

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 543.94

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.255-265

АФФИННОСТЬ К ЭСТРОГЕНОВОМУ РЕЦЕПТОРУ α (ER α) ПРОИЗВОДНОГО *ТРАНС*-СТИЛЬБЕНА, СОДЕРЖАЩЕГО ФРАГМЕНТ ПИРИДОКСИНА

*О.В. Бондарь, Р. Карут, О.А. Мостовая, М.В. Пугачев,
А.Г. Иксанова, Ю.Г. Штырлин*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Аннотация

Исследование направлено на поиск молекулярных мишеней действия перспективного противоопухолевого агента на основе *транс*-стильбена, содержащего в своей структуре фрагмент пиридоксина. Выявленное соединение-лидер ((*E*)-6-(3,4-диметоксистирил)-2,2,5,8-тетраметил-4*H*-[1,3]диоксино[4,5-*c*]пиридин) селективно индуцирует апоптоз в клетках аденокарциномы молочной железы MCF-7, гиперэкспрессирующих рецептор эстрогена, но не в клетках MDA-MB-231, негативных по эстрогеновому рецептору. В связи с этим изучен механизм действия этого производного *транс*-стильбена в качестве селективного модулятора рецепторов эстрогена. С использованием флуоресцентного поляризационного теста оценено сродство производного *транс*-стильбена к человеческому эстрогеновому рецептору α (ER α). Показано, что, в отличие от его структурных аналогов тамоксифена и ралоксифена, соединение-лидер не обладает сродством к ER α и не формирует комплексов с ним. На основании этого факта сделан вывод об альтернативном механизме селективного действия пиридоксинсодержащего производного *транс*-стильбена в отношении эстроген-позитивных клеток рака молочной железы. Для эстрадиола, ралоксифена и тамоксифена рассчитаны значения EC₅₀ вытеснения из активного центра ER α флуоресцентного лиганда, которые составили 22, 120 и 595 нМ соответственно.

Ключевые слова: *транс*-стильбены, пиридоксин, эстрогеновый рецептор α , тамоксифен, ралоксифен, комплексообразование, поляризация флуоресценции.

Введение

Для лечения опухолей молочной железы широко применяют селективные модуляторы рецепторов эстрогена – тамоксифен и ралоксифен, которые имеют структурное сходство с женским половым гормоном – эстрадиолом. Такие молекулы связываются с рецептором эстрогена, но в отличие от эстрадиола подавляют активацию рецептора и пролиферацию тканей молочной железы, оказывая противоопухолевый эффект [1].

Тамоксифен применяют для терапии эстроген-позитивного метастатического рака молочной железы в комплексе с другими препаратами, а также для предотвращения рецидивов после хирургического удаления опухоли, лучевой терапии или для профилактики в группе пациентов с высоким риском развития

рака молочной железы [4]. Тамоксифен связывается с эстрогеновым рецептором α (ER α), препятствует связыванию с ним эстрадиола и активации рецептора в тканях молочной железы. Это сопровождается отсутствием транскрипции эстроген-зависимых генов, к которым относятся факторы роста и онкогены [5]. Тамоксифен также является антагонистом эстрогенового рецептора β в тканях молочной железы [6], но играет роль агониста эстрогеновых рецепторов в матке и стимулирует пролиферацию эндометрия, что повышает риск развития рака эндометрия [7].

Ралоксифен назначают для терапии остеопороза у женщин в постменопаузе, а также в профилактических целях пациентам с высоким риском развития рака молочной железы. Он демонстрирует проэстрогенный эффект в костной ткани и стимулирует метаболизм липидов (в качестве протектора против атеросклеротических осложнений сосудов), однако является антиэстрогеном в тканях молочной железы и эндометрии матки [8, 9]. Ралоксифен обладает высоким сродством как к ER α , так и к эстрогеновому рецептору β . По данным рентгеноструктурного анализа, ралоксифен связывается с ER α с небольшим отличием в 3D-структуре от аналогичного комплекса с эстрадиолом [10]. Агонистическое или антагонистическое действие ралоксифена и тамоксифена зависит от степени привлечения коактиваторов и корепрессоров к промоторам гена-мишени рецептора эстрогена [11–13]. Вследствие различной степени экспрессии коактиваторов и корепрессоров в различных тканях эффекты становятся тканеспецифичными.

