

Исследование противоопухолевой активности четырёх новых производных фенилпиразолотриазина *in vitro* при изучении цитотоксичности и цитостатичности на культурах клеток рака молочной железы

*А. Х. ХУМАИРИ^{1,2}, В. В. НОВОЧАДОВ³

¹ ФБУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», Волгоград, Россия

² ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия

³ ФГАОУ ВО «Волгоградский государственный университет», Волгоград, Россия

Резюме

Актуальность. В работе представлены результаты изучения новых производных фенилпиразолотриазина с целью установления возможности их использования в качестве противоопухолевых средств, в том числе для химиотерапии рака молочной железы (РМЖ). Актуальность работы обусловлена широким распространением онкологических заболеваний и высокой смертностью от РМЖ, что диктует необходимость постоянной разработки новых противоопухолевых препаратов. **Цель исследования.** Скрининг противоопухолевого потенциала четырёх новых производных фенилпиразолотриазина путём тестирования их цитотоксической (ЦТА) и цитостатической (ЦСА) активности на культурах клеток РМЖ. **Материал и методы.** Культивирование клеток MCF-7, MDAMB231, BT474 и MCF-10a и определение ЦТА и ЦСА производных фенилпиразолотриазина в концентрациях от 0,25 до 10,0 ммоль/л. **Результаты.** Для культуры MCF-7 максимальное подавление выживаемости клеток (МПВ) препарата сравнения темозоломида было равно 2,44, а концентрация, вызывающая 50% гибель клеток (IC₅₀) — 6,81 мм/л, для других культур показатели ЦТА были несколько ниже. Фенилпиразолотриазин 3 продемонстрировал активность ниже темозоломида, IC₅₀ в большинстве достигнут не был. Это производное было классифицировано как соединение с низкой ЦТА и умеренной ЦСА. Фенилпиразолотриазины 1 и 4 проявили более высокую активность, чем у препарата сравнения, и были классифицированы как соединения с низкой или умеренной ЦТА и умеренной ЦСА. Наконец, фенилпиразолотриазин 2 с МПВ 3,70 и IC₅₀ 1,66 ммоль/л показал максимально высокие значения ЦТА и ЦСА. **Заключение.** По результатам исследования *in vitro* четыре новых производных фенилпиразолотриазина могут быть расположены по возрастанию совокупности ЦТА и ЦСА в порядке: фенилпиразолотриазин 3 < темозоломид < фенилпиразолотриазин 1, фенилпиразолотриазин 4 < фенилпиразолотриазин 2. Таким образом, 3-(3'-Фенил-4'-метоксикарбонил-изоксазолил)-7-(п-толил)пиразоло[5,1-с][1,2,4]-триазин (фенилпиразолотриазин 2) является безусловным лидером в протестированной серии новых производных имидазотриазина и рекомендуется для дальнейших доклинических исследований.

Ключевые слова: фенилпиразолотриазин; цитотоксическая активность; цитостатическая активность; рак молочной железы; клеточная линия MCF-7; клеточная линия MDAMB231; клеточная линия BT474; клеточная линия MCF-10a

Для цитирования: Хумаири А. Х., Новочадов В. В. Исследование противоопухолевой активности четырёх новых производных фенилпиразолотриазина *in vitro* при изучении цитотоксичности и цитостатичности на культурах клеток рака молочной железы. *Антибиотики и химиотер.* 2025; 70 (7–8): 19–27. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2025-70-7-8-19-27>. EDN: XNQQIZ.

Analysis of the Antitumor Activity of Four New Phenylpyrazolotriazine Derivatives *In Vitro* in a Cytotoxicity and Cytostatic Study on Breast Cancer Cell Cultures

*AHMED H. AL-HUMAIRI^{1,2}, VALERIY V. NOVOCHADOV²

¹ Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

² National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

³ Volgograd State University, Volgograd, Russia

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: ahmed.h.mneahil@gmail.com



EDN: XNQQIZ

*Correspondence to:
E-mail: ahmed.h.mneahil@gmail.com



Abstract

Background. The work presents the results of a study of new phenylpyrazolotriazine derivatives in order to establish their potential use as anticancer agents, including for chemotherapy of metastatic breast cancer. The relevance of the work is due to the widespread prevalence of oncological diseases and high breast cancer mortality, which dictate the need for the continuous development of new antitumor drugs. **The aim of the study.** Screening of the antitumor potential of four new phenylpyrazolotriazine derivatives by testing their cytotoxic (CTA) and cytostatic (CSA) activity on breast cancer cell cultures. **Materials and methods.** The base methods used in this study are the culturing of MCF-7, MDAMB231, BT474, and MCF-10a cells, as well as determining the CTA and CSA activity of four new phenylpyrazolotriazine derivatives at concentrations from 0.25 to 10.0 mM/L. **Results.** For the MCF-7 culture, the maximum cell viability inhibition of the comparison drug temozolomide was equal to 2.44 and the concentration causing 50% cell death (IC_{50}) was 6.81 mM/L; for other cultures, CTA indicators were lower. Phenylpyrazolotriazine 3 demonstrated lower activity compared to temozolomide, IC_{50} was not achieved in most cases. This derivative has been classified as a compound with low CTA and moderate CSA. Phenylpyrazolotriazines 1 and 4 showed higher activity than the comparison drug and were classified as compounds with low or moderate CTA and moderate CSA. Finally, phenylpyrazolotriazine 2 with a maximum cell viability inhibition of 3.70 and IC_{50} of 1.66 mM/L showed the highest values of CTA and CSA. **Conclusion.** According to the results of the *in vitro* study, four new phenylpyrazolotriazine derivatives can be evaluated in ascending order of the CTA and CSA combination: phenylpyrazolotriazine 3 < temozolomide < phenylpyrazolotriazines 1 and 4 < phenylpyrazolotriazine 2. Thus, 3-(3'-Phenyl-4'-methoxycarbonyl-isoxazolyl)-7-(p-tolyl)-pyrazolo[5,1-c][1,2,4]triazine (phenylpyrazolotriazine 2) is the undisputed leader in the tested series of new imidazotriazine derivatives and is recommended for further preclinical trials.

