

УДК 57.021,576.08

9-ING-41, НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЙ ИНГИБИТОР GSK-3 β , ПОДАВЛЯЕТ РОСТ ОПУХОЛЕВЫХ ОРГАНОИДОВ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2023 г. С. В. Никулин^{1, 2, *}, А. А. Полозников^{1, 2}, Б. Я. Алексеев²

¹Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, 101000 Россия

²ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр радиологии”

Министерства здравоохранения России, Обнинск, 249036 Россия

*e-mail: snikulin@hse.ru

Поступила в редакцию 17.11.2022 г.

После доработки 28.11.2022 г.

Принята к публикации 05.12.2022 г.

На сегодняшний день рак молочной железы (РМЖ) является основной причиной смерти женщин от онкологических заболеваний. Несмотря на достигнутый в последние годы значительный прогресс в лечении РМЖ, высокая смертность свидетельствует об актуальности разработки новых подходов к терапии. Ранее показано, что киназу-3 β гликогенсинтазы (GSK-3 β) можно рассматривать в качестве перспективной мишени для лечения РМЖ. В представленной работе описано получение новой культуры опухолевых органоидов молочной железы и проанализирована активность низкомолекулярного ингибитора GSK-3 β – 9-ING-41 – как при монотерапии, так и в комбинации со стандартными химиотерапевтическими препаратами, применяющимися для лечения РМЖ. Полученные результаты подтвердили то, что 9-ING-41 обладает противоопухолевой активностью. Более того, показано, что 9-ING-41 также значительно усиливает действие химиотерапевтических препаратов доксорубицина и гемцитабина. Таким образом, 9-ING-41 следует считать перспективным кандидатом для дальнейшего изучения в доклинических и клинических исследованиях терапии РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, опухолевые органоиды, GSK-3 β , 9-ING-41

DOI: 10.56304/S0234275823010088

На сегодняшний день рак молочной железы (РМЖ) относится к самым распространенным злокачественным новообразованиям у женщин. Ежегодно в мире выявляют более 2 млн новых случаев заболевания данной патологией, при этом на Россию приходится более 68 тыс. случаев [1, 2]. РМЖ также лидирует в качестве причины смерти женщин от онкологических заболеваний: более 600 тыс. умирает ежегодно [1], из них на Россию приходится более 22 тыс. случаев [2]. Несмотря на достигнутый в последние годы значительный прогресс в лечении РМЖ, высокая смертность свидетельствует об актуальности разработки новых подходов к терапии.

Киназа-3 β гликогенсинтазы (GSK-3 β) – одна из новых мишеней для лечения различных злокачественных новообразований, так как принимает участие в регуляции различных патологических процессов [3]. В частности GSK-3 β регулирует активность таких сигнальных путей, как Wnt, Hedgehog, Notch и TGF- β [4]. Канонической функцией GSK-3 β считается фосфорилирование

β -катенина (ключевого эффектора сигнального пути Wnt) с последующим убиквитинированием и протеасомной деградацией [5]. Деградация β -катенина предотвращает его транслокацию в ядро и активацию генов, отвечающих за пролиферацию клеток [5]. Таким образом, традиционно GSK3B рассматривали как противоопухолевый ген. Однако оказалось, что активность GSK-3 β необходима для роста некоторых опухолей, а ее ингибирование может приводить к снижению пролиферации и гибели опухолевых клеток [6–8]. Механизмы, лежащие в основе этого явления, на данный момент изучены не полностью. Одним из возможных вариантов считается влияние GSK-3 β на активность сигнального пути NF- κ B [7]. Уже показано, что ингибирование киназы GSK-3 β приводит к снижению ее содержания в ядре и, как следствие, к подавлению транскрипционной активности NF- κ B и снижению экспрессии таких антиапоптотических белков, как XIAP и Bcl-2 [7].

Перспективным экспериментальным подходом для определения наиболее эффективных вариантов терапии считается проведение тестирования на различных клеточных моделях, полученных из опухоли пациента. Одна из наиболее

Список сокращений: РМЖ – рак молочной железы.