В лаборатории НОЦ фармацевтики КФУ синтезируют новые соединения, которые объединяют в своей структуре фрагмент молекулы пиридоксина (витамина B₆) и фрагмент стильбена в *транс*-конфигурации относительно двойной связи [2, 3]. Подобная структура имитирует ароматическую систему эстрадиола. В ходе предыдущих исследований получен широкий ряд (31 новое соединение) пиридоксинсодержащих производных *транс*-стильбена, проведен скрининг их противоопухолевой активности в отношении панели опухолевых клеточных линий [2] и выявлено соединение-лидер **I** ((*E*)-6-(3,4-диметокси-стирил)-2,2,5,8-тетраметил-4*H*-[1,3]диоксино[4,5-*c*]пиридин), содержащее шестичленный кетальный цикл, метильную группу в пятом и 3,4-диметокси-стириловый фрагмент в шестом положении пиридинового кольца с *транс*-конфигурацией относительно двойной связи (рис. 1). Установлено, что соединение-лидер **I** обладает селективной антипролиферативной активностью в отношении опухолевых клеток MCF-7 с высокой продукцией эстрогеновых рецепторов (ER+) (IC₅₀ < 5 мкМ) и в то же время в отношении клеток с низкой продукцией рецепторов эстрогена MDA-MB231 (ER-) активность в 3.3 раза меньше [2]. Терапевтический индекс (отношение IC₅₀ для условно-нормальных клеток к IC₅₀ для опухолевых клеток) соединения-лидера составил 48 (у реперного соединения ралоксифена он равен 5.8) [2]. Соединение-лидер **I** эффективно проникает в цитоплазму опухолевых клеток, а также накапливается в их ядрах, что может способствовать взаимодействию с рецепторами ядра [3]. Также показано, что соединение-лидер **I** активирует программируемую гибель (апоптоз) только опухолевых клеток ER+. При этом соединение-лидер **I** уменьшает мембранный потенциал митохондрий и увеличивает концентрацию

активных форм кислорода в опухолевых клетках ER⁺, клетки ER⁻ не подвергаются такому воздействию [2]. В связи с этим представляет интерес оценка потенциальных эффекторных свойств соединения-лидера **I** по отношению к ER α . В качестве веществ сравнения использовали селективные модуляторы ER α – лекарственные средства тамоксифен и ралоксифен.

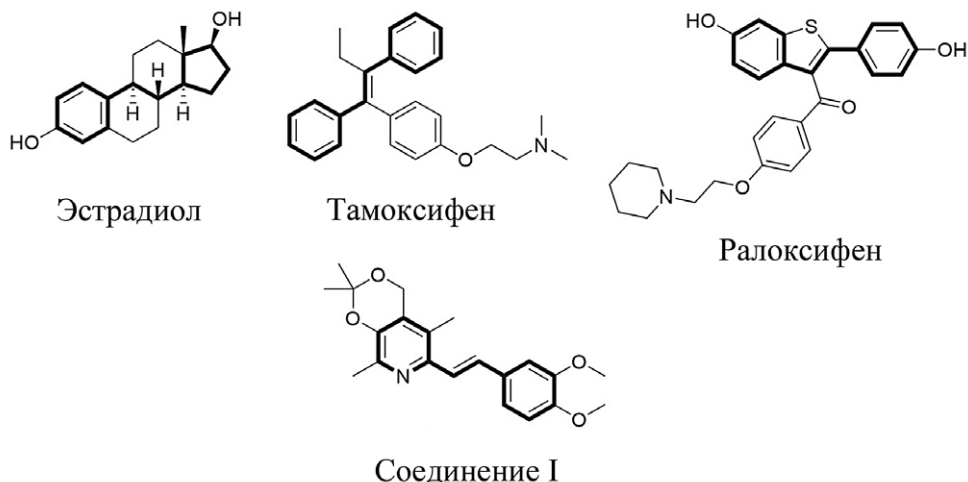


Рис. 1. Структура известных селективных модуляторов рецепторов эстрогена и соединения **I**

1. Материалы и методы

Связывание исследуемых соединений с рекомбинантным ER α изучали с использованием коммерческого тест-набора PolarScreen™ ER Alpha Competitor Assay, Red (Life Technologies, США). Набор содержит человеческий рекомбинантный ER α и его флуоресцентный лиганд. При взаимодействии с рецептором лиганд располагается в его активном центре, свободное вращение молекулы лиганда затруднено и поляризация его флуоресценции высокая. При добавлении в систему рецептор-лиганд эффекторов с высоким сродством к ER α происходит вытеснение лиганда из активного центра рецептора, и поляризация флуоресценции лиганда снижается (рис. 2).