Keywords: phenylpyrazolotriazine; cytotoxic activity; cytostatic activity; breast cancer; MCF-7 cell line; MDAMB231 cell line; BT474 cell line; MCF-10a cell line

For citation: Al-Humairi A. H., Novochadov V. V. Analysis of the antitumor activity of four new phenylpyrazolotriazine derivatives *in vitro* in a cytotoxicity and cytostatic study on breast cancer cell cultures. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2025; 70 (7–8): 19–27. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2025-70-7-8-19-27>. EDN: XNQQIZ. (in Russian)

Введение

Среди онкологических заболеваний рак молочной железы (РМЖ) занимает отдельное место, доминируя как по масштабам распространённости, смертности, так и выделяясь комплексом не только медицинских, но социальных и экономических задач, предъявляемых человечеству. В настоящий момент РМЖ составляет свыше 12% онкологической заболеваемости женщин, в мире от него ежегодно умирает почти 700 тыс. женщин [1–3]. Основой химиотерапии РМЖ по-прежнему остаются алкилирующие агенты, и они становятся методом выбора в лечении метастатических форм заболевания.

Среди множества мишеней воздействия алкилирующих агентов, к которым в клетках и межклеточном веществе относятся разнообразные белки, нуклеиновые кислоты, липиды, радикальной для противоопухолевых препаратов становится их способность атаковать атомы кислорода и азота пуриновых и пиримидиновых оснований с последующим разрывом информационной молекулы и прекращением транскрипции. Бифункциональные алкилирующие агенты за счёт образования межцепочечных перекрёстных связей вызывают наиболее серьёзные повреждения ДНК и РНК.

Разрывы одноцепочечных молекул, образующихся в период репликации ДНК и одноцепочечных молекул РНК, спонтанно или под влиянием эндонуклеаз, приводят к необратимой супрессии транскрипции и биосинтеза белка, что в итоге приводит клетки к гибели, тем более вероятной, чем больший пролиферативный потенциал они имеют. Наличие других мишеней алкилирования, таких как ферменты и транспортные белки мембран, предопределяет неизбежное повреждение

нормальных клеток организма и возникновение тяжёлых побочных эффектов [4–6].

Проблема химиотерапии РМЖ, как и большинства злокачественных новообразований человека, заключается в крайне высоком генетическом и морфологическом разнообразии вариантов опухоли [7, 8], а также в динамичности их трансформации, которая в том числе предопределяет формирование химиорезистентности. Это, собственно, и является ведущим посылом к постоянной разработке новых лекарственных средств для борьбы с этим заболеванием [9–11].

В последнее время мы изучаем широкий спектр потенциальных противоопухолевых препаратов на основе производных азолоазинов. Наиболее известным из них является темозоломид, производное имидазотетразина [12]. К сожалению, на настоящий момент большинство опухолей резистентны к этому препарату [13]. Первым этапом отбора перспективных веществ для доклинических исследований является определение их цитотоксической (ЦТА) и цитостатической (ЦСА) активности на опухолевых и неопухолевых клетках эпителия молочной железы [14]. Следующим этапом становится отбор наиболее перспективных веществ, и здесь необходимо тщательно подходить к выбору нескольких наиболее подходящих клеточных линий [15].

В предыдущих исследованиях мы описали цитотоксическую и цитостатическую активность пяти новых производных имидазотетразина, — был выбран один лидер для дальнейшего исследования и пяти производных имидазотриазина — было выбрано одно производное для доклинических исследований в качестве противоопухолевого средства [16, 17]. Согласно публикациям

в области разработки лекарственных средств, не все химические соединения, показавшие эффективность в доклинических исследованиях, демонстрируют эффективность на пациентах в клинических исследованиях в связи с быстрым развитием опухолей.

Тем самым появляется необходимость синтезировать несколько групп из данного класса химических соединений, что и было осуществлено учёными Волгоградского государственного медицинского университета совместно с НИИ онкологии, НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга Томского НИМЦ в рамках проекта по разработке противоопухолевого средства, обладающего цитотоксичным и цитостатическим механизмом действия, из класса алкилирующих агентов — представителей групп имидазотетразина, имидазотриазина и фенилпиразолотриазина. Настоящее исследование посвящено тестированию производных фенилпиразолотриазина, поскольку, по данным научной литературы, производные этой группы обладают более высокой токсичностью в отношении клеточных моделей по причине их нестабильности и потенциально имеют более оптимальные фармакокинетические характеристики, поэтому актуален синтез новых производных фенилпиразолотриазина со стабильным химическим составом и тестирование их эффективности против клеток РМЖ [18–20].

Цель исследования — оценить потенциал четырёх новых производных фенилпиразолотриазина в качестве возможных противоопухолевых препаратов путём изучения их ЦТА и ЦСА активности на линиях опухолевых и неопухолевых клеток эпителия молочной железы (для сведения: карциномы — опухоли из клеток эпителия, саркомы — клеток соединительной ткани).

Материал и методы

В работе исследовано четыре производных фенилпиразолотриазина: диэтиловый эфир 3-(3'-Фенил-4'-метоксикарбонил-изоксазол-7-фенилпиразоло [5,1-с][1,2,4] триазин (фенилпиразолотриазин 1); 3-(3'-Фенил-4'-метоксикарбонил-изоксазол-7-(п-толил) пиразоло [5,1-с][1,2,4] триазин (фенилпиразолотриазин 2); 3-(3'-Фенил-4'-метоксикарбонил-изоксазол-7-(п-метоксифенил) пиразоло [5,1-с][1,2,4] триазин (фенилпиразолотриазин 3); 3-(3'-Фенил-4'-метоксикарбонил-изоксазол-7-(п-хлорфенил) пиразоло [5,1-с][1,2,4] триазин (фенилпиразолотриазин 4). Синтез этих соединений был осуществлён на кафедре технологии органического синтеза Уральского федерального университета имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, сотрудники которой любезно предоставили их для исследования [21, 22]. Темозоломид был использован в качестве препарата сравнения.