современных *in vitro* моделей опухолей – опухолевые органоиды [9]. По сравнению с обычными клеточными линиями опухолевые органоиды лучше сохраняют генетическую гетерогенность и воспроизводят структуру опухолевой ткани [10, 11]. Более того, вероятность успешного получения культуры опухолевых органоидов значительно выше, чем для обычных двумерных культур [12]. С другой стороны, по сравнению с животными ксенографтными моделями, опухолевые органоиды значительно дешевле и менее трудозатратны [10, 11]. На сегодняшний день уже есть данные, на основании которых можно утверждать, что *in vitro* тесты на опухолевых органоидах позволяют предсказать клинический ответ на терапию [13, 14].

В этой работе мы представили протокол получения новой культуры опухолевых органоидов молочной железы и использовали ее для анализа проходящего клинические испытания низкомолекулярного ингибитора GSK-3 β – 9-ING-41 – как в виде монотерапии, так и в комбинации со стандартными химиотерапевтическими препаратами, применяющимися для лечения РМЖ.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Реагенты

В работе использованы следующие материалы: 24- и 96-луночные планшеты (TPP, Швейцария); среда для хранения живой ткани MACS tissue storage solution (Miltenyi Biotec, Германия); культуральная среда Advanced DMEM/F12, добавка GlutaMax, добавка Antibiotic-Antimycotic, раствор HEPES, добавка B27, рекомбинантный человеческий EGF, раствор TgypLE (Gibco, США); N-ацетилцистеин, никотинамид, β -эстрадиол, доксорубин, доцетаксел, гемцитабин (Sigma, США); рекомбинантный человеческий Wnt3A (R&D Systems, США); рекомбинантные человеческие белки R-spondin 1, Noggin, Heregulin β -1, FGF7, FGF10 (PeproTech, США); A83-01, Y-27632 (STEMCELL Technologies, Канада); SB202190 (Tocris, США); фосфатно-солевой буфер Dulbecco (“ПанЭко”, Россия); внеклеточный матрикс Matrigel Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix (Corning, США); MTS (Promega, США); препарат 9-ING-41 (4-(5-метил-5H-[1,3]диоксо[4,5-f]индол-7-ил)-3-(5-фтор-1-бензофуран-3-ил)-1H-пиррол-2,5-дион) был любезно предоставлен Ириной Николаевной Гайсиной (Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, University of Illinois in Chicago, США) [15]; Histogel (Thermo Fisher Scientific, США).

Получение и культивирование опухолевых органоидов молочной железы

Исходная опухолевая ткань была получена от пациентки с инвазивной протоковой аденокар-

циномой РМЖ стадии IIA (T2N0M0G3). Опухоль была положительной по экспрессии рецепторов к эстрогену (ER+) и прогестерону (PR+) и не экспрессировала рецептор HER2 (HER2–). Молекулярный подтип опухоли – люминальный В. Фрагменты опухолевой ткани помещали в среду для хранения живой ткани MACS tissue storage solution и хранили при 4°C до дальнейшей обработки. Ткань диссоциировали при помощи диссоциатора gentleMACS Octo Dissociator (Miltenyi Biotec), согласно рекомендациям производителя. Полученную суспензию клеток промывали и смешивали с внеклеточным матриксом Matrigel, после чего капли объемом 50 мкл переносили в лунки 24-луночного культурального планшета и помещали в клеточный инкубатор (37°C, 5% CO₂) на 20 мин для застывания геля. В каждую лунку добавляли по 750 мкл полной питательной среды и инкубировали планшеты в клеточном инкубаторе в тех же условиях. Более подробная процедура получения опухолевых органоидов описана ранее [16].

Для культивирования клеток РМЖ использовали полную питательную среду, состоящую из базовой среды Advanced DMEM/F-12 с добавлением 1% Antibiotic-Antimycotic, 1% HEPES, 1% GlutaMax, 2% B27, 1.25 мМ N-ацетилцистеина, 5 мМ никотинамида, 25 нг/мл Wnt3A, 250 нг/мл R-spondin 1, 100 нг/мл Noggin, 25 нг/мл Heregulin β -1, 50 нг/мл EGF, 5 нг/мл FGF7, 20 нг/мл FGF10, 10 нМ β -эстрадиола, 500 нМ A83-01, 5 мкМ Y-27632, 500 нМ SB202190. За основу был взят ранее опубликованный состав среды для культивирования опухолевых органоидов молочной железы [17].

