

Доклинические исследования цитотоксической и цитостатической активности пяти новых производных имидазотриазина на культурах клеток рака молочной железы MDA-MB231, BT474 и MCF-7

А.Х. Хумаири^{✉1-3}, М.А. Булдаков², В.В. Новочадов⁴, Н.В. Чердынцева², В.В. Удут²

¹ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Волгоград, Россия;

²ФГБУН «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Россия;

³Университет Аль-Мустакбал, Хилла, Вавилон, Ирак;

⁴ФГАОУ ВО «Волгоградский государственный университет», Волгоград, Россия

Аннотация

Обоснование. Представлены результаты изучения новых производных имидазотриазина с целью установления возможности их использования в качестве противоопухолевых средств, в том числе для химиотерапии рака молочной железы (РМЖ). Актуальность работы обусловлена широким распространением и высокой смертностью от РМЖ и других социально значимых локализаций рака. Противоопухолевые препараты имеют ограничения в эффективности противоопухолевого действия в связи с наличием первичной или приобретенной лекарственной устойчивости. В результате от 30 до 50% пациентов с разными локализациями не получают адекватного лечения, что диктует необходимость постоянной разработки новых противоопухолевых препаратов.

Цель. Оценка противоопухолевого потенциала 5 новых производных имидазотриазина путем тестирования их цитотоксической (ЦТА) и цитостатической (ЦСА) активности на культурах клеток РМЖ.

Материалы и методы. Культивирование клеток MCF-7, MDA-MB231, BT474 и MCF-10a и определение ЦТА и ЦСА производных имидазотриазина в концентрациях от 0,25 до 10,0 ммоль/л.

Результаты. Для культуры MCF-7 максимальное подавление выживаемости клеток препарата сравнения темозоломида было равно 2,44, а концентрация, вызывающая 50% гибель клеток (IC50), – 6,81 ммоль/л, для других клеточных культур показатели ЦТА были несколько ниже. Имидазотриазин 2 и имидазотриазин 3 продемонстрировали показатели ниже или близкие к темозоломиду, IC50 в большинстве случаев достигнута не была. Эти два производных были классифицированы как соединения с низкой ЦТА и умеренной ЦСА. Имидазотриазин 4 и имидазотриазин 5 проявили более высокую активность, чем препарат сравнения, и были классифицированы как соединения с умеренной ЦТА и ЦСА. Наконец, имидазотриазин 1 с максимальным подавлением выживаемости клеток 4,35 и IC50 1,94 ммоль/л показал максимально высокие значения ЦТА и ЦСА.

Заключение. По результатам исследования *in vitro* 5 новых производных имидазотриазина могут быть оценены по возрастанию совокупности ЦТА и ЦСА в порядке: имидазотриазин 2, имидазотриазин 3 < темозоломид < имидазотриазин 4 < имидазотриазин 5 < имидазотриазин 1. Таким образом, диэтиловый эфир 4-аминоимидазо[5,1-с][1,2,4]триазин-3,8-дикарбоновой кислоты (имидазотриазин 1) является безусловным лидером в протестированной серии новых производных имидазотриазина и рекомендуется для дальнейших доклинических исследований.

Ключевые слова: имидазотриазин, цитотоксическая активность, цитостатическая активность, рак молочной железы, клеточная линия MCF-7, клеточная линия MDA-MB231, клеточная линия BT474, клеточная линия MCF-10a

Для цитирования: Хумаири А.Х., Булдаков М.А., Новочадов В.В., Чердынцева Н.В., Удут В.В. Доклинические исследования цитотоксической и цитостатической активности пяти новых производных имидазотриазина на культурах клеток рака молочной железы MDA-MB231, BT474 и MCF-7. Современная Онкология. 2025;27(2):110–116. DOI: 10.26442/18151434.2025.2.203209

© ООО «КОНСИЛИУМ МЕДИКУМ», 2025 г.

Информация об авторах / Information about the authors

✉Хумаири Ахмед Хамид – PhD по специальностям «фармакология, клиническая фармакология», «онкология, лучевая терапия», ст. преподаватель каф. медицины катастроф Института общественного здоровья ФГБОУ ВО ВолГМУ, науч. сотр. Научно-исследовательского института фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский НИМЦ», дир. департамента по развитию международных образовательных и научных связей в Российской Федерации Университета Аль-Мустакбал, Хилла. E-mail: ahmed.h.mneahil@gmail.com

Булдаков Михаил Александрович – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. молекулярной терапии рака Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ»

Новочадов Валерий Валерьевич – д-р мед. наук, проф., проф. каф. биологии и биоинженерии Института естественных наук ФГАОУ ВО ВолГУ

Чердынцева Надежда Викторовна – чл.-кор. РАН, д-р мед. наук, проф., зав. лаб. молекулярной онкологии и иммунологии, зам. дир. по научной и лечебной работе Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ»

Удут Владимир Васильевич – чл.-кор. РАН, д-р мед. наук, проф., зам. дир. по научной и лечебной работе, зав. лаб. физиологии, молекулярной и клинической фармакологии Научно-исследовательского института фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский НИМЦ»

✉Ahmed H. Al-Humairi – PhD "pharmacology, clinical pharmacology", "oncology, radiation therapy", Volgograd State Medical University, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Al Mustaqbal University. E-mail: ahmed.h.mneahil@gmail.com; ORCID: 0000-0001-7545-8567