Исследование проводили на трёх линиях клеток РМЖ человека [15, 23]. MCF-7 — самая популярная линия клеток РМЖ, клетки люминального типа содержат рецепторы эстрогена и прогестерона, рецепторы HER2 отсутствуют. MDA-MB-231 — клетки тройного негативного РМЖ базального типа, эта линия является идеальной моделью для изучения новых препаратов в химиотерапии РМЖ. Клетки BT474 являются тройной по-

ложительной моделью люминального типа РМЖ с наиболее неблагоприятным клиническим прогнозом. Клетки линии MCF-10a являются нормальными и получены из люминального эпителия молочной железы человека. Эта линия используется в качестве контроля воздействия исследуемых веществ на здоровые ткани.

После размораживания клеток их дважды отмывали в растворе Хенкса, после чего центрифугировали 5 мин при 500 g и после ресуспендирования помещали во флаконы ёмкостью 10 мл по 10^6 клеток. Далее проводили культивирование в CO_2 -инкубаторе на среде Eagle MEM/DMEM с добавлением 1% глутамина, смеси антибиотиков (по 1% стрептомицина и пенициллина) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки производства ПанЭко (Россия) при температуре 37°C до получения монослоя. По завершении культивирования среду удаляли, а клетки переводили в суспензию 0,25% раствором трипсин-ЭДТА, центрифугировали 5 мин при 500 g, вновь ресуспендировали в питательной среде и помещали на 96-луночные планшеты из расчёта 10^4 клеток на лунку.

Для определения ЦТА использовали классический метилтетразолиевый тест [24]. Исследуемые производные и препарат сравнения добавляли в лунки в конечных концентрациях 0,25; 1,0; 2,5; 5,0 и 10,0 мкмоль/л, использовали отрицательный контроль в виде 1% ДМСО и положительный контроль в виде 10% ДМСО. После проведения реакции проводили фотометрию на планшетном фотометре MARK (BioRad, США) и рассчитывали выживаемость клеток как отношение оптической плотности образца и контроля и максимальное подавление выживаемости клеток (МПВ) как отношение оптической плотности в контроле к минимальной оптической плотности в эксперименте. Концентрацию вещества, вызывающего 50% гибель клеток (IC_{50} , мкмоль/л) рассчитывали, используя программное обеспечение Origin (OriginLab Corporation, США).

Для определения ЦСА использовали аналогичный протокол, но для первоначального выращивания высевали в 96-луночные планшеты по 5000 клеток, общее время тестирования составляло 72 ч. Жизнеспособность клеток определяли как отношение оптической плотности в лунках с тестируемыми соединениями и в контрольных лунках.

Статистические методы. После исключения нормального характера распределения в тесте Шапиро-Уилка данные были представлены в виде медианы и квартилей (Me [$\text{Q1} \div \text{Q3}$]). Внутригрупповой сравнительный анализ проводился по критерию Краскела-Уоллиса, сравнение между группами — по критерию Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для анализа использовался пакет программ Statistica 12.0 (Dell, США).

Результаты и обсуждение

Темозоломид снижал жизнеспособность клеток во всех используемых культурах дозозависимым образом, МПВ наблюдалось при концентрации 10,0 ммоль/л и составило 2,44 для линии MCF-7; 1,63 — для линии MDA-MB-231; 1,82 — для линии Bt-474 и 1,45 — для линии неопухолевых клеток MCF-10a.

Рассчитанный IC_{50} оказался равным 6,81 ммоль/л на культуре клеток MCF-7, в других случаях он превышал концентрацию в 10,0 ммоль/л. Жизнеспособность клеток после введения препарата во всех опухолевых культурах варьировала в пределах от 0,76–0,83 при концентрации 0,25 ммоль/л до 0,46–0,55 при концентрации 10,0 ммоль/л и оставалась на более высоком уровне в культуре MCF-10a. Таким образом, темозоломид продемонстрировал умеренную ЦТА и ЦСА в отношении

Таблица 1. Цитотоксическая и цитостатическая активность темозоломида
Table 1. Cytotoxic and cytostatic activity of temozolomide

Показатель	Клеточная линия			
	MCF-7	MDA-MB-231	Bt-474	MCF-10a
Минимальная выживаемость клеток (действующая концентрация, ммоль/л)	0,41*# [0,36÷0,45] (10,0)	0,61* [0,55÷0,68] (10,0)	0,55* [0,48÷0,61] (10,0)	0,69* [0,62÷0,75] (10,0)
Минимальная жизнеспособность клеток (действующая концентрация, ммоль/л)	0,55* [0,48÷0,60] (10,0)	0,54* [0,48÷0,60] (10,0)	0,46*# [0,39÷0,51] (10,0)	0,69 [0,62÷0,77] (10,0)

Примечание. Здесь и табл. 2–5: * — статистически значимые различия со значениями в контрольных образцах (принятых за единицу); # — различия между значениями в культурах опухолевых и неопухолевых клеток.

Note. Here and in Tables 2–5: * — the sign indicates statistically significant differences with the values in the control samples (taken as 1); # — the sign indicates differences between the values in the cultures of tumor and non-tumor cells.

Таблица 2. Цитотоксическая и цитостатическая активность фенилпиразолотриазина 1
Table 2. Cytotoxic and cytostatic activity of phenylpyrazolotriazine 1

Показатель	Клеточная линия			
	MCF-7	MDA-MB-231	Bt-474	MCF-10a
Минимальная выживаемость клеток (действующая концентрация, ммоль/л)	0,75* [0,68÷0,84] (5,0)	0,48*# [0,43÷0,54] (10,0)	0,37*# [0,32÷0,41] (10,0)	0,66* [0,59÷0,73] (5,0)
Минимальная жизнеспособность клеток (действующая концентрация, ммоль/л)	0,38*# [0,33÷0,42] (10,0)	0,37*# [0,33÷0,41] (10,0)	0,35*# [0,31÷0,40] (10,0)	0,57* [0,50÷0,63] (10,0)

опухолевых клеток и низкую активность — в отношении неопухолевых клеток (табл. 1).