Питательную среду меняли каждые 48 ч. Визуальную оценку состояния клеток проводили при помощи инвертированного микроскопа Primo Vert (Carl Zeiss, Германия). Органоиды субкультивировали каждые 2 недели при помощи диссоциирующего раствора TgypLE Express.

Гистологический анализ

Фрагменты исходной опухолевой ткани зафиксировали в 10%-ном нейтральном формалине и заключали в парафиновые блоки. Зафиксированные формалином опухолевые органоиды покрывали гелем Histogel и также заключали в парафиновые блоки. Последовательные срезы толщиной 4 мкм на предметном стекле окрашивали по стандартному протоколу гематоксилином–эозином и анализировали на световом микроскопе (Carl Zeiss).

Анализ противопухоловой активности лекарственных препаратов

Органоиды разводили во внеклеточном матриксе Matrigel и рассевали в 96-луночный планшет. Через 24 ч питательную среду заменяли на содержащую как чистые химиотерапевтические

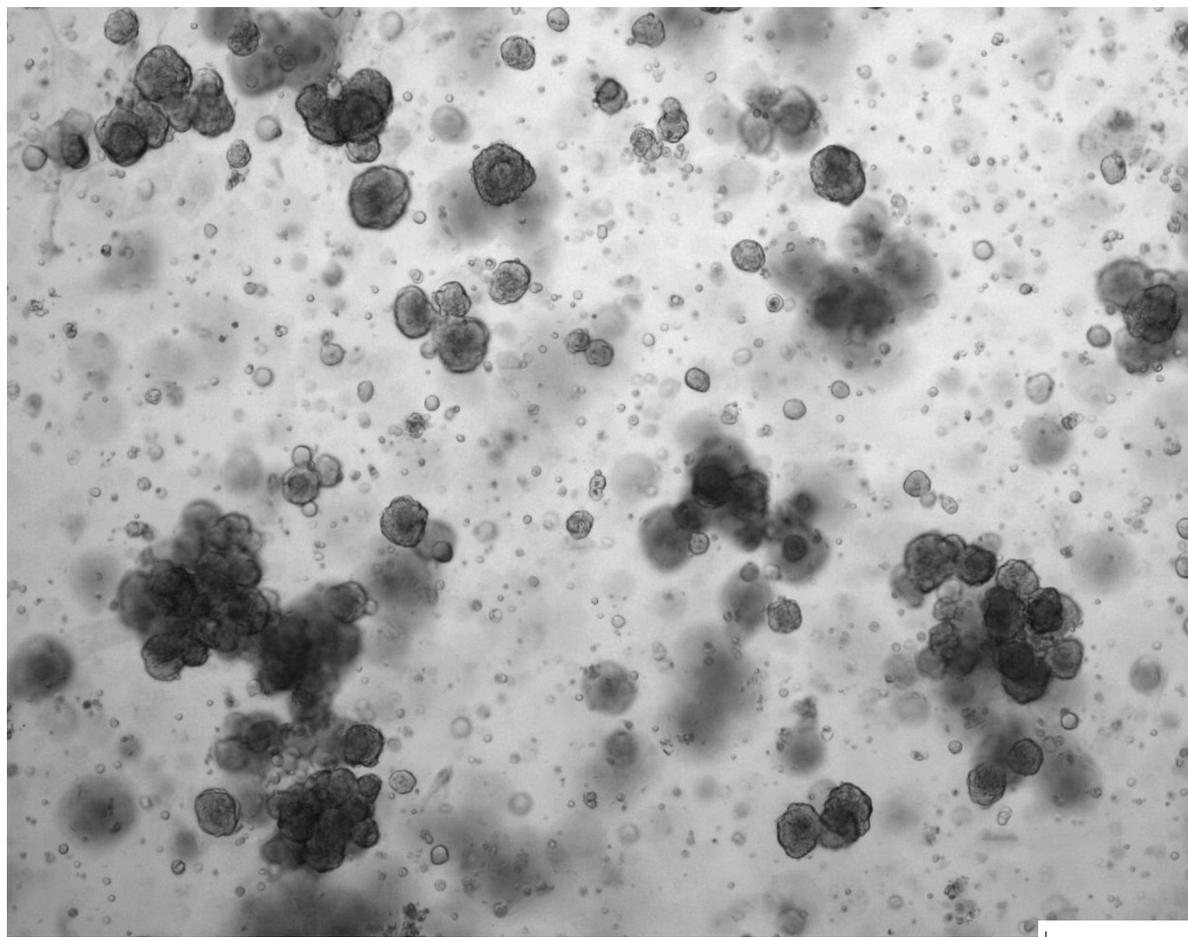


Рис. 1. Микрофотография культуры полученных опухолевых органоидов РМЖ (третий пассаж, седьмые сутки). Длина масштабного отрезка – 200 мкм.

Fig. 1. Photo of the culture of the generated tumor organoids of breast cancer (the 3rd passage, day 7). The length of the scalebar is 200 μ m.

препараты, так и их комбинации с 9-ING-41. Клинически достижимые концентрации использовали для оценки действия препаратов: 1 мкМ для гемцитабина, 100 нМ для доксорубина и доцетаксела, 2 мкМ для 9-ING-41 [18–20].