Mikhail A. Buldakov – Cand. Sci. (Biol.), Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences. ORCID: 0000-0001-8276-110X

Valeriy V. Novochadov – D. Sci. (Med.), Prof., Volgograd State University. ORCID: 0000-0001-6317-7418

Nadezda V. Cherdyntseva – D. Sci. (Med.), Prof., Corr. Memb. RAS, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences. ORCID: 0000-0003-1526-9013

Vladimir V. Udut – D. Sci. (Med.), Prof., Corr. Memb. RAS, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences. ORCID: 0000-0002-3829-7132

Preclinical studies of cytotoxicity and cytostatic activity of five new imidazotriazine derivatives in MDA-MB231, BT474, and MCF-7 breast cancer cell cultures

Ahmed H. Al-Humairi^{1,3}, Mikhail A. Buldakov², Valeriy V. Novochadov⁴, Nadezda V. Cherdyntseva², Vladimir V. Udu²

¹Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia;

²Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia;

³Al Mustaqbal University, Hillah, Babylon Province, Iraq;

⁴Volgograd State University, Volgograd, Russia

Abstract

Background. The results of the study of new imidazotriazine derivatives are presented to support their use as antitumor agents, including for breast cancer (BC) chemotherapy. The study is relevant due to the high prevalence and mortality of BC and other socially significant cancers. Antitumor drugs have limitations in their efficacy due to the primary or acquired drug resistance. As a result, 30% to 50% of patients do not receive adequate treatment, determining the need to develop new antitumor drugs.

Aim. To evaluate the antitumor potential of 5 new imidazotriazine derivatives by testing their cytotoxic (CTA) and cytostatic (CSA) activity on BC cell cultures.

Materials and methods. Culture of MCF-7, MDA-MB231, BT474, and MCF-10a cells and determination of CTA and CSA of imidazotriazine derivatives at concentrations ranging from 0.25 to 10.0 mmol/L.

Results. For the MCF-7 culture, the maximum cell survival inhibition by the comparator (temozolomide) was 2.44, and the concentration causing 50% cell death (IC50) was 6.81 mmol/L; for other cell cultures, CTAs were slightly lower. Imidazotriazine 2 and imidazotriazine 3 showed values below or close to temozolomide; IC50 was not achieved in most cases. These two derivatives were considered to have low CTA and moderate CSA. Imidazotriazine 4 and imidazotriazine 5 showed higher activity than the comparator and were considered compounds with moderate CTA and CSA. Finally, imidazotriazine 1 showed the highest CTA and CSA values with a maximum cell survival inhibition of 4.35 and an IC50 of 1.94 mmol/L.

Conclusion. Based on the results of the in vitro study, five new imidazotriazine derivatives have CTA and CSA in the following ascending order: imidazotriazine 2, imidazotriazine 3 < temozolomide < imidazotriazine 4 < imidazotriazine 5 < imidazotriazine 1. Therefore, 4-aminoimidazo[5,1-c][1,2,4]triazine-3,8-dicarboxylic acid diethyl ether (imidazotriazine 1) is the most promising new imidazotriazine derivative and is recommended for further preclinical studies.

Keywords: imidazotriazine, cytotoxic activity, cytostatic activity, breast cancer, MCF-7 cell line, MDA-MB231 cell line, BT474 cell line, MCF-10a cell line

For citation: Al-Humairi AH, Buldakov MA, Novochadov VV, Cherdyntseva NV, Udu VV. Preclinical studies of cytotoxicity and cytostatic activity of five new imidazotriazine derivatives in MDA-MB231, BT474, and MCF-7 breast cancer cell cultures. *Journal of Modern Oncology*. 2025;27(2):110–116. DOI: 10.26442/18151434.2025.2.203209

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным видом злокачественных опухолей у женщин [1]. Он выявляется в каждом 8-м случае вновь диагностированных опухолей у женщин и определяет 14% их онкологической смертности. По глобальной статистике, в 2020 г. РМЖ выявлен у 2,3 млн человек, а 685 тыс. скончались по причине заболеваемости РМЖ [2, 3]. Методом выбора в терапии метастатического РМЖ является химиотерапия, среди множества используемых препаратов в терапевтические схемы наиболее часто включают антрациклиновые антибиотики и таксаны, но алкилирующие агенты по-прежнему актуальны и занимают определенное место в этом ряду [4–6].

Генетическое и морфологическое многообразие РМЖ, трудности подбора индивидуальной химиотерапии и высокая химиорезистентность ряда его разновидностей являются постоянными стимулами к разработке новых лекарственных средств для борьбы с этим заболеванием [7, 8].

Среди большого количества противоопухолевых препаратов мы сосредоточились на изучении производных азолозаинов, которые используются в клинике уже более 40 лет [9, 10]. Наиболее известным из них является темозоломид, являющийся производным имидазо[5,1-d][1,2,3,5]тетразина и обладающий ярко выраженным алкилирующим эффектом [11, 12]. К сожалению, многие опухоли резистентны к этому препарату, поэтому актуален поиск эффективных аналогов темозоломида. В настоящее время синтезировано более 30 подобных соединений, имеющих перспективы использования в качестве противоопухолевых средств [13].