Для фенилпиразолотриазина 1 не было отмечено ЦТА в культуре клеток MCF-7 до концентрации 5 мкмоль/л, когда регистрировали максимальное подавление, равное 1,34. В максимальной исследуемой дозе токсический эффект достоверно не проявлялся. Концентрация, при которой была отмечена гибель половины клеток (IC_{50}) прогнозировалась значительно выше 10 мкмоль/л. Итогом этой части исследования стало заключение об отсутствии ЦТА производного. МПВ клеток при исследовании фенилпиразолотриазина 1 было достигнуто при концентрации 10,0 мкмоль/л, и это в 1,45 раза превышало эффект препарата сравнения. Как итог, сделано заключение об умеренной ЦСА соединения в отношении опухолевых клеток линии MCF-7.

При исследовании фенилпиразолотриазина 1 был обнаружен достоверный эффект в отношении опухолевых клеток линии MDA-MB-231. МПВ составило 2,08 при концентрации, равной 10,0 мкмоль/л. IC_{50} составила 7,28 мкмоль/л. По итогам исследования фенилпиразолотриазин 1 был отнесён к веществам с умеренной цитотоксичностью в отношении клеток линии MDA-MB-231. Минимальная жизнеспособность клеток была достигнута при концентрации 10,0 мкмоль/л на уровне 0,37 от контроля, эффект дозозависимости присутствовал, что в итоге привело к заключению об умеренной ЦСА фенилпиразолотриазина 1 в отношении клеток линии MDA-MB-231.

Соединение демонстрировало умеренную ЦТА в диапазоне исследованных концентраций

в отношении линии клеток Bt-474: МПВ составило 2,71 при концентрациях 5,0 и 10 мкмоль/л, IC_{50} — 4,33 мкмоль/л. ЦСА находилась в пределах от 0,45 до 0,25 в зависимости от концентрации исследуемого соединения, что в целом расценено как высокая активность фенилпиразолотриазина 1 в отношении опухолевых клеток линии Bt-474.

ЦТА в отношении неопухолевых клеток линии MCF 10a на всём диапазоне исследованных концентраций была низкой. МПВ составило 1,52 при концентрации фенилпиразолотриазина 1, равной 5,0 мкмоль/л. Расчётная IC_{50} в исследуемом диапазоне концентрации не была достигнута, то есть была выше 10 мкмоль/л. ЦСА вещества, определённая по проценту жизнеспособных клеток в культуре находилась в пределах от 0,75 до 0,57 в зависимости концентрации, что в целом расценено как низкий ЦСА в отношении неопухолевых клеток линии MCF 10a (табл. 2).

Фенилпиразолотриазин 2 показал цитотоксичность в отношении культуры клеток MCF-7. МПВ составило 1,35 при концентрации 10 мкмоль/л, а расчётная IC_{50} — значительно выше 10 мкмоль/л. Как итог, было высказано заключение о низкой ЦТА этого соединения. Определение жизнеспособности клеток показало, что минимальное её значение наблюдается при концентрации 10,0 мкмоль/л, когда она в 2,12 раза ниже величины показателя при тестировании препарата сравнения, присутствуют признаки дозозависимости. Это расценено как высокая ЦСА фенилпиразолотриазина 2 в отношении культуры клеток MCF-7.

Производное продемонстрировало умеренный ЦТА в отношении клеток линии MDA-MB-231

Таблица 3. Цитотоксическая и цитостатическая активность фенилпиразолотриазина 2
Table 3. Cytotoxic and cytostatic activity of phenylpyrazolotrazine 2

Показатель	Клеточная линия			
	MCF-7	MDA-MB-231	Bt-474	MCF-10a
Минимальная выживаемость клеток (действующая концентрация, ммоль/л)	0,74* [0,67÷0,83] (10,0)	0,42*# [0,36÷0,48] (10,0)	0,27*# [0,22÷0,30] (10,0)	0,59* [0,52÷0,67] (10,0)
Минимальная жизнеспособность клеток (действующая концентрация, ммоль/л)	0,26* [0,22÷0,29] (10,0)	0,25* [0,22÷0,29] (10,0)	0,24* [0,21÷0,27] (10,0)	0,51* [0,44÷0,56] (10,0)

на всём диапазоне исследованных концентраций без признаков дозозависимости. МПВ составило 2,38 при концентрации фенилпиразолотриазина 2, равной 10,0 мкмоль/л. Расчётная IC_{50} в исследуемом диапазоне концентраций составила 5,10 мкмоль/л. Жизнеспособность клеток оказалась в 2,16 раза меньше, чем при аналогичном тестировании препарата сравнения, эффект дозозависимости был выраженным. По итогам исследования сделано заключение о высокой ЦСА фенилпиразолотриазина 2 в отношении клеток линии MDA-MB-231.

Фенилпиразолотриазин 2 в дозозависимой манере снижал выживаемость клеток Bt-474 во всём диапазоне исследованных концентраций. МПВ составило 3,70 при концентрациях 5,0 и 10 мкмоль/л, IC_{50} составила 1,66 мкмоль/л, что в итоге привело к заключению о высокой активности тестируемого соединения в отношении опухолевых клеток линии Bt-474. ЦСА вещества, определённая по проценту жизнеспособных клеток в культуре, находилась в пределах от 0,45 до 0,25 в зависимости от концентрации исследуемого соединения, что в целом расценено как высокая активность фенилпиразолотриазина 2 в отношении опухолевых клеток линии Bt-474.