Органоиды инкубировали с препаратами 3 ч в клеточном инкубаторе (37°C, 5% CO₂) и заменяли среду, содержащую препараты, на свежую питательную среду. Планшеты помещали в клеточный инкубатор (37°C, 5% CO₂) на 7 суток. Относительное количество жизнеспособных клеток измеряли в MTS-тесте согласно рекомендациям производителя (Promega). Поглощение измеряли на планшетном мультифункциональном ридере SpectraMax iD3 (Molecular Devices, США). Скорость роста клеток рассчитывали по опубликованной ранее методике [21].

Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Тьюки на множественные сравнения использовали для оценки статистической досто-

верности наблюдаемых отличий в росте клеток. Пороговый уровень значимости принимали равным 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В представленной работе описано получение новой культуры опухолевых органоидов РМЖ. Клетки были успешно субкультивированы на протяжении трех пассажей. Уже на седьмые сутки после субкультивирования в культуре наблюдали интенсивный рост органоидов РМЖ (рис. 1).

Далее был проведен сравнительный гистологический анализ исходной опухолевой ткани и полученных опухолевых органоидов (рис. 2). В результате показано, что органоиды состоят из схожих с исходной тканью опухолевых эпителиальных клеток.

В результате проведенного тестирования лекарственных препаратов (рис. 3) показано, что из стандартно применяемых химиотерапевтических пре-

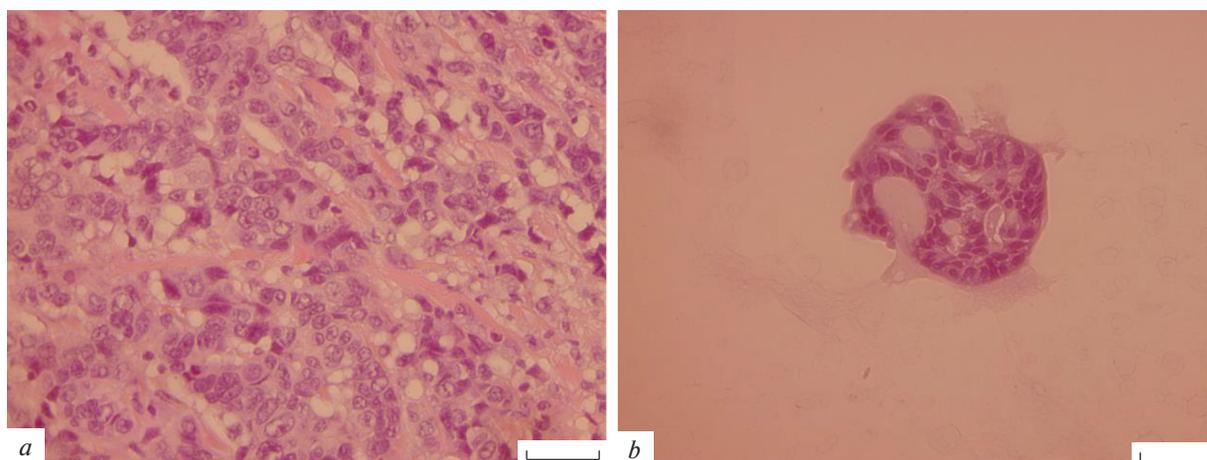


Рис. 2. Микрофотография исходной опухолевой ткани РМЖ (а) и полученных опухолевых органоидов (б). Окраска гематоксилином и эозином, длина масштабного отрезка – 50 мкм.