Представляется, что замена центральной группы с имидазотетразинном и имидазотриазин может повысить алкилирующие свойства этих соединений, а включение ряда уже

хорошо зарекомендовавших себя радикалов будет способствовать как поддержанию высокого основного эффекта, так и обеспечению оптимальных фармакокинетических характеристик производных.

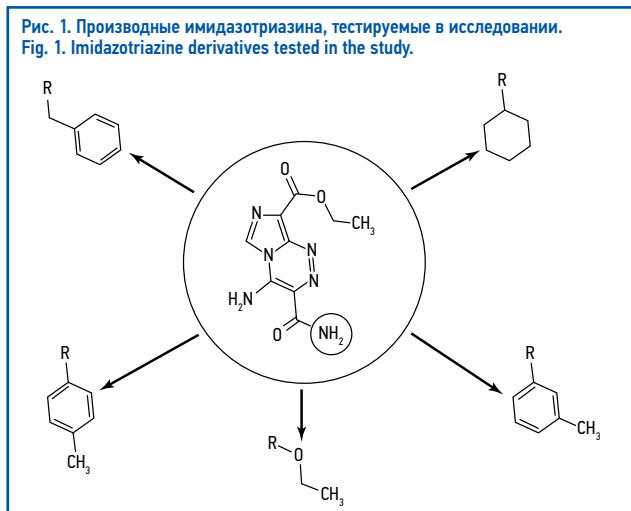
Скрининговым этапом для выбора перспективных веществ для доклинических исследований является определение их цитотоксической (ЦТА) и цитостатической (ЦСА) активности на клеточных культурах *in vitro*. В свою очередь, с учетом генетического и фенотипического полиморфизма РМЖ, на этапе скрининга одним из ключевых моментов является адекватный отбор и использование нескольких клеточных линий [14]. При проведении подобного исследования необходимо определять и степень негативного воздействия тестируемых веществ на неопухолевые клетки эпителия молочной железы (МЖ) [15].

Цель исследования – оценка потенциала пяти новых производных имидазотриазина в качестве новых противоопухолевых препаратов путем определения их ЦТА и ЦСА на трех культурах клеток РМЖ человека.

Материалы и методы Тестируемые соединения

В работе исследовано 5 производных имидазотриазина (рис. 1): диэтиловый эфир 4-аминоимидазо[5,1-c][1,2,4]триазин-3,8-дикарбоновой кислоты (имидазотриазин 1); 4-амино-8-этоксикарбонил-имидазо[5,1-c]-[1,2,4]триазин-3-N-циклогексил-карбоксамид (имидазотриазин 2); 4-амино-8-этоксикарбонил-имидазо[5,1-c]-[1,2,4]триазин-3-N-бензил-карбоксамид (имидазотриазин 3); 4-амино-8-этоксикарбонил-имидазо[5,1-c]-[1,2,4]триазин-3-N-(п-толуил)карбоксамид (имидазотриазин 4); 4-амино-8-этоксикарбонил-имидазо[5,1-c]-[1,2,4]триазин-3-N-(м-толуил)карбоксамид (имидазотриазин 5). Синтез этих соединений

Рис. 1. Производные имидазотриазина, тестируемые в исследовании.
Fig. 1. Imidazotriazine derivatives tested in the study.



проведен в ФГАОУ ВО «УрФУ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина», любезно предоставившем их для исследования. Темозоломид выступал в качестве препарата сравнения [16, 17].

Методика культивирования клеток

Исследование проводили на 3 линиях клеток РМЖ человека. MCF-7 – самая популярная линия клеток РМЖ, клетки люминального типа содержат рецепторы эстрогена и прогестерона, синтезируют эстрадиол, у них отсутствует гиперэкспрессия герцептиновых рецепторов 2 (HER2). MDA-MB231 – клеточная линия тройного негативного РМЖ базального типа, эта линия является идеальной моделью для изучения его химиотерапии. Культура клеток BT474 является тройной положительной моделью люминального типа РМЖ. MCF-10a представляет собой культуру нетрансформированных клеток люминального эпителия МЖ человека [14, 18]. Использована в качестве контроля воздействия исследуемых веществ на здоровые ткани.

После размораживания клеток их дважды отмывали в растворе Хенкса, осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 500g. Для культивирования использовали флаконы емкостью 10 мл, в которые помещали не менее 10^6 кл. Клетки культивировали в среде состава Eagle MEM/DMEM, дополнительно содержащей 1% глутамина, смесь 1% стрептомицина и 1% пенициллина с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (все компоненты производства «ПанЭко», Россия), во флаконах при температуре 37°C в присутствии 5% CO₂ в газовой фазе до получения моно слоя. После этого удаляли питательную среду, переводили клетки в суспензию с помощью 0,25% раствора трипсин-этилендиаминтетрауксусной кислоты, осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 500g, ресуспензировали в питательной среде и перемещали на 96-луночные планшеты из расчета 104 кл/100 мкл на лунку для проведения тестов.