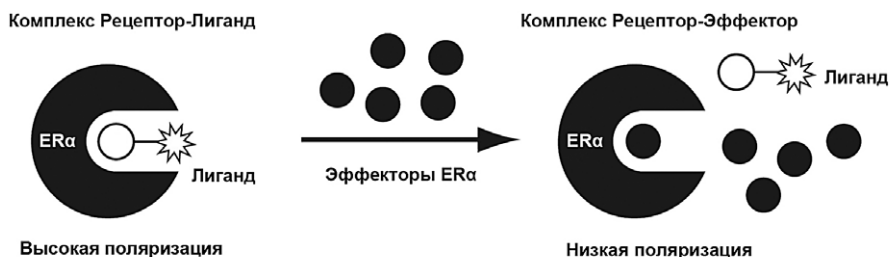


Рис. 2. Схема формирования отклика поляризации флуоресценции лиганда в комплексе с эстрогеновым рецептором α (ER α) [14]

Растворы эстрадиола и ралоксифена гидрохлорид с концентрацией 5 мМ получали их растворением в диметилсульфоксиде (ДМСО). Для приготовления 5 мМ растворов соединения I и тамоксифена использовали ДМСО с добавлением эквимольного количества HCl для получения гидрохлоридов. Серийные разведения исследуемых веществ с концентрациями 2000, 1000, 500, 100, 50, 10, 1, 0,2 мкМ также осуществляли в ДМСО. Далее 3.4 мкл приготовленных разведений исследуемых веществ смешивали со 167 мкл реакционного буферного раствора с получением двукратных рабочих растворов. Для приготовления рабочего раствора комплекса ER α с флуоресцентным лигандом в отдельной пробирке смешивали 2042 мкл реакционного буферного раствора, 21.5 мкл флуоресцентного лиганда эстрогенового рецептора и 86 мкл нативного человеческого рецептора α . Опытная проба содержала 150 мкл двукратных разведений исследуемых веществ и 150 мкл рабочего раствора комплекса ER α с лигандом. Рабочие концентрации исследуемых веществ в пробе составили: 20000, 10000, 5000, 1000, 500, 100, 50, 10, 2 нМ.

Одновременно осуществляли следующие контрольные реакции. Для получения пробы без рецептора (низкая поляризация флуоресценции) смешивали 3 мкл флуоресцентного лиганда и 298 мкл реакционного буферного раствора, затем отбирали 150 мкл этой смеси и добавляли 150 мкл реакционного буферного раствора, содержащего аналогичное опытным пробам количество ДМСО. Максимальный контроль (максимальная поляризация флуоресценции) определяли в системе, содержащей 150 мкл комплекса ER α с лигандом и 150 мкл реакционного буферного раствора с добавлением аналогичного опытным пробам содержания ДМСО. Минимальный контроль (низкие значения поляризации флуоресценции) регистрировали в системе из 150 мкл двукратных разведений эстрадиола и 150 мкл рабочего раствора комплекса ER α с лигандом.

Опытные и контрольные пробы инкубировали 2 ч до момента регистрации поляризации флуоресценции. Затем их помещали в кварцевые кюветы малого объема и регистрировали спектры флуоресценции на флуоресцентном спектрофотометре Fluorolog-3 Jobin Yvon (Horiba, Япония) в условиях четырех различных положений поляризаторов на возбуждении и испускании: вертикально/вертикально (vv), вертикально/горизонтально (vh), горизонтально/вертикально (hv) и горизонтально/горизонтально (hh), в следующих условиях: $\lambda_{\text{возбуждения}} = 535$ нм, $\lambda_{\text{испускания}} = 560\text{--}610$ нм, ширина спектральных щелей – 10 нм, накопление – 0.2 с, позиция кюветы – под прямым углом.

Поляризацию флуоресценции рассчитывали по следующей формуле:

$$P = \left(\frac{I_{vv} \times I_{hh} - 1}{I_{vh} \times I_{hv}} \right) / \left(\frac{I_{vv} \times I_{hh} + 1}{I_{vh} \times I_{hv}} \right),$$

где I_{vv} , I_{hh} , I_{vh} , I_{hv} – интенсивности флуоресценции лиганда в максимуме при различных положениях поляризатора. Разность поляризации флуоресценции до и после добавления насыщающей концентрации эстрадиола принимали за максимальный эффект (100%-ное сродство к рецептору), строили зависимости наблюдаемого эффекта от концентрации, по которым определяли EC₅₀ исследуемых эффекторов.