Fig. 2. Photo of the original breast cancer tissue (a) and the generated tumor organoids (b). Staining with hematoxylin and eosin, the length of the scalebar is 50 μm .

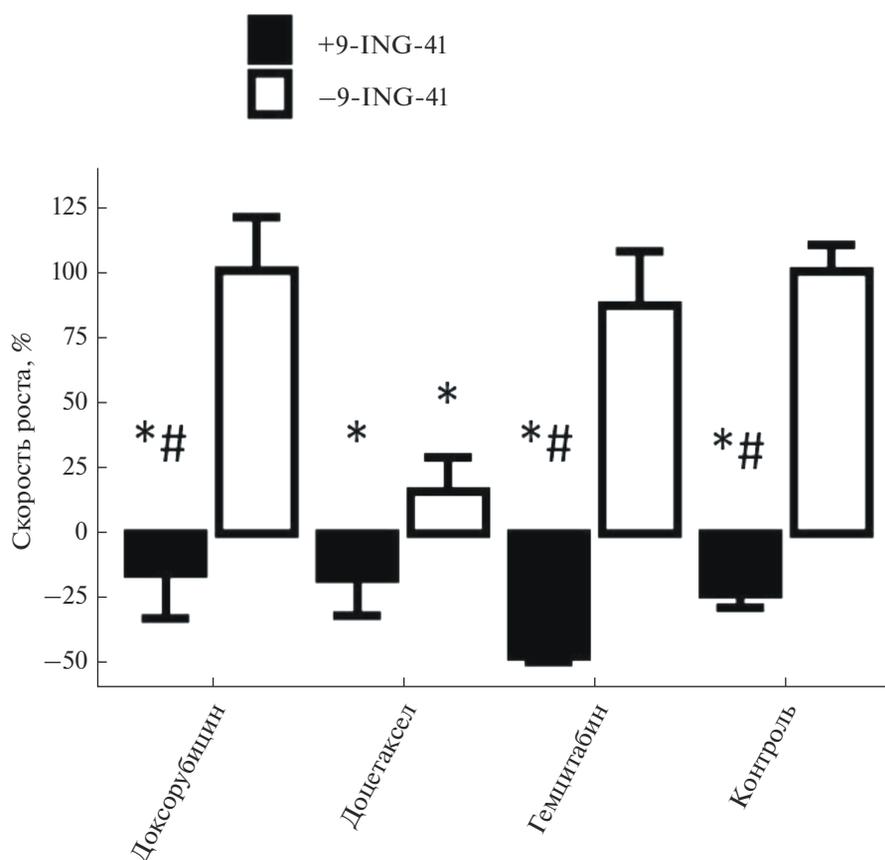


Рис. 3. Результаты анализа противоопухолевой активности химиотерапевтических препаратов и их комбинаций с 9-ING-41 на органоидах РМЖ. Планки погрешностей показывают стандартное отклонение среднего (SEM). * $p < 0.05$ по сравнению с контролем без добавления 9-ING-41; # $p < 0.05$ по сравнению с соответствующим препаратом без 9-ING-41.

Fig. 3. Analysis of the antitumor activity of chemotherapeutic drugs and their combinations with 9-ING-41 on breast cancer organoids. Error bars represent standard error of mean (SEM). * $p < 0.05$ versus control without 9-ING-41, # $p < 0.05$ versus corresponding treatment without 9-ING-41.