Цитотоксическая и цитостатическая активность

Для определения ЦТА использовали метилтетразолиевый тест по 3-часовому протоколу [19]. К клеткам в лунках добавляли тестируемые вещества в конечных концентрациях 0,25; 1,0; 2,5; 5,0 и 10,0 мкмоль/л, отрицательный контроль в виде 1% диметилсульфоксида и положительный контроль – в виде 10% диметилсульфоксида. Планшет с внесенными соединениями помещали на 1 ч в CO₂-инкубатор, затем добавляли метилтетразолиевый реактив и вновь инкубировали в течение 2 ч. После проведения реакции проводили фотометрию на планшетном фотометре MARK (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) и рассчитывали выживаемость клеток (БК) как отношение оптической плотности образца и контроля в процентах и максимальное подавление БК (МПБК) как отношение оптической плотности в контроле к минимальной оптической плотности в эксперименте. Концентрацию вещества, вызывающую 50% ингибирование жизнеспособности клеток (IC₅₀,

мкмоль/л, ЖСК), 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 в 100 мкл питательной среды, общее время тестирования составило 72 ч. ЖСК определяли как отношение оптической плотности в лунках с тестируемыми соединениями и в контрольных лунках.

Статистический анализ

Для анализа использовали пакет программ Statistica 12.0 (Dell, США). После исключения нормального распределения в тесте Шапиро–Уилка данные представлены в виде медианы и квартилей (Me [Q1–Q3]). Внутригрупповой сравнительный анализ проводили по критерию Краскела–Уоллиса, сравнение между группами – по критерию Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Тестирование противоопухолевой активности производных

Темозоломид

Препарат сравнения темозоломид снижал ЖСК во всех используемых культурах дозозависимым образом, МПБК наблюдалось при концентрации 10,0 мкмоль/л и составило 2,44 для линии MCF-7, 1,63 – для линии MDA-MB231, 1,82 – для линии BT474 и 1,45 – для линии неопухолевых клеток MCF-10a.

Рассчитанный показатель IC₅₀ оказался равным 6,81 мкмоль/л на культуре клеток MCF-7, в других случаях он превышал концентрацию в 10,0 мкмоль/л. В результате ЦТА темозоломида для линии MCF-7 была расценена как умеренная, по отношению к другим клеточным линиям – как низкая. ЖСК после введения препарата во всех опухолевых культурах варьировала в пределах от 0,76–0,83 при концентрации 0,25 мкмоль/л до 0,46–0,55 при концентрации 10,0 мкмоль/л и оставалась на более высоком уровне в культуре MCF-10a. Таким образом, темозоломид продемонстрировал умеренную ЦСА в отношении опухолевых клеток и низкую активность – в отношении неопухолевых клеток (табл. 1).

Эти данные близки к результатам испытания темозоломида, в результате которых он был рекомендован для клинических исследований и успешно вошел в клиническую практику, в том числе для лечения РМЖ [20, 21].

Имидазотриазин 1

Производное имидазотриазина демонстрировало цитотоксический эффект в культуре клеток MCF-7 на всем диапазоне исследованных концентраций. МПБК составило 4,35 при концентрации 10 мкмоль/л, расчетная IC₅₀ – 1,94 мкмоль/л. ЦСА находилась в пределах от 0,85 до 0,46% в зависимости от дозы имидазотриазина 1, что в целом расценено как высокий цитостатический эффект в отношении опухолевых клеток линии MCF-7 (табл. 2).

Имидазотриазин 1 в умеренной степени вызвал снижение ЖСК линии MDA-MB231 во всем диапазоне исследуемых концентраций, МПБК составило 2,0 при максимальной концентрации 10,0 мкмоль/л, IC₅₀ также соответствовала этой концентрации. В итоге соединение отнесено к веществам с низкой ЦТА в отношении опухолевых клеток линии MDA-MB231. Минимальная ЖСК достигнута при концентрации 10,0 мкмоль/л, когда она была в 1,38 раза ниже, чем при тестировании препарата сравнения, эффект дозозависимости присутствовал. Это в конечном счете привело к заключению о высокой цитостатической активности имидазотриазина 1 в отношении клеток линии MDA-MB231.

По данным метилтетразолиевых тестов имидазотриазин 1 значительно снижал БК BT474 во всем диапазоне концентраций, эффект можно расценивать как дозозависимый. МПБК составило 3,03 при концентрации 10 мкмоль/л, расчетный показатель IC₅₀ был 2,67 мкмоль/л. В тесте на ЦСА ЖСК варьировала от 0,74 при концентрации 0,25 мкмоль/л до 0,38 – при концентрации 10,0 мкмоль/л, дозозависимый эффект

Таблица 1. ЦТА и ЦСА темозоломида Table 1. Cytotoxic (CTA) and cytostatic activity (CSA) of temozolomide				
Показатель, %	Клеточная линия			
	MCF-7	MDA-MB231	BT474	MCF-10a
Минимальная ВК	0,41*# [0,36–0,45]	0,61* [0,55–0,68]	0,55* [0,48–0,61]	0,69* [0,62–0,75]
Минимальная ЖСК	0,55* [0,48–0,60]	0,54* [0,48–0,60]	0,46*# [0,39–0,51]	0,69 [0,62–0,77]

Примечание. Здесь и далее в табл. 2–6: * – статистически значимые различия со значениями в контрольных образцах, # – различия между значениями в культурах опухолевых и неопухолевых клеток.