2. Результаты и обсуждение

На первом этапе работы по ранее разработанной методике [2] из пиридоксина **1** в пять стадий получено соединение-лидер **I** (схема 1). На первой стадии осуществляли защиту гидроксильных групп в четвертом и пятом положениях пиридоксина с образованием семичленного кетала **2**. На второй стадии проводили гидроксиметилирование полученного кетала в щелочной среде при 70 °С в течение 60 ч с образованием соответствующего диола **3**. Далее 6-гидроксиметильное производное пиридоксина **3** подвергалось хлорированию с использованием двукратного избытка тионилхлорида в дихлорметане при комнатной температуре с последующей изомеризацией семичленного кетала в шестичленный и образованием соответствующего производного **4**. Фосфониевую соль **5** получали взаимодействием дихлорпроизводного пиридоксина **4** с избытком трифенилфосфина в ацетонитриле при кипячении в течение 7 ч. И, наконец, реакция Виттига фосфониевой соли **5** с 3,4-диметоксибензальдегидом приводила к образованию производного *транс*-стильбена, содержащего фрагмент пиридоксина **I**. Реакцию проводили в дихлорметане в присутствии гидрида натрия при 80 °С в течение 30 ч под давлением в закрытом сосуде.

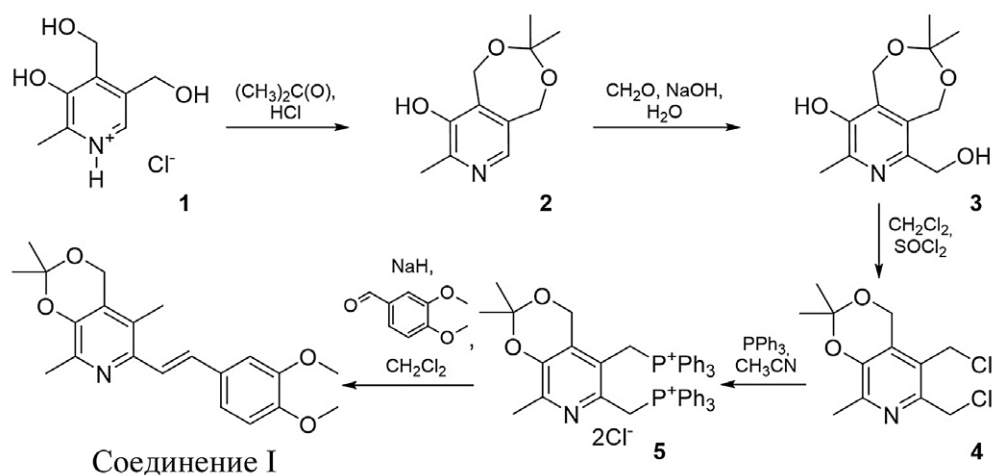


Схема 1. Синтез соединения **I** из пиридоксина **1**

С целью выявления механизма противоопухолевого действия соединения **I** оценили его связывание с человеческим ER α с использованием тест-набора, содержащего рекомбинантный рецептор и его флуоресцентный лиганд. В качестве реперных соединений, обладающих высоким сродством к эстрогеновому рецептору, использовали эстрадиол, тамоксифен и ралоксифен. Спектры флуоресценции комплекса рецептор-лиганд регистрировали в присутствии различных концентраций тестируемого соединения **I** и реперных соединений в условиях четырех различных положений поляризаторов света при длинах волн возбуждения и испускания. Рассчитанные значения поляризации флуоресценции комплекса рецептор-лиганд в присутствии различных концентраций исследуемых эффекторов представлены на рис. 3.

Эстрадиол обладает максимальным сродством к ER α [15], поэтому в его присутствии флуоресцентный лиганд вытесняется из активного центра рецеп-

тора и поляризация флуоресценции лиганда значительно уменьшается (рис. 3). Различие поляризации флуоресценции до и после добавления насыщающей концентрации эстрадиола (10 мкМ) принимали за максимальный эффект и считали контрольным значением. Эффективность остальных исследуемых соединений в различных тестируемых концентрациях выражали в процентах относительно этого контроля. Полученные значения представлены на рис. 4.

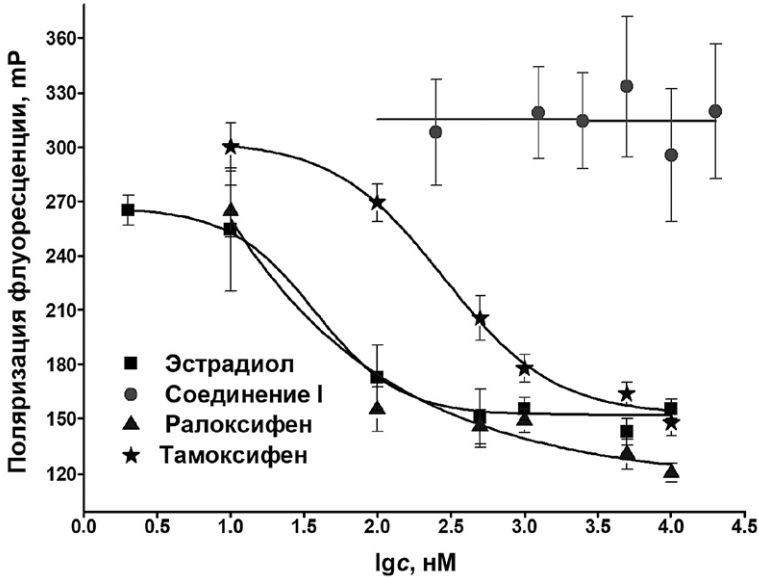


Рис. 3. Дозозависимая поляризация флуоресценции лиганда Fluormone EL Red в комплексе с ER α в присутствии различных концентраций соединения I, эстрадиола, ралоксифена и тамоксифена