Производное незначительно снижало жизнеспособность клеток линии MCF 10a с дозозависимым эффектом. МПВ составляло 1,69 при концентрации 10,0 мкмоль/л, концентрация половинного торможения IC_{50} в исследуемом диапазоне концентраций так и не была достигнута. Максимальное подавление жизнеспособности клеток при исследовании фенилпиразолотриазина 2 было достигнуто при концентрации 10,0 мкмоль/л, когда оно в 1,35 раза превышало величину показателя у препарата сравнения. Как итог, сделано заключение о низкой ЦТА и умеренной ЦСА соединения в отношении неопухолевых клеток линии MCF 10a (табл. 3).

При исследовании производного фенилпиразолотриазин 3 не было обнаружено цитотоксического эффекта в отношении линии опухолевых клеток MCF-7. МПВ составило 1,12 при концентрации фенилпиразолотриазина 3, равной 10,0 мкмоль/л. Концентрация половинного торможения IC_{50} лежала за пределами исследуемого диапазона концентраций. В тесте на жизнеспособность клеток

она дозозависимо снижалась от 0,74 при концентрации 0,25 мкмоль/л до 0,39 при концентрации 10,0 мкмоль/л. В итоге, фенилпиразолотриазин 3 был отнесён к веществам с отсутствием цитотоксичности, и умеренной ЦСА в отношении клеток линии MCF-7.

Производное 3 практически не снижало выживаемости клеток линии MDA-MB-231 в исследованном диапазоне концентраций, зависимость от дозы отсутствовала. МПВ было достигнуто при концентрации 5,0 мкмоль/л и составило всего 1,23. Соответственно, IC_{50} для фенилпиразолотриазина 3 лежала за пределами исследованного диапазона концентрации, то есть была ниже 10 мкмоль/л. Производное было отнесено к соединениям с крайне низкой ЦТА в отношении клеток линии MDA-MB-231. Минимальная жизнеспособность клеток была достигнута при концентрации 10,0 мкмоль/л, когда она была в 1,46 раза ниже, чем при аналогичной концентрации препарата сравнения. Эффект дозозависимости присутствовал, что в итоге привело к заключению об умеренной ЦСА производного в отношении клеток линии MDA-MB-231.

Фенилпиразолотриазин 3 вызывал снижение выживаемости клеток Bt-474 в исследованном диапазоне концентраций, с умеренно выраженным дозозависимым эффектом. МПВ составило 2,00 при концентрации 10,0 мкмоль/л, IC_{50} — 8,67 мкмоль/л. Определение жизнеспособности клеток показало, что минимальное её значение (0,36 от контроля) наблюдается при концентрации 10,0 мкмоль/л, присутствует эффект дозозависимости. Общее заключение: фенилпиразолотриазин 3 отнесён к соединениям с низкой ЦТА и умеренной ЦСА в отношении культуры клеток Bt-474.

Производное 3 незначительно снижало жизнеспособность неопухолевых клеток линии MCF 10a в исследованном диапазоне концентраций, не проявляя дозозависимый эффект. МПВ составляло 1,47 при концентрации 10,0 мкмоль/л, IC_{50} достигнута не была. Максимальное подавление жизнеспособности клеток для фенилпиразолотриазина 3 было достигнуто при концентрации 10,0 мкмоль/л, оно было сопоставимо с эффектом препарата сравнения. В итоге, сделано заключение об умеренной ЦТА и низкой ЦСА

Таблица 4. Цитотоксическая и цитостатическая активность фенилпиразолотриазина 3
Table 4. Cytotoxic and cytostatic activity of phenylpyrazolotriazine 3

Показатель	Клеточная линия			
	MCF-7	MDA-MB-231	Bt-474	MCF-10a
Минимальная выживаемость клеток (действующая концентрация, ммоль/л)	0,89 [#] [0,80÷1,00] (10,0)	0,81 [#] [0,72÷0,91] (5,0)	0,50 ^{*#} [0,44÷0,57] (10,0)	0,56 [*] [0,49÷0,62] (5,0)
Минимальная жизнеспособность клеток (действующая концентрация, ммоль/л)	0,39 ^{*#} [0,35÷0,44] (10,0)	0,37 ^{*#} [0,33÷0,41] (10,0)	0,36 ^{*#} [0,33÷0,40] (10,0)	0,75 [*] [0,68÷0,84] (10,0)

Таблица 5. Цитотоксическая и цитостатическая активность фенилпиразолотриазина 4
Table 5. Cytotoxic and cytostatic activity of phenylpyrazolotriazine 4

Показатель	Клеточная линия			
	MCF-7	MDA-MB-231	Bt-474	MCF-10a
Минимальная выживаемость клеток (действующая концентрация, ммоль/л)	0,56 ^{*#} [0,49÷0,62] (2,5)	0,60 ^{*#} [0,54÷0,67] (10,0)	0,37 ^{*#} [0,33÷0,41] (10,0)	0,77 [*] [0,68÷0,85] (10,0)
Минимальная жизнеспособность клеток (действующая концентрация, ммоль/л)	0,41 ^{*#} [0,35÷0,45] (10,0)	0,40 ^{*#} [0,35÷0,44] (10,0)	0,37 ^{*#} [0,34÷0,41] (10,0)	0,67 [*] [0,60÷0,75] (10,0)

соединения в отношении неопухолевых клеток линии MCF 10a (табл. 4).

Фенилпиразолотриазин 4, как показано в табл. 5, в изученном диапазоне концентраций снижал выживаемость опухолевых клеток линии MCF-7. МПВ составило 1,54 при концентрации 2,5 мкмоль/л, а расчётная концентрация половинного торможения IC₅₀ оказалась значительно выше 10 мкмоль/л. Как итог, было высказано заключение о низкой ЦТА этого соединения в отношении клеток линии MCF-7. Определение жизнеспособности клеток показало, что минимальное её значение наблюдается при концентрации 10,0 мкмоль/л, и оно при этом оказывается в 1,34 ниже, чем при действии препарата сравнения, активность тестируемого соединения зависит от дозы, что соответствует его умеренной ЦСА в отношении культуры опухолевых клеток MCF-7.