Таблица 2. ЦТА и ЦСА имидазотриазина 1 Table 2. CTA and CSA of imidazotriazine 1				
Показатель, %	Клеточная линия			
	MCF-7	MDA-MB231	BT474	MCF-10a
Минимальная ВК	0,23*# [0,20–0,27]	0,50*# [0,43–0,56]	0,33*# [0,29–0,37]	0,67* [0,60–0,75]
Минимальная ЖСК	0,46* [0,40–0,51]	0,39* [0,36–0,43]	0,38*# [0,33–0,42]	0,52* [0,46–0,60]

был отчетливо выражен. Общее заключение: выявлена высокая ЦТА и ЦСА имидазотриазина 1 в отношении опухолевых клеток линии BT474.

Имидазотриазин 1 демонстрировал умеренный цитотоксический эффект в культуре неопухолевых клеток MCF-10a на всем диапазоне исследованных концентраций. МПВК составило 1,69 при концентрации соединения, равной 5,0 мкмоль/л. Расчетная IC50 в исследуемом диапазоне концентрации не достигнута, т.е. была выше 10 мкмоль/л. Определение ЖСК показало, что минимальное ее значение наблюдается при концентрации 10,0 мкмоль/л, когда подавление роста клеток в культуре на 1/3 превышает аналогичный эффект препарата сравнения, в тесте выявляются отчетливые признаки дозозависимости. Это соответствует умеренной ЦСА исследуемого соединения в отношении культуры клеток линии MCF-10a.

В итоге ЦСА имидазотриазина 1 оценена как высокая по отношению к опухолевым клеткам и умеренная – в отношении неопухолевых клеток линии MCF-10a.

Имидазотриазин 2

Производное имидазотриазина снижало ЖСК MCF-7 во всем диапазоне концентраций. МПВК достигнуто при концентрации 5 мкмоль/л и составило 2,63, расчетная IC50 равнялась 5,95 мкмоль/л. Соединение отнесено к веществам с умеренной цитотоксичностью. ЖСК варьировала в узких пределах от 0,57 до 0,65 и не отличалась от значений показателя при тестировании препарата сравнения, эффект дозозависимости не выявлен. По итогам исследования сделано заключение об умеренной ЦТА и ЦСА имидазотриазина 2 в отношении клеток линии MCF-7 (табл. 3).

При исследовании ЦТА имидазотриазина 2 в культуре клеток MDA-MB231 МПВК составило 1,72, IC50 превышала значение максимальной исследуемой концентрации 10,0 мкмоль/л. Максимальное подавление ЖСК при исследовании производного 7 было достигнуто при концентрации 10,0 мкмоль/л и было по своей величине сопоставимо с величиной аналогичного показателя у препарата сравнения. Как итог, сделано заключение об низкой ЦТА и умеренной ЦСА соединения в отношении опухолевых клеток линии MDA-MB231.

Выявлено, что имидазотриазин 2 снижал ВК линии BT474 во всем диапазоне исследованных концентраций без признаков зависимости от дозы соединения. МПВК составило 2,04 при концентрации 10,0 мкмоль/л. IC50 лежала вблизи максимальной исследуемой концентрации 10 мкмоль/л. ЖСК снижалась вдвое по мере нарастания концентрации действующего соединения, и при концентрации 10,0 мкмоль/л оказывалась сопоставима с эффектом, выявленным при аналогичном тестировании препарата сравнения. По итогам исследования сделано

Таблица 3. ЦТА и ЦСА имидазотриазина 2 Table 3. CTA and CSA of imidazotriazine 2				
Показатель, %	Клеточная линия			
	MCF-7	MDA-MB231	BT474	MCF-10a
Минимальная ВК	0,44*# [0,38–0,49]	0,58* [0,50–0,65]	0,49*# [0,43–0,56]	0,73* [0,64–0,82]
Минимальная ЖСК	0,57* [0,50–0,61]	0,50*# [0,43–0,56]	0,47*# [0,40–0,53]	0,68* [0,60–0,77]

Таблица 4. ЦТА и ЦСА имидазотриазина 3 Table 4. CTA and CSA of imidazotriazine 3				
Показатель, %	Клеточная линия			
	MCF-7	MDA-MB231	BT474	MCF-10a
Минимальная ВК	0,43*# [0,38–0,47]	0,68* [0,60–0,76]	0,53* [0,48–0,61]	0,63* [0,56–0,70]
Минимальная ЖСК	0,57* [0,50–0,65]	0,49*# [0,42–0,55]	0,51*# [0,42–0,58]	0,68* [0,60–0,75]

заключение о низкой ЦТА и умеренной ЦСА имидазотриазина 2 в отношении клеток линии BT474.

Имидазотриазин 2 проявил низкую ЦТА в культуре неопухолевых клеток MCF-10a в дозозависимой манере до максимальной концентрации 10 мкмоль/л, когда регистрировали МПВК, равное 1,37. IC50 прогнозировалась значительно выше 10 мкмоль/л. ЦСА находилась в пределах от 0,91 до 0,68 и имела определенную зависимость от дозы, что в целом было расценено как низкий эффект в отношении клеток линии MCF-10a.

В итоге имидазотриазин 2 был отнесен к соединениям с низкой ЦТА в отношении опухолевых и неопухолевых клеток и умеренной ЦСА, не превышающей аналогичную активность темозоломида.