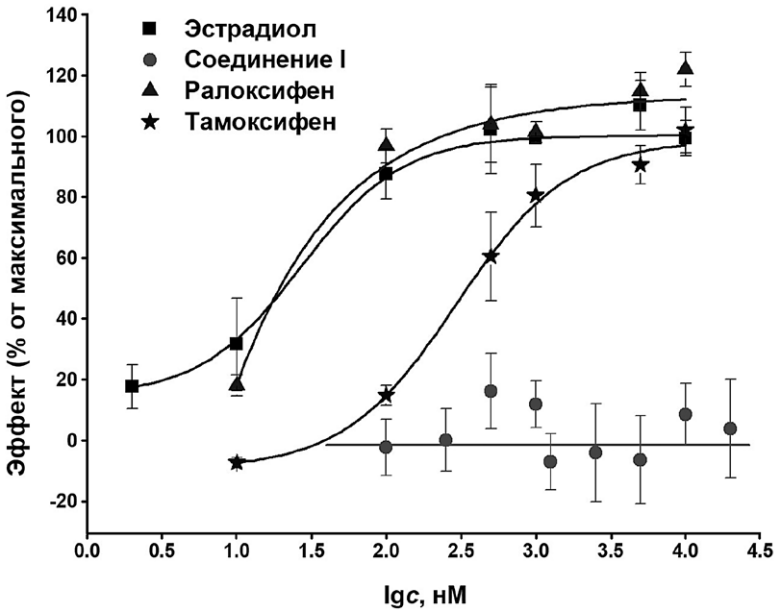


Рис. 4. Эффективность вытеснения флуоресцентного лиганда из активного центра ER α в присутствии различных концентраций соединения I, эстрадиола, ралоксифена и тамоксифена

Установлено, что при добавлении соединения **I** к комплексу рецептор-лиганд вплоть до достижения концентрации 20 мкМ поляризация флуоресценции лиганда не уменьшается и, следовательно, лиганд не вытесняется из активного центра рецептора. Напротив, при добавлении возрастающих концентраций тамоксифена и ралоксифена к комплексу рецептор-лиганд происходит постепенное уменьшение поляризации флуоресценции лиганда вследствие его вытеснения из активного центра (рис. 3). Из представленных на рис. 4 зависимостей эффективности вытеснения флуоресцентного лиганда от концентрации соединений получены их полумаксимальные эффективные концентрации (EC_{50}), значения которых составили для эстрадиола 22 нМ, для ралоксифена 120 нМ, для тамоксифена 595 нМ. Эти результаты в целом согласуются с литературными значениями EC_{50} для рассматриваемых эффекторов [14–16].

Таким образом, производное *транс*-стилбена, содержащее фрагмент пиридоксина **I**, в отличие от своих структурных аналогов тамоксифена и ралоксифена не обладает сродством к человеческому ER α и, следовательно, не регулирует пролиферацию и метаболизм клеток молочной железы опосредованно через воздействие на ER α . Можно предположить, что соединение-лидер **I** избирательно регулирует экспрессию генов в опухолевых клетках. Так, например, в предыдущих исследованиях [2] показано, что соединение-лидер **I** уменьшает уровень экспрессии ER α в клетках MCF-7. Не исключено, что это соединение также оказывает влияние на экспрессию других белков и внутриклеточное содержание кальция, что характерно для тамоксифена [17].