Производное снижало выживаемость клеток линии MDA-MB-231 во всём диапазоне исследуемых концентраций, дозозависимый эффект присутствовал. МПВ составляло 1,66 при концентрации 10,0 мкмоль/л, концентрация половинного торможения IC₅₀ в исследуемом диапазоне концентраций так и не была достигнута. Эффект соединения в отношении опухолевых клеток линии MDA-MB-231 был низкий. Процент жизнеспособных клеток в культуре находился в пределах от 0,88 до 0,40 с выраженной зависимостью от концентрации фенилпиразолотриазина 4, что в целом расценено как умеренный ЦСА в отношении клеток линии MDA-MB-231.

Фенилпиразолотриазин 4 продемонстрировал умеренную ЦТА в культуре клеток Bt-474 в дозозависимой манере с МПВ клеток, равным 2,70 при концентрации тестируемого соединения 10,0 мкмоль/л, IC₅₀ составила 4,45 мкмоль/л.

Определение жизнеспособности клеток показало, что минимальное её значение наблюдается при концентрации производного 10,0 мкмоль/л с ярко выраженной зависимостью «доза — эффект», это снижение по амплитуде в 1,24 раза больше, чем у препарата сравнения, что соответствует умеренной ЦСА соединения в отношении культуры клеток Bt-474.

Производное 4 незначительно снижало выживаемость неопухолевых клеток линии MCF 10a без признаков зависимости от концентрации. МПВ было достигнуто при концентрации 10,0 мкмоль/л и составило 1,29. Расчётная IC₅₀ не была достигнута. Соединение отнесено к веществам с низкой цитотоксичностью в отношении неопухолевых клеток линии MCF 10a. В тесте на ЦСА жизнеспособность клеток варьировала от 0,90 при концентрации 0,25 мкмоль/л до 0,67 при концентрации 10,0 мкмоль/л, дозозависимый эффект присутствовал. Общее заключение: низкая ЦТА и ЦСА фенилпиразолотриазина 4 в отношении неопухолевых клеток линии MCF 10a.

Настоящее исследование показало, во-первых, что использование ароматических заместителей в молекуле азолотриазина не устраняет её цитотоксических и цитостатических свойств в отношении малигнизированных клеток. Все четыре тестируемых соединения демонстрировали в той или иной степени эти эффекты, но абсолютные значения показателей варьировали в очень широком диапазоне. ЦТА и ЦСА фенилпиразолотриазин 1, 2 и 4 превышала аналогичные значения для препарата сравнения темозоламида, как полученных в данном исследовании, так и известным по данным литературы [13, 25].

Важно, что ЦТА и ЦСА исследуемых производных на нетрансформированные клетки линии

MCF-10a в большинстве случаев оказывались ниже, чем воздействие на культуры клеток РМЖ. В то же время цитотоксическое воздействие, хотя и не столь выраженное, имело место, что является основанием для прогнозирования побочных эффектов химиотерапии в случае использования этих соединений *in vivo*, и в будущем сделает необходимым разработку мероприятий по снижению этой токсичности.

Сопоставление ЦТА тестируемых производных в отношении отдельных клеточных линий показало, что минимальная активность была выявлена в отношении клеток линии MCF-7, что было расценено как снижение цитотоксических эффектов азолотриазина при использовании ароматических заместителей в отношении этой линии клеток. Максимальная ЦТА была выявлена в отношении клеток линии BT474. Фенилпиразолотриазин 1 и фенилпиразолотриазин 4 превышали по этой способности темозоламид в 1,49 раза, фенилпиразолотриазин 2 — в 2,04 раза, а фенилпиразолотриазин 3 имел сходную ЦТА с препаратом сравнения. Выявленный факт весьма ценен, поскольку именно химиотерапия тройного негативного РМЖ является наиболее проблемной для этой области клинической онкологии [26, 27].

При анализе результатов определения ЦСА были получены несколько иные взаимоотношения. Активность каждого тестируемого соединения в отношении клеток РМЖ варьировала в очень узком диапазоне и во всех случаях была выше, чем в отношении неопухолевых клеток линии MCF 10a, превышая последнюю в 1,50–2,13 раза. ЦСА фенилпиразолотриазин 1 и 3 была выше величины показателя для темозоломида в 1,45 раза, активность фенилпиразолотриазина 2 — в 2,12 раза, фенилпиразолотриазина 4 — в 1,34 раза.

Можно выделить как минимум три основных фактора, определяющих различия в химиотерапевтической активности гомологичных соединений: различия фармакокинетики и распределения в организме, способность проникать в клетки-мишени и особенности взаимодействия с таргетными молекулами. Второй фактор безусловно связан с типом использованных клеточных линий РМЖ, тогда как фармакокинетические характеристики и степень повреждения ДНК — с остальными, в том числе с использованием производных, образованных путём включения в молекулу ароматических заместителей. Полученные данные хорошо согласуются с результатами изучения других алкилирующих соединений [5, 28, 29] и подтверждают важную роль описанных механизмов в реализации фармакологических эффектов этих производных азолотриазина.

Что касается значимости полученных данных, необходимо повторить о том, что это не сугубо медицинская, а насущная социальная и экономическая проблема, и её решение на национальном

и мировом уровне отнесено к важнейшим аспектам охраны здоровья женщин [30]. Выбранный класс соединений привлекателен в связи с достаточно высокой противоопухолевой активностью, позволяющим лидерам успешно входить до настоящего времени в состав химиотерапевтических схем для лечения достаточно широкого спектра злокачественных новообразований.