Имидазотриазин 3

Производное имидазотриазина вызвало дозозависимое снижение жизнеспособности опухолевых клеток MCF-7 во всем диапазоне концентраций, МПВК составило 2,33 при максимальной концентрации 10 мкмоль/л. Расчетное половинное торможение IC50 было достигнуто при концентрации 7,89 мкмоль/л. Максимальное снижение ЖСК достигнуто при концентрации 10,0 мкмоль/л, когда величина показателя снижалась почти вдвое, эффект дозозависимости присутствовал. Это привело к заключению о низкой ЦТА и умеренной ЦСА производного в отношении опухолевых клеток линии MCF-7 (табл. 4).

Имидазотриазин 3 снижал ВК MDA-MB231 во всем диапазоне концентраций. МПВК было достигнуто при концентрации 10,0 мкмоль/л и составило 1,47, расчетная IC50 превышала величину максимальной исследуемой концентрации 10,0 мкмоль/л. В тесте на ЦСА ЖСК варьировала от 0,77 при концентрации 0,25 мкмоль/л до 0,40 при концентрации 10,0 мкмоль/л с отчетливой зависимостью от дозы соединения. Общее заключение можно сформулировать таким образом: наблюдается низкая ЦТА и умеренная ЦСА имидазотриазина 3 в отношении клеток линии MDA-MB231.

Имидазотриазин 3 по результатам метилтетразолиевого теста проявил ЦТА в культуре опухолевых клеток BT474 в дозозависимой манере до концентрации 10,0 мкмоль/л, когда регистрировали МПВК, равное 1,89. IC50 прогнозировалась выше максимальной исследуемой концентрации 10,0 мкмоль/л. Определение ЖСК показало, что минимальное ее значение наблюдается при концентрации 10,0 мкмоль/л, когда она снижается вдвое, с признаками зависимости от дозы. Это привело к заключению о низком цитотоксическом эффекте имидазотриазина 3, его умеренной ЦСА в отношении культуры клеток BT474.

При исследовании цитотоксичности имидазотриазина 3 в культуре неопухолевых клеток линии MCF-10a в изученном диапазоне концентраций также отмечалась тенденция к снижению ВК. МПВК составило 1,59 при концентрации 10,0 мкмоль/л,

Таблица 5. ЦТА и ЦСА имидазотриазина 4
Table 5. CTA and CSA of imidazotriazine 4

Показатель, %	Клеточная линия			
	MCF-7	MDA-MB231	BT474	MCF-10a
Минимальная ВК	0,36*# [0,31–0,43]	0,61* [0,53–0,68]	0,56* [0,48–0,64]	0,60* [0,52–0,67]
Минимальная ЖСК	0,51* [0,45–0,58]	0,54* [0,48–0,61]	0,50* [0,43–0,56]	0,59* [0,52–0,67]

а IC50 оказалась выше 10 мкмоль/л. Максимальное подавление ЖСК при исследовании имидазотриазина 3 достигнуто при концентрации 10,0 мкмоль/л и было сопоставимо с величиной показателя у препарата сравнения. Как итог сделан вывод о низкой ЦТА и умеренной ЦСА соединения в отношении неопухолевых клеток линии MCF-10a.

В результате сделано заключение о низкой ЦТА и умеренной ЦСА имидазотриазина 3 в отношении опухолевых клеток РМЖ, сопоставимыми или несколько более низкими по сравнению с темозоломидом.

Имидазотриазин 4

В этой серии экспериментов показано, что имидазотриазин 4 снижал ЖСК линии MCF-7 во всем диапазоне концентраций. МПВК составило 3,03 при концентрации соединения, равной 5,0 мкмоль/л, IC50 оказалась равной 3,95 мкмоль/л. По итогам исследования имидазотриазин 4 был отнесен к веществам с высокой ЦТА. Максимальное подавление ЖСК достигнуто при концентрации 10,0 мкмоль/л, когда оно вдвое превышало контрольные значения, но не отличалось от величин показателя у препарата сравнения. Как итог сделано заключение об умеренной ЦСА имидазотриазина 4 в отношении опухолевых клеток линии MCF-7 (табл. 5).

Несколько иные результаты получены при исследовании цитотоксичности имидазотриазина 4 в культуре клеток линии MDA-MB231. В изученном диапазоне концентраций также отмечалась тенденция к снижению ВК. МПВК составило 1,64 при концентрации 10,0 мкмоль/л, а расчетная IC50 оказалась выше 10 мкмоль/л. Это указывало на низкую ЦТА соединения в отношении опухолевых клеток линии MDA-MB231. Определение ЖСК показало, что минимальное ее значение наблюдается при концентрации 10,0 мкмоль/л, с минимальными признаками дозозависимости, что соответствует низкой ЦСА имидазотриазина 4 в отношении культуры клеток MDA-MB231.

В культуре клеток BT474 имидазотриазин 4 демонстрировал цитотоксический эффект на всем диапазоне исследованных концентраций. МПВК составило 1,78 при концентрации производного 10 мкмоль/л. Расчетная IC50 не была определена в интервале исследуемых концентраций, т.е. прогнозировалась значительно выше 10,0 мкмоль/л. Имидазотриазин 4 отнесен к соединениям с умеренной цитотоксичностью в отношении клеток линии BT474. ЦСА вещества, установленная по проценту жизнеспособных клеток в культуре, находилась в пределах от 0,68 до 0,50 в зависимости от дозы соединения, что в целом расценено как умеренный эффект в отношении клеток линии BT474.