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения проектной части государственного задания в сфере научной деятельности FZSM2023-0010.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Diez-Perez A. Selective estrogen receptor modulators (SERMS) // Arq. Bras. Endocrinol. Metabol. 2006. V. 50, No 4. P. 720–734. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302006000400017>.
2. Pugachev M.V., Pavelyev R.S., Nguyen T.N.T., Gabbasova R.R., Bulatov T.M., Iksanova A.G., Aljondi B., Bondar O.V., Grishaev D.Yu., Yamaleeva Z.R., Kataeva O.N., Nikishova T.V., Balakin K.V., Shtyrlin Yu.G. Synthesis, antitumor activity and structure-activity studies of novel pyridoxine-based bioisosteric analogs of estradiol // Bioorg. Med. Chem. 2021. V. 30. Art. 115957. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115957>.
3. Pugachev M.V., Nguyen T.T.N., Bulatov T.M., Pavelyev R.S., Iksanova A.G., Bondar O.V., Balakin K.V., Shtyrlin Yu.G. Synthesis and antitumor activity of novel pyridoxine-based bioisosteric analogs of *trans*-stilbenes // J. Chem. 2017. V. 2017. Art. 8281518. <https://doi.org/10.1155/2017/8281518>.
4. Jordan V.C. A current view of tamoxifen for the treatment and prevention of breast cancer // Br. J. Pharmacol. 1993. V. 110, No 2. P. 507–517. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13840.x>.
5. Klinge C.M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements // Nucleic Acids Res. 2001. V. 29, No 14. P. 2905–2919. <https://doi.org/10.1093/nar/29.14.2905>.
6. Grubberger-Saal S.K., Bendahl P.-O., Saal L.H., Laakso M., Hegardt C., Edén P., Peterson C., Malmström P., Isola J., Borg Å., Fernö M. Estrogen receptor β expression is associated

- with tamoxifen response in ER α -negative breast carcinoma // *Clin. Cancer Res.* 2007. V. 13, No 7. P. 1987–1994. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1823>.
7. *Howell A., Cuzick J., Baum M., Buzdar A., Dowsett M., Forbes J.F., Hochtin-Boes G., Houghton J., Locker G.Y., Tobias J.S.* Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer // *Lancet.* 2005. V. 365, No 9453. P. 60–62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17666-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17666-6).
 8. *Heringa M.* Review on raloxifene: Profile of a selective estrogen receptor modulator // *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2003. V. 41, No 8. P. 331–345. <https://doi.org/10.5414/cpp41331>.
 9. *Bryant H.U., Glasebrook A.L., Yang N.N., Sato M.* An estrogen receptor basis for raloxifene action in bone // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1999. V. 69, No 1–6. P. 37–44. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(98\)00147-2](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(98)00147-2).
 10. *Brzozowski A.M., Pike A.C.W., Dauter Z., Hubbard R.E., Bonn T., Engström O., Öhman L., Greene G.L., Gustafsson J.-Å., Carlquist M.* Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor // *Nature.* 1997. V. 389, No 6652. P. 753–758. <https://doi.org/10.1038/39645>.
 11. *Martinkovich S., Shah D., Planey S.L., Arnott J.A.* Selective estrogen receptor modulators: tissue specificity and clinical utility // *Clin. Interventions Aging.* 2014. V. 9. P. 1437–1452. <https://doi.org/10.2147/CIA.S66690>.
 12. *Liu H., Park W.-C., Bentrem D.J., McKian K.P., de Los Reyes A., Loweth J.A., Schafer J.M., Zapf J.W., Jordan V.C.* Structure-function relationships of the raloxifene-estrogen receptor- α complex for regulating transforming growth factor- α expression in breast cancer cells // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277, No 11. P. 9189–9198. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108335200>.
 13. *Weatherman R.V., Clegg N.J., Scanlan T.S.* Differential SERM activation of the estrogen receptors (ER α and ER β) at AP-1 sites // *Chem. Biol.* 2001. V. 8, No 5. P. 427–436. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00025-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00025-4).
 14. PolarScreen™ ER Alpha Competitor Assay, Red. User manual. Publ.: MAN0009428. Rev.: A.0. URL: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2Fpolarcreen_er_alpha_red_man.pdf.
 15. *Lin A.H.Y., Li R.W.S., Ho E.Y.W., Leung G.P.H., Leung S.W.S., Vanhoutte P.M., Man R.Y.K.* Differential ligand binding affinities of human estrogen receptor- α isoforms // *PLoS ONE.* 2013. V. 8, No 4. Art. e63199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063199>.
 16. *Blair R.M., Fang H., Branham W.S., Hass B.S., Dial S.L., Moland C.L., Tong W., Shi L., Perkins R., Sheehan D.M.* The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands // *Toxicol. Sci.* 2000. V. 54, No 1. P. 138–153. <https://doi.org/10.1093/toxsci/54.1.138>.
 17. *Radin D.P., Patel P.* Delineating the molecular mechanisms of tamoxifen's oncolytic actions in estrogen receptor-negative cancers // *Eur. J. Pharmacol.* 2016. V. 781. P. 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.04.017>.