Заключение

Исследование с использованием культур клеток РМЖ MCF-7, MDA-MB231 и BT474 и культуры неопухолевых клеток MCF-10a показало, что все взятые в эксперимент производные фенилпиразолотриазина обладают ЦТА и ЦСА и могут быть расположены в следующем порядке по возрастанию активности: фенилпиразолотриазин 3 < темозоломид < фенилпиразолотриазин 1, фенилпиразолотриазин 4 < фенилпиразолотриазин 2. Таким образом, 3-(3'-Фенил-4'-метоксикарбонил-изоксазол-7-ил)-5-метил-1H-пиразол-4-ил (фенилпиразолотриазин 2) является безусловным лидером в тестируемой серии новых производных азолотриазина. Дальнейшие исследования следует вести как в направлении расширения спектра клеточных линий для изучения ЦТА и ЦСА этого соединения, так в направлении изучения других его эффектов, таких как генотоксическая и метаболическая активность, а также на моделях трансплантации опухолевых клеток РМЖ человека на лабораторных животных. При получении убедительных доказательств его активности в этих экспериментах целесообразно рекомендовать это производное азолотриазина для дальнейших доклинических испытаний.

Дополнительная информация

Благодарности. Авторы выражают признательность чл.-корр. РАН, проф. В. В. Удугу (заведующему лабораторией физиологии, молекулярной и клинической фармакологии, заместителю директора по научной и лечебной работе НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук) за полезные обсуждения; также авторы признательны чл.-корр. РАН, проф. Н. В. Чердынцевой (заведующей лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии рака, заместителю директора по научной работе НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук) за предоставленные клеточные линии и материалы и их структурирование для последующего анализа.

Информация о финансировании. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Additional information

Acknowledgements. The authors express their gratitude to Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Prof. V. V. Udut (Head of the Laboratory of Physiology, Molecular and Clinical Pharmacology, Deputy Director for Scientific and Therapeutic Work of the E. D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences) for useful discussions; the au-

thors are also grateful to Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Prof. N. V. Cherdyntseva (Head of the Laboratory of Molecular Oncology and Cancer Immunology, Deputy Director for Scientific Work of the Research Institute of Oncology of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences) for provided cell lines and materials and their structuring for subsequent analysis.

Financial support. The authors declare a lack of funding.

Conflict of interests. The authors have no conflict of interest to declare.

