyutina A., Shadbahr T., Tanoli Z. et al.* SynergyFinder Plus: Toward Better Interpretation and Annotation of Drug Combination Screening Datasets. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2022; 20 (3): 587–596. doi: 10.1016/j.gpb.2022.01.004.
25. *Pawar A.* Classification of breast cancer cell lines into subtypes based on genetic profiles (dissertation). School of Informatics: Indiana University; 2015. Available from: <https://scholarworks.iupui.edu/handle/1805/7912>
26. *Jin Y., Zhang W., Wang H., Zhang Z., Chu C., Liu X., Zou Q.* EGFR/HER2 inhibitors effectively reduce the malignant potential of MDR breast cancer evoked by P-gp substrates *in vitro* and *in vivo*. *Oncology Reports*. 2016; 35 (2): 771–778. doi: 10.3892/or.2015.4444.
27. *Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D.* Analysis of cell viability by the alamarblue assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018; 2018 (6): pdb-prot095489. doi: 10.1101/pdb.prot095489.
28. synergyfinder.org [internet]. SynergyFinder — User Documentation [cited 2022 August 7]. Available from: [https://synergyfinder.fimm.fi/synergy/synfin\\_docs/](https://synergyfinder.fimm.fi/synergy/synfin_docs/).
29. *Yadav B., Wennerberg K., Aittokallio T., Tang J.* Searching for drug synergy in complex dose–response landscapes using an interaction potency model. *Comput Struct Biotechnol J*. 2015; 13: 504–513. doi: 10.1016/j.csbj.2015.09.001.
30. *Miladiyah I., Yuanita E., Nuryadi S., Jumina J., Haryana S.M., Mustofa M.* Synergistic effect of 1, 3, 6-trihydroxy-4, 5, 7-trichloroxanthone in combination with doxorubicin on b-cell lymphoma cells and its mechanism of action through molecular docking. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2020; 92: 100576. doi: 10.1016/j.curtheres.2020.100576.
31. *Alsherbiny M.A., Bhuyan D.J., Low M.N., Chang D., Li C.G.* Synergistic interactions of cannabidiol with chemotherapeutic drugs in mcf7 cells: Mode of interaction and proteomics analysis of mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (18): 10103. doi: 10.3390/ijms221810103.
32. *He L., Kuleskiy E., Saarela J., Turunen L., Wennerberg K., Aittokallio T., Tang J.* Cancer systems biology. New York: Humana press; 2018; 351–398. doi: 10.1007/978-1-4939-7493-1\_17.
33. *Ramaswamy B., Sparano J.A.* Targeting epigenetic modifications for the treatment and prevention of breast cancer. *Curr Breast Cancer Rep*. 2010; 2 (4): 198–207. doi: <https://doi.org/10.1007/s12609-010-0027-z>.
34. *Lai C.J., Bao R., Tao X.U., Wang J., Atayan R., Qu H. et al.* CUDC-101, a multitargeted inhibitor of histone deacetylase, epidermal growth factor receptor, and human epidermal growth factor receptor 2, exerts potent anticancer activity. *Cancer Res*. 2010; 70 (9): 3647–3656. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3360.
35. *Jenie R.I., Handayani S., Susidarti R.A., Udin L.Z., Meiyanto E.* The cytotoxic and antimigratory activity of Brazilin-doxorubicin on MCF-7/HER2 cells. *Ad Pharm Bull*. 2018; 8 (3): 507. doi: 10.15171/apb.2018.059.
36. *Tang F., Choy E., Tu C., Hornicek F., Duan Z.* Therapeutic applications of histone deacetylase inhibitors in sarcoma. *Cancer Treat Rev*. 2017; 59: 33–45. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.06.006.
37. *Sampson E.R., Amin V., Schwarz E.M., O'Keefe R.J., Rosier R.N.* The histone deacetylase inhibitor vorinostat selectively sensitizes fibrosarcoma cells to chemotherapy. *J Orthop Res*. 2011; 29 (4): 623–632. doi: 10.1002/jor.21274.
38. *Malik M.A., Lone S.A., Wani M.Y., Talukdar M.I.A., Dar O.A., Ahmad A., Hashmi A.A.* S-benzylidithiocarbamate imine coordinated metal complexes kill *Candida albicans* by causing cellular apoptosis and necrosis. *Bioorg Chem*. 2020; 98: 103771. doi: 10.1016/j.bioorg.2020.103771.

## Информация об авторах

*Моллаева Мария Романовна* — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН», Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-9999-4652. eLIBRARY SPIN-код: 9579-4687. Scopus Author ID: 57201648257.

*Яббаров Никита Григорьевич* — к. б. н., старший научный сотрудник ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН», Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-3361-9136. eLIBRARY SPIN-код: 7024-9726. Scopus Author ID: 50462552500.

*Сокол Мария Борисовна* — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН», Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-1976-1972. eLIBRARY SPIN-код: 5916-1653. Scopus Author ID: 57195755669.

*Чиркина Маргарита Викторовна* — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН», Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-6061-4803. eLIBRARY SPIN-код: 4428-7810. Scopus Author ID: 57196439676.

*Никольская Елена Дмитриевна* — к. х. н., старший научный сотрудник ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН», Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-1931-3117. eLIBRARY SPIN-код: 8108-6572. Scopus Author ID: 57189605012.

## About the authors

*Mariia R. Mollaeva* — junior researcher at the Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences (IBCP RAS), Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-9999-4652. eLIBRARY SPIN code: 9579-4687. Scopus Author ID: 57201648257.

*Nikita G. Yabbarov* — Ph. D. in Biology, senior researcher at the Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences (IBCP RAS), Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0003-3361-9136. eLIBRARY SPIN code: 7024-9726. Scopus Author ID: 50462552500.

*Mariya B. Sokol* — junior researcher at the Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences (IBCP RAS), Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-1976-1972. eLIBRARY SPIN code: 5916-1653. Scopus Author ID: 57195755669.

*Margarita V. Chirkina* — junior researcher at the Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences (IBCP RAS), Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-6061-4803. eLIBRARY SPIN: 4428-7810. Scopus Author ID: 57196439676.

*Elena D. Nikolskaya* — Ph. D. in Chemistry, senior researcher at the Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences (IBCP RAS), Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-1931-3117. eLIBRARY SPIN code: 8108-6572. Scopus Author ID: 57189605012.