Поступила в редакцию 08.11.2023

Принята к публикации 15.01.2024

Бондарь Оксана Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Научно-образовательного центра фармацевтики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: OkVBondar@kpfu.ru

Карут Рауда, аспирант, младший научный сотрудник Научно-образовательного центра фармацевтики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: rawdahkarwt@gmail.com

Мостовая Ольга Александровна, кандидат химических наук, инженер 1 категории кафедры органической и медицинской химии Химического института имени А.М. Бутлерова

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: olga.mostovaya@mail.ru

Пугачев Михаил Владимирович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник Научно-образовательного центра фармацевтики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: mpugache@kpfu.ru

Иксанова Альфия Габдулахатовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Научно-образовательного центра фармацевтики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: Alfija.Iksanova@kpfu.ru

Штырлин Юрий Григорьевич, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник Научно-образовательного центра фармацевтики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: Yurii.Shtyrilin@kpfu.ru

ISSN 2542-064X (Print)

ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2024, vol. 166, no. 2, pp. 255–265

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.255-265

Affinity for Estrogen Receptor α (ER α) in a *trans*-Stilbene Derivative Containing a Pyridoxine Fragment

O.V. Bondar^{*}, *R. Karut*^{**}, *O.A. Mostovaya*^{***}, *M.V. Pugachev*^{****},
A.G. Iksanova^{*****}, *Yu.G. Shtyrilin*^{*****}

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

E-mail: ^{*}OkVBondar@kpfu.ru, ^{**}rawdahkarwt@gmail.com, ^{***}olga.mostovaya@mail.ru,
^{****}mpugache@kpfu.ru, ^{*****}Alfija.Iksanova@kpfu.ru, ^{*****}Yurii.Shtyrilin@kpfu.ru

Received November 8, 2023; Accepted January 15, 2024

Abstract

Molecular targets for a promising antitumor agent based on *trans*-stilbene containing a pyridoxine fragment were identified. The lead compound, (*E*)-6-(3,4-dimethoxystyryl)-2,2,5,8-tetramethyl-4*H*-[1,3]dioxino[4,5-*c*]pyridine, was found to selectively induce apoptosis in MCF-7 breast adenocarcinoma cells overexpressing estrogen receptor, but not in MDA-MB-231 cells negative for estrogen receptor. The mechanism by which the novel *trans*-stilbene derivative acts as a selective estrogen receptor modulator was analyzed, and the affinity for human estrogen receptor α (ER α) was assessed by fluorescence polarization. Unlike its structural analogs—tamoxifen and raloxifene, the lead compound showed no affinity

for ER α and did not form complexes with it. Therefore, it was concluded that the selective action of the pyridoxine-containing derivative of *trans*-stilbene on estrogen-positive breast cancer cells occurs through an alternative mechanism. The EC₅₀ values for the displacement of the fluorescent ligand from the ER α active site were 22, 120, and 595 nM for estradiol, raloxifene, and tamoxifen, respectively.

Keywords: *trans*-stilbenes, pyridoxine, estrogen receptor α , tamoxifen, raloxifene, complexation, fluorescence polarization

Acknowledgments. This study was supported by the subsidy allocated to Kazan Federal University for the state assignment in the sphere of scientific activities (project no. FZSM2023-0010).

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Figure Captions

Fig. 1. Structure of known selective estrogen receptor modulators and lead compound I.

Fig. 2. Fluorescence polarization response of the ligand in the complex with estrogen receptor α (ER α) [14].

Scheme 1. Synthesis of lead compound I from pyridoxine 1.

Fig. 3. Dose-dependent fluorescence polarization of the Fluormone EL Red ligand in the complex with ER α at varying concentrations of compound I, estradiol, raloxifene, and tamoxifen.

Fig. 4. Efficiency of the fluorescent ligand displacement from the active site of ER α at varying concentrations of compound I, estradiol, raloxifene, and tamoxifen.