В отношении неопухолевых клеток линии MCF-10a при исследовании имидазотриазина 4 наблюдали незначительный эффект. МПВК составило 1,61 при концентрации производного, равной 10,0 мкмоль/л. Расчетная IC50 лежала за пределами исследуемого диапазона концентраций. ЖСК при тестировании имидазотриазина 4 оказалась всего в 1,17 раза меньше, чем при аналогичном тестировании препарата сравнения, эффект дозозависимости был умеренно выражен. По итогам исследования имидазотриазин 4 отнесен к веществам с низкой ЦТА и умеренной ЦСА в отношении клеток линии MCF-10a.

В итоге ЦТА имидазотриазина 4 в отношении опухолевых клеток оказалась несколько выше, чем у препарата сравнения, и она расценена как умеренная. ЦТА признана высокой только в отношении клеточной линии MCF-7 и низкой – в отношении других клеточных линий.

Таблица 6. ЦТА и ЦСА имидазотриазина 5
Table 6. CTA and CSA of imidazotriazine 5

Показатель, %	Клеточная линия			
	MCF-7	MDA-MB231	BT474	MCF-10a
Минимальная ВК	0,56* [0,50–0,63]	0,44*# [0,39–0,48]	0,40*# [0,35–0,44]	0,69* [0,61–0,76]
Минимальная ЖСК	0,44* [0,39–0,49]	0,43* [0,36–0,50]	0,42* [0,36–0,49]	0,58* [0,51–0,65]

Имидазотриазин 5

Выявлено, что производное имидазотриазина снижало ЖСК MCF-7 во всем диапазоне исследованных концентраций с эффектом, который можно расценивать как дозозависимый. МПВК составило 1,79 при концентрации 10 мкмоль/л. Расчетная IC50 лежала за пределами исследованного диапазона концентраций, т.е. была выше 10 мкмоль/л. В тесте на ЦСА ЖСК варьировала в узком интервале от 0,53 до 0,44 в зависимости от концентрации исследуемого вещества. Общее заключение: у имидазотриазина 5 – низкая ЦТА и умеренная ЦСА в отношении клеток линии MCF-7 (табл. 6).

В культуре клеток MDA-MB231 имидазотриазин 5 снижал их выживаемость на всем диапазоне исследуемых концентраций в дозозависимой манере. МПВК составляло 2,27 при концентрации 10,0 мкмоль/л, IC50 составила 6,85 мкмоль/л. Минимальная ЖСК достигнута при концентрации 10,0 мкмоль/л, когда она оказывалась в 1,29 раза ниже, чем у препарата сравнения, эффект дозозависимости выражен незначительно. Это в итоге привело к заключению об умеренной ЦТА и ЦСА имидазотриазина 5 в отношении клеток линии MDA-MB231.

Имидазотриазин 5 более чем вдвое снижал ВК BT474 в исследованном диапазоне концентраций, дозозависимого эффекта не наблюдалось. МПВК составляло 2,50 при концентрации 10,0 мкмоль/л, расчетная IC50 составила 3,55 мкмоль/л, что соответствовало высокой ЦСА соединения. Определение ЖСК показало, что ее снижение наблюдается во всем диапазоне исследуемых концентраций и варьирует в узком интервале от 0,52 до 0,42 по мере увеличения этой концентрации. Это соответствовало умеренной ЦСА исследуемого соединения в отношении культуры клеток BT474.

Имидазотриазин 5 незначительно снижал выживаемость неопухолевых клеток линии MCF-10a в исследованном диапазоне концентраций, зависимость от дозы не была очевидной. МПВК достигнуто при концентрации 10 мкмоль/л и составило 1,45. Соответственно, расчетная IC50 для имидазотриазина 5 лежала за пределами исследованного диапазона концентраций. Производное имидазотриазина отнесено к соединениям с низкой ЦТА в отношении неопухолевых клеток линии MCF-10a. ЦТА, определенная по проценту жизнеспособных клеток в культуре, находилась в пределах от 0,82 до 0,48 в зависимости от дозы исследуемого соединения, что в целом расценено как низкий цитостатический эффект в отношении клеток линии MCF-10a.

По результатам тестирования имидазотриазин 5 отнесен к соединениям с умеренной ЦТА, близкой к высокой, с умеренной ЦСА в отношении опухолевых клеток, превышающей эффект препарата сравнения в 1,10–1,25 раза, и низкой ЦСА в отношении неопухолевых клеток линии MCF-10a.

Обсуждение

Современная парадигма разработки новых лекарственных средств требует, чтобы их химическая структура изначально предполагала определенную фармакологическую, например противоопухолевую активность, эти соединения имели четко обозначенные мишени действия, демонстрировали высокую специфическую активность *in vitro* и *in vivo*, оказывали минимальное воздействие на здоровые ткани и не вызывали быстрого развития резистентности [22].

Применительно к тематике настоящего исследования следует выделить то, что решение проблемы своевременной диагностики, лечения и реабилитации женщин, страдающих

РМЖ, отнесено к приоритетным задачам мирового и отечественного здравоохранения [1, 23, 24].