паратов только доцетаксел статистически значимо снижал (на 84% по сравнению с контролем) скорость роста опухолевых органоидов РМЖ ($p < 0.05$); при этом ни доксорубин ($p = 1$), ни гемцитабин ($p = 1$) в клинически релевантных концентрациях статистически значимо не ингибировали рост опухолевых клеток. Полученные данные также свидетельствуют о том, что 9-ING-41 в формате монотерапии эффективно подавлял рост опухолевых клеток ($p < 0.05$). Более того, в данном тесте 9-ING-41 проявлял цитотоксическое действие, так как число клеток после обработки препаратом снизилось на 23% по сравнению с начальным моментом времени. Интересно, что добавление 9-ING-41 к доксорубину ($p < 0.05$) и гемцитабину ($p < 0.05$) позволило существенно улучшить противоопухолевый эффект этих препаратов; при этом в случае доцетаксела статистически значимой разницы не наблюдали ($p = 0.73$).

Ранее показано, что киназа GSK-3 β – перспективная мишень для лечения РМЖ. Так, блокдаун GSK3 β приводил к существенному снижению пролиферации клеток РМЖ [22]. С другой стороны, у пациентов с повышенной экспрессией GSK-3 β был значительно увеличен риск рецидива заболевания [23]. Известно, что рецидив в виде отдаленных метастазов – основная причина смерти от РМЖ [24, 25]. На сегодняшний день терапия метастатического РМЖ не преследует полного излечения заболевания, она носит паллиативный характер и направлена прежде всего на улучшение качества жизни [26]. Основная проблема при лечении метастатического РМЖ заключается в трудно преодолимой резистентности как к химиотерапии, так и к более современной таргетной терапии [27–29].

Ранее ингибитор GSK-3 β 9-ING-41 уже тестировали на клеточных линиях и ксенографтных моделях РМЖ для преодоления резистентности к препарату СРТ-11 [20]. В результате было показано, что добавление 9-ING-41 к СРТ-11 позволяет существенно усилить противоопухолевый эффект [20]. Теперь впервые проанализирована противоопухолевая активность 9-ING-41 в сочетании с химиопрепаратами: доксорубицином, доцетакселом и гемцитабином – на культуре опухолевых органоидов РМЖ. Полученные результаты подтверждают, что 9-ING-41 обладает собственной противоопухолевой активностью, а также значительно усиливает действие доксорубина и гемцитабина. Таким образом, согласно полученным данным, 9-ING-41 может способствовать преодолению химиорезистентности к ряду традиционных препаратов для лечения РМЖ и на этом основании его целесообразно рекомендовать для изучения в доклинических и клинических исследованиях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-15-00397).

ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От всех пациентов получено информированное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.*, 2018, 68, 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
2. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (Заболеваемость и смертность). Ред. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Москва, МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России, 2018, 250 с.
3. Pecoraro C., Faggion B., Balboni B., Carbone D., Peters G.J., Diana P., Assaraf Y.G., Giovannetti E. GSK3 β as a novel promising target to overcome chemoresistance in pancreatic cancer. *Drug Resist. Updat.*, 2021, 58, 100779. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2021.100779>
4. Cormier K.W., Woodgett J.R. (2017) Recent advances in understanding the cellular roles of GSK-3. *F1000Research*, 2017, 6, 167. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10557.1>
5. Wu D., Pan W. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem. Sci.*, 2010, 35, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.002>
6. Kazi A., Xiang S., Yang H., Delitto D., Trevino J., Jiang R.H.Y., Ayaz M., Lawrence H.R., Kennedy P., Sebti S.M. GSK3 suppression upregulates β -catenin and c-Myc to abrogate KRas-dependent tumors. *Nat. Commun.*, 2018, 9, 5154. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07644-6>
7. Ougolkov A.V., Fernandez-Zapico M.E., Bilim V.N., Smyrk T.C., Chari S.T., Billadeau D.D. Aberrant nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 β in human pancreatic cancer: association with kinase activity and tumor dedifferentiation. *Clin. Cancer Res.*, 2006, 12, 5074–5081. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0196>
8. Shakoori A., Ougolkov A., Yu Z.W., Zhang B., Modarresi M.H., Billadeau D.D., Mai M., Takahashi Y., Minamoto T. Deregulated GSK3 β activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 334, 1365–1373. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.041>