Литература/References

1. Caswell-Jin J. L., Sun L. P., Munoz D. et al. Analysis of Breast Cancer Mortality in the US-1975 to 2019. *JAMA*. 2024; 331 (3): 233–241. doi: 10.1001/jama.2023.25881.
2. Sung H., Ferlay J., Siegel R. L. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer J Clin*. 2021; 71: 209–249. doi: 10.3322/caac.21660.
3. Wilkinson L., Gathani T. Understanding breast cancer as a global health concern. *British Journal of Radiology*. 2022; 95: 20211033. doi: https://doi.org/10.1259/bjr.20211033.
4. Maugeri S., Sibbitts J., Privitera A. et al. The anti-cancer activity of the naturally occurring dipeptide carnosine: Potential for breast cancer. *Cells*. 2023; 12 (22): 2592. doi: 10.3390/cells12222592.
5. Delahousse J., Molina L., Paci A. Cyclophosphamide and analogues; a matter of dose and schedule for dual anticancer activities. *Cancer Lett*. 2024; 598: 217119. doi: 10.1016/j.canlet.2024.217119.
6. Saito Y., Takekuma Y., Takahashi M. et al. Association of oral mucositis induced by anthracycline-cyclophosphamide and subsequent docetaxel treatment for perioperative breast cancer. *Support Care Cancer*. 2024; 32 (8): 513. doi: 10.1007/s00520-024-08733-7.
7. Roy M., Fowler A. M., Ulaner G. A., Mahajan A. Molecular classification of breast cancer. *PET Clinics*. 2023; 18 (4): 441–458. doi: 10.1016/j.cpet.2023.04.002.
8. Zhang Y., Chen F., Balic M., Creighton C. J. An essential gene signature of breast cancer metastasis reveals targetable pathways. *Breast Cancer Res*. 2024; 26 (1): 98. doi: 10.1186/s13058-024-01855-0.
9. Rositch A. E., Unger-Saldana K., DeBoer R. J. et al. The role of dissemination and implementation science in global breast cancer control programs: Frameworks, methods, and examples. *Cancer*. 2020; 126: 2394–2404. doi: 10.1002/cncr.32877.
10. Cao J., Zhang M., Wang B. et al. Chemoresistance and metastasis in breast cancer molecular mechanisms and novel clinical strategies. *Frontiers in Oncology*. 2021; 11: 658552. doi: 10.3389/fonc.2021.658552.
11. Will M., Liang J., Metcalfe C., Chandraratna S. Therapeutic resistance to anti-oestrogen therapy in breast cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2023; 23 (10): 673–685. doi: 10.1038/s41568-023-00604-3.
12. Moody C., Wheelhouse R. The medicinal chemistry of imidazotetrazine prodrugs. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2014; 7: 797–838. doi: 10.3390/ph7070797.
13. Zhu W., Zhang F., Wang M. et al. Temozolomide alleviates breast carcinoma via the inhibition of EGFR/ERK/ MMP-1 pathway with induction of apoptotic events. *Acta Cir Bras*. 2024 May 24; 39: e391624. doi: 10.1590/acb391624.
14. Кутаева К. В., Ризванов А. А., Соловьева В. В. Современные методы доклинического скрининга противоопухолевых препаратов с применением тест-систем на основе культур клеток. Учёные записки Казанского университета. Серия Естественные науки. 2021; 163 (2): 155–176. doi: https://doi.org/10.26907/2542-064X.2021.2.155-176. [Kutaeva K. V., Rizvanov A. A., Solov'eva V. V. Sovremennyye metody doklinicheskogo skringinga protivopukholevykh preparatov s primeneniem test-sistem na osnove kul'tur kletok. Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya Estestvennyye nauki. 2021; 163 (2): 155–176. doi: https://doi.org/10.26907/2542-064X.2021.2.155-176. (in Russian)]
15. Zhang R., Jiang Q., Zhuang Z. et al. A bibliometric analysis of drug resistance in immunotherapy for breast cancer: trends, themes, and research focus. *Front Immunol*. 2024; 15: 1452303. doi: 10.3389/fimmu.2024.1452303.
16. Хумаири А. Х., Сперанский Д. Л., Садчикова Е. В. Синтез и цитотоксическая активность новых производных азолотриазина при изучении на клеточных культурах. Химико-фармацевтический журнал. 2022; 56 (6): 17–22. doi: https://doi.org/10.30906/0023-1134-2022-56-6-17-22. [Khumairi A. Kh., Speranskij D. L., Sadchikova E. V. Sintez i tsitotoksicheskaya aktivnost' novykh proizvodnykh azolotriazina pri izuchenii na kletochnykh kul'turakh. Khimiko-Farmatsevticheskij Zhurnal. 2022; 56 (6): 17–22. doi: https://doi.org/10.30906/0023-1134-2022-56-6-17-22. (in Russian)]
17. Al-Humairi A. H., Sitnikova S. E., Novochadov V. V. Cytotoxic and cytostatic activity of five new imidazotetrazine derivatives on breast cancer cell cultures MDAMB231, BT474, and MCF-7. *Research Results in Pharmacology*. 2024; 10 (3): 17–26. doi: https://doi.org/10.18413/rpharmacology.10.479
18. Şeker Karatoprak G., Dumlupınar B., Çelep E. et al. A comprehensive review on the potential of coumarin and related derivatives as multi-target therapeutic agents in the management of gynecological cancers. *Front Pharmacol*. 2024; 15: 1423480. doi: 10.3389/fphar.2024.1423480.
19. Kumar S., Arora A., Sapra S. et al. Recent advances in the synthesis and utility of thiazoline and its derivatives. *RSC Advances*. 2024; 14 (2): 902–953. doi: 10.1039/d3ra06444a20.
20. Villa-Reyna A. L., Perez-Velazquez M., González-Félix M. L. et al. The structure-antiproliferative activity relationship of pyridine derivatives. *Int J Mol Sci*. 2024; 25 (14): 7640. doi: 10.3390/ijms25147640.
21. Sadchikova E. V., Mokrushin V. S. Interaction of 3,8-disubstituted imidazo[5,1-c][1,2,4]triazines with nucleophiles. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2014; 50 (7): 1014–1020. doi: https://doi.org/10.1007/s10593-014-1557-5.
22. Alexeeva D. L., Sadchikova E. V., Volkova N. N., et al. Reactivity of 3-substituted pyrazole-5-diazonium salts towards 3-azolyl enamines. *Synthesis of novel 3-azolylpyrazolo[5,1-c][1,2,4]triazines*. *Archive for Organic Chemistry*. 2016; IV: 114–129. doi: https://doi.org/10.3998/ark.5550190.p009.571.
23. Witt B. L., Tollefsbol T. O. Molecular, cellular, and technical aspects of breast cancer cell lines as a foundational tool in cancer research. *Life (Basel)*. 2023; 13 (12): 2311. doi: 10.3390/life13122311.
24. Stockert J. C., Horobin R. W., Colombo L. L., Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*. 2018; 120: 159–167. doi: 10.1016/j.acthis.2018.02.005.
25. Jezierzański M., Nafalska N., Stopyra M. et al. Temozolomide (TMZ) in the treatment of glioblastoma multiforme — a literature review and clinical outcomes. *Curr Oncol*. 2024; 31 (7): 3994–4002. doi: 10.3390/curroncol31070296.
26. Zhu S., Wu Y., Song B. et al. Recent advances in targeted strategies for triple-negative breast cancer. *J Hematol Oncol*. 2023; 16 (1): 100. doi: 10.1186/s13045-023-01497-3.
27. Masci D., Naro C., Puxeddu M. et al. Recent advances in drug discovery for triple-negative breast cancer treatment. *Molecules*. 2023; 28 (22): 7513. doi: 10.3390/molecules28227513.
28. Andrés C. M. C., Pérez de la Lastra J. M., Munguira E. B. et al. Dual-action therapeutics: DNA alkylation and antimicrobial peptides for cancer therapy. *Cancers (Basel)*. 2024; 16 (18): 3123. doi: 10.3390/cancers16183123.
29. Peng Y., Pei H. DNA alkylation lesion repair: outcomes and implications in cancer chemotherapy. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2021; 22 (1): 47–62. doi: 10.1631/jzus.B2000344.
30. Zhukova L. G., Andreeva I. I., Zavalishina L. E. et al. Breast cancer. *Journal of Modern Oncology*. 2021; 23: 5–40. doi: https://doi.org/10.26442/18151434.2021.1.200823.

Поступила / Received 19.11.2024

Принята в печать / Accepted 22.12.2024

Информация об авторах

Ахмед Хамид Хумаири — Phd по специальностям «Фармакология, клиническая фармакология», «Онкология, лучевая терапия», ст. преподаватель кафедры медицины катастроф Института общественного здоровья ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», Волгоград, Россия. ORCID ID: 0000-0001-7545-8567

Валерий Валерьевич Новочадов — д. м. н., профессор кафедры биологии и биоинженерии Института естественных наук, ФГАОУ ВО «Волгоградский государственный университет» ВолГУ, Волгоград, Россия. ORCID ID: 0000-0001-6317-7418

About the authors

Ahmed H. Al-Humairi — Lecturer at the Department of Disaster Medicine, Institute of Public Health, Volgograd State Medical University; National Research Tomsk State University of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Volgograd, Russia. ORCID ID: 0000-0001-7545-8567.

Valeriy V. Novochadov — D. Sc. in Medicine, Professor at the Department of Biology and Bioengineering, Institute of Natural Sciences, Volgograd State University, Volgograd, Russia. ORCID ID: 0000-0001-6317-7418