References

1. Diez-Perez A. Selective estrogen receptor modulators (SERMS). *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, 2006, vol. 50, no. 4, pp. 720–734. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302006000400017>.
2. Pugachev M.V., Pavelyev R.S., Nguyen T.N.T., Gabbasova R.R., Bulatov T.M., Iksanova A.G., Aljondi B., Bondar O.V., Grishaev D.Yu., Yamaleeva Z.R., Kataeva O.N., Nikishova T.V., Balakin K.V., Shtyrlin Yu.G. Synthesis, antitumor activity and structure-activity studies of novel pyridoxine-based bioisosteric analogs of estradiol. *Bioorg. Med. Chem.*, 2021, vol. 30, art. 115957. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115957>.
3. Pugachev M.V., Nguyen T.T.N., Bulatov T.M., Pavelyev R.S., Iksanova A.G., Bondar O.V., Balakin K.V., Shtyrlin Yu.G. Synthesis and antitumor activity of novel pyridoxine-based bioisosteric analogs of *trans*-stilbenes. *J. Chem.*, 2017, vol. 2017, art. 8281518. <https://doi.org/10.1155/2017/8281518>.
4. Jordan V.C. A current view of tamoxifen for the treatment and prevention of breast cancer. *Br. J. Pharmacol.*, 1993, vol. 110, no. 2, pp. 507–517. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13840.x>.
5. Klinge C.M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.*, 2001, vol. 29, no. 14, pp. 2905–2919. <https://doi.org/10.1093/nar/29.14.2905>.
6. Gruvberger-Saal S.K., Bendahl P.-O., Saal L.H., Laakso M., Hegardt C., Edén P., Peterson C., Malmström P., Isola J., Borg Å., Fernö M. Estrogen receptor β expression is associated with tamoxifen response in ER α -negative breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2007, vol. 13, no. 7, pp. 1987–1994. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1823>.
7. Howell A., Cuzick J., Baum M., Buzdar A., Dowsett M., Forbes J.F., Hoctin-Boes G., Houghton J., Locker G.Y., Tobias J.S. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet*, 2005, vol. 365, no. 9453, pp. 60–62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17666-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17666-6).
8. Heringa M. Review on raloxifene: Profile of a selective estrogen receptor modulator. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 2003, vol. 41, no. 8, pp. 331–345. <https://doi.org/10.5414/cpp41331>.
9. Bryant H.U., Glasebrook A.L., Yang N.N., Sato M. An estrogen receptor basis for raloxifene action in bone. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1999, vol. 69, nos. 1–6, pp. 37–44. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(98\)00147-2](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(98)00147-2).
10. Brzozowski A.M., Pike A.C.W., Dauter Z., Hubbard R.E., Bonn T., Engström O., Öhman L., Greene G.L., Gustafsson J.-Å., Carlquist M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 1997, vol. 389, no. 6652, pp. 753–758. <https://doi.org/10.1038/39645>.
11. Martinkovich S., Shah D., Planey S.L., Arnott J. Selective estrogen receptor modulators: Tissue specificity and clinical utility. *Clin. Interventions Aging.*, 2014, vol. 9, pp. 1437–1452. <https://doi.org/10.2147/CIA.S66690>.

12. Liu H., Park W.-C., Bentrem D.J., McKian K.P., de Los Reyes A., Loweth J.A., Schafer J.M., Zapf J.W., Jordan V.C. Structure-function relationships of the raloxifene-estrogen receptor- α complex for regulating transforming growth factor- α expression in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, no. 11, pp. 9189–9198. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108335200>.
13. Weatherman R.V., Clegg N.J., Scanlan T.S. Differential SERM activation of the estrogen receptors (ER α and ER β) at AP-1 sites. *Chem. Biol.*, 2001, vol. 8, no. 5, pp. 427–436. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00025-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00025-4).
14. PolarScreen™ ER Alpha Competitor Assay, Red. User manual. Publ.: MAN0009428. Rev.: A.0. URL: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FpolarScreen_er_alpha_red_man.pdf.
15. Lin A.H.Y., Li R.W.S., Ho E.Y.W., Leung G.P.H., Leung S.W.S., Vanhoutte P.M., Man R.Y.K. Differential ligand binding affinities of human estrogen receptor- α isoforms. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 4, art. e63199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063199>.
16. Blair R.M., Fang H., Branham W.S., Hass B.S., Dial S.L., Moland C.L., Tong W., Shi L., Perkins R., Sheehan D.M. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands. *Toxicol. Sci.*, 2000, vol. 54, no. 1, pp. 138–153. <https://doi.org/10.1093/toxsci/54.1.138>.
17. Radin D.P., Patel P. Delineating the molecular mechanisms of tamoxifen's oncolytic actions in estrogen receptor-negative cancers. *Eur. J. Pharmacol.*, 2016, vol. 781, pp. 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.04.017>.

Для цитирования: Бондарь О.В., Карут Р., Мостовая О.А., Пугачев М.В., Иксанова А.Г., Штырлин Ю.Г. Аффинность к эстрогеновому рецептору α (ER α) производного транс-стильбена, содержащего фрагмент пиридоксина // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2024. Т. 166, кн. 2. С. 255–265. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.255-265>.

For citation: Bondar O.V., Karut R., Mostovaya O.A., Pugachev M.V., Iksanova A.G., Shtyrin Yu.G. Affinity for estrogen receptor α (ER α) in a *trans*-stilbene derivative containing a pyridoxine fragment. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2024, vol. 166, no. 2, pp. 255–265. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.255-265>. (In Russian)