9. Sato T., Stange D.E., Ferrante M., Vries R.G.J., van Es J.H., van den Brink S., van Houdt W.J., Pronk A., van Gorp J., Siersema P.D., Clevers H. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*, 2011, 141, 1762–1772. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.050>
10. Drost J., Clevers H. Organoids in cancer research. *Nat. Rev. Cancer*, 2018, 18, 407–418. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0007-6>
11. Xu H., Lyu X., Yi M., Zhao W., Song Y., Wu K. Organoid technology and applications in cancer research. *J. Hematol. Oncol.*, 2018, 11, 116. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0662-9>
12. Weeber F., Ooft S.N., Dijkstra K.K., Voest E.E. Tumor organoids as a pre-clinical cancer model for drug discovery. *Cell Chem. Biol.*, 2017, 24, 1092–1100. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.06.012>
13. Vlachogiannis G., Hedayat S., Vatsiou A., Jamin Y., Fernández-Mateos J., Khan K., Lampis A., Eason K., Huntingford I., Burke R., Raita M., Koh D., Tunariu N., Collins D., Hulkki-Wilson S., Ragulan C., Spiteri I., Moorcraft S.Y., Chau I., Rao S., Watkins D., Fotiadis N., Bali M., Darvish-Damavandi M., Lote H., Eltahir Z., Smyth E.C., Begum R., Clarke P.A., Hahne J.C., Dowsett M., de Bono J., Workman P., Sadanandam A., Fasan M., Sansom O.J., Eccles S., Starling N., Braconi C., Sottoriva A., Robinson S.P., Cunningham D., Valeri N. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*, 2018, 359, 920–926. <https://doi.org/10.1126/science.aao2774>
14. Ooft S.N., Weeber F., Dijkstra K.K., McLean C.M., Kating S., van Werkhoven E., Schipper L., Hoes L., Vis D.J., van de Haar J., Prevoe W., Snaebjornsson P., van der Velden D., Klein M., Chalabi M., Boot H., van Leerdam M., Bloemendal H.J., Beerepoot L.V., Wessels L., Cuppen E., Clevers H., Voest E.E. Patient-derived organoids can predict response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. *Sci. Transl. Med.*, 2019, 11, eaay2574. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay2574>
15. Gaisina I.N., Gallier F., Ougolkov A.V., Kim K.H., Kurose T., Guo S., Holzle D., Luchini D.N., Blond S.Y., Billadeau D.D., Kozikowski A.P. From a natural product lead to the identification of potent and selective benzofuran-3-yl-(indol-3-yl)maleimides as glycogen synthase kinase 3 β inhibitors that suppress proliferation and survival of pancreatic cancer cells. *J. Med. Chem.*, 2009, 52, 1853–1863. <https://doi.org/10.1021/jm801317h>
16. Nikulin S.V., Alekseev B.Y., Sergeeva N.S., Karalkin P.A., Nezhurina E.K., Kirsanova V.A., Sviridova I.K., Akhmedova S.A., Volchenko N.N., Bolotina L.V., Osipyants A.I., Hushpalian D.M., Topchiy M.A., Asachenko A.F., Koval A.P., Shcherbo D.S., Kiselev V.I., Mikhaylenko D.S., Schumacher U., Poloznikov A.A. Breast cancer organoid model allowed to reveal potentially beneficial combinations of 3,3'-diindolylmethane and chemotherapy drugs. *Biochimie*, 2020, 179, 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.10.007>
17. Sachs N., de Ligt J., Kopper O., Gogola E., Bounova G., Weeber F., Balgobind A.V., Wind K., Gracanin A., Begthel H., Korving J., van Boxtel R., Duarte A.A., Lelieveld D., van Hoek A., Ernst R.F., Blokzijl F., Nijman I.J., Hoogstraat M., van de Ven M., Egan D.A., Zinzalla V., Moll J., Boj S.F., Voest E.E., Wessels L., van Diest P.J., Rottenberg S., Vries R.G.J., Cuppen E., Clevers H. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity. *Cell*, 2018, 172, 373–386.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.010>
18. Liston D.R., Davis M. Clinically relevant concentrations of anticancer drugs: a guide for nonclinical studies. *Clin. Cancer Res.*, 2017, 23, 3489–3498. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3083>
19. Kuroki H., Anraku T., Kazama A., Bilim V., Tasaki M., Schmitt D., Mazar A.P., Giles F.J., Ugolkov A., Tomita Y. 9-ING-41, a small molecule inhibitor of GSK-3 β , potentiates the effects of anticancer therapeutics in bladder cancer. *Sci. Rep.*, 2019, 9, 19977. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56461-4>
20. Ugolkov A., Gaisina I., Zhang J.-S., Billadeau D.D., White K., Kozikowski A., Jain S., Cristofanilli M., Giles F., O'Halloran T., Cryns V.L., Mazar A.P. GSK-3 inhibition overcomes chemoresistance in human breast cancer. *Cancer Lett.*, 2016, 380, 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.07.006>
21. Hafner M., Niepel M., Chung M., Sorger P.K. Growth rate inhibition metrics correct for confounders in measuring sensitivity to cancer drugs. *Nat. Methods*, 2016, 13, 521–527. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3853>
22. Shin S., Wolgamott L., Tcherkezian J., Vallabhapurapu S., Yu Y., Roux P.P., Yoon S.-O. Glycogen synthase kinase-3 β positively regulates protein synthesis and cell proliferation through the regulation of translation initiation factor 4E-binding protein 1. *Oncogene*, 2014, 33, 1690–1699. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.113>
23. Quintayo M.A., Munro A.F., Thomas J., Kunkler I.H., Jack W., Kerr G.R., Dixon J.M., Chetty U., Bartlett J.M.S. GSK3 β and cyclin D1 expression predicts outcome in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2012, 136, 161–168. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2229-8>
24. Hagemeister F.B., Buzdar A.U., Luna M.A., Blumenstein G.R. Causes of death in breast cancer: a clinicopathologic study. *Cancer*, 1980, 46, 162–167. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19800701\)46:1<162::AID-CNCR2820460127>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19800701)46:1<162::AID-CNCR2820460127>3.0.CO;2-B)
25. Dillekås H., Rogers M.S., Straume O. Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Med.*, 2019, 8, 5574–5576. <https://doi.org/10.1002/cam4.2474>
26. Gerber B., Freund M., Reimer T. Recurrent breast cancer: treatment strategies for maintaining and prolonging good quality of life. *Dtsch. Arztebl. Int.*, 2010, 107, 85–91. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2010.0085>
27. Sledge G.W., Mamounas E.P., Hortobagyi G.N., Burstein H.J., Goodwin P.J., Wolff A.C. Past, present, and future challenges in breast cancer treatment. *J. Clin. Oncol.*, 2014, 32, 1979–1986. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.55.4139>
28. Wong S.T., Goodin S. Overcoming drug resistance in patients with metastatic breast cancer. *Pharmacotherapy*, 2009, 29, 954–965. <https://doi.org/10.1592/phco.29.8.954>
29. Hanker A.B., Sudhan D.R., Arteaga C.L. (2020) Overcoming endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Cell*, 2020, 37, 496–513. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.009>

9-ING-41, Low-Molecular Inhibitor of GSK-3 β , Suppresses the Growth of Breast Cancer Organoids

S. V. Nikulin^{a, b, #}, A. A. Poloznikov^{a, b}, and B. Ya. Alekseev^b

^a*Faculty of Biology and Biotechnology, Higher School of Economics National Research University, Moscow, 101000 Russia*

^b*National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, 249036 Russia*

[#]*e-mail: snikulin@hse.ru*

Abstract—To date, breast cancer (BC) is the leading cause of cancer death in women. Despite significant progress in the treatment of BC in recent years, high mortality indicates the need for developing new approaches to its therapy. It was previously shown that GSK-3 β is a promising target for the BC treatment. In this work, we have described obtaining a new culture of breast tumor organoids and testing the activity of 9-ING-41 as a GSK-3 β inhibitor both in monotherapy and in combination with standard chemotherapeutic drugs used to treat BC. The results obtained confirmed that 9-ING-41 possesses antitumor activity. Moreover, 9-ING-41 was shown to significantly enhance the effects of chemotherapeutic agents such as doxorubicin and gemcitabine. Thus, 9-ING-41 is a promising candidate for further study in preclinical and clinical trials for the BC therapy.

Keywords: breast cancer, tumor organoids, GSK-3, 9-ING-41