Настоящее исследование подтвердило, что препарат сравнения темозоломид обладает умеренной ЦТА и ЦСА. Фармакодинамические свойства препарата хорошо известны. Препарат наиболее активен в фазах клеточного цикла, сопровождающихся интенсивным синтезом ДНК, для него доказана цитотоксичность в отношении клеток РМЖ как *in vitro*, так и *in vivo*, а также ряда других опухолевых клеток человека [20]. Поэтому темозоломид можно считать классическим препаратом сравнения для доклинических испытаний новых химиотерапевтических средств.

Сравнение *in vitro* ЦТА и ЦСА 5 производных имидазотриазина на клеточных культурах показало, что, несмотря на сходную структуру и физико-химические свойства, эти соединения проявляют неодинаковую активность в отношении клеток РМЖ и нетрансформированных эпителиальных клеток МЖ человека. Известными причинами, вызывающими различия в противоопухолевых эффектах гомологичных молекул, являются, во-первых, особенности их распределения в организме и, во-вторых, способность проникать в клетки-мишени.

Часть различий в чувствительности исследованных клеточных линий к производным имидазотриазина можно объяснить разной экспрессией на их клетках трех ключевых маркеров: рецепторов эстрогена и прогестерона и HER2. Полученные нами экспериментальные значения ВК и ЖСК *in vitro* согласуются с результатами изучения других алкилирующих соединений [25, 26] и подтверждают важную роль второго механизма в реализации фармакологических эффектов этих соединений.

Важно, что ЦТА и ЦСА исследуемых препаратов на неопухолевые клетки во всех случаях оказывались ниже, чем аналогичное воздействие на культуры клеток РМЖ. В итоге мы посчитали, что тестируемые производные имидазотриазина обладают эффектами в отношении неопухолевых клеток, которые можно отнести к позитивным моментам в случае их использования в качестве противоопухолевых препаратов. В то же время цитотоксическое воздействие, хотя и не выраженное, имелось, 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.

Не стоит забывать и о том, что существует свыше 50 разных типов культур опухолевых клеток РМЖ, что позволяет нам предполагать, что производное 1, показавшее наибольшую эффективность в этом исследовании, может не продемонстрировать ее при использовании против клеток опухолей разных молекулярных подтипов и других локализаций.

Что касается значимости полученных данных, следует подчеркнуть: решение проблемы своевременной диагностики, лечения

и реабилитации женщин, страдающих РМЖ, является одним из приоритетов мирового здравоохранения. Выбранный класс соединений привлекателен с этих позиций благодаря достаточно хорошо зарекомендовавшим себя представителям, включая митозоламид и темозоломид, а также получению новых соединений с потенциально многообещающими свойствами.

Заключение

По результатам исследования *in vitro* на 3 культурах клеток РМЖ человека и культуре неопухолевых клеток MCF-10a 5 новых производных имидазотриазина выявлено, что все эти вещества обладают ЦТА и ЦСА и могут быть расположены в следующем порядке по возрастанию активности: имидазотриазин 2, имидазотриазин 3 < темозоломид < имидазотриазин 5 < имидазотриазин 1. Таким образом, диэтиловый эфир 4-аминоимидазо[5,1-с][1,2,4]триазин-3,8-дикарбоновой кислоты (имидазотриазин 1) является безусловным лидером в протестированной серии новых производных имидазотриазина, в связи с чем он рекомендуется для дальнейших доклинических исследований.

Раскрытие интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Disclosure of interest. The authors declare that they have no competing interests.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE. А.Х. Хумаири – разработка основной концепции, гипотезы и дизайна исследования, проведение исследования, обработка данных исследования, написание и редактирование текста статьи; М.А. Булдаков – редактирование текста статьи; В.В. Новочадов – разработка концепции и дизайна исследования, статистический анализ, редактирование текста статьи; Н.В. Чердынцева – разработка концепции исследования, редактирование текста статьи; В.В. Удуд – разработка концепции исследования, редактирование текста статьи.

Authors' contribution. The authors declare the compliance of their authorship according to the international ICMJE criteria. A.H. Al-Humairi – study concept, hypothesis, and design, conducting the study, processing study data, writing and editing the paper; M.A. Buldakov – editing the paper; V.V. Novochadov – study concept and design, statistical analysis, editing the paper; N.V. Cherdynitseva – study concept, editing the paper; V.V. Udut – study concept, editing the paper.

Источник финансирования. Авторы декларируют отсутствие внешнего финансирования для проведения исследования и публикации статьи.

Funding source. The authors declare that there is no external funding for the exploration and analysis work.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Wilkinson L, Gathani T. Understanding breast cancer as a global health concern. *Br J Radiol.* 2022;95(1130):20211033. DOI:10.1259/bjr.20211033
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49. DOI:10.3322/caac.21660
- Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res.* 2017;50(1):33. DOI:10.1186/s40659-017-0140-9
- Feiten S, Dünnebacke J, Friesenhahn V, et al. Follow-up reality for breast cancer patients – standardised survey of patients and physicians and analysis of treatment data. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2016;76(5):557–63. DOI:10.1055/s-0042-106210
- Asif HM, Sultana S, Ahmed S, et al. HER-2 Positive breast cancer – A mini-review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(4):1609–15. DOI:10.7314/apjcp.2016.17.4.1609
- Azamjah N, Soltan-Zadeh Y, Zayeri F. Global trend of breast cancer mortality rate: A 25-year study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019;20(7):2015–20. DOI:10.31557/APJCP.2019.20.7.2015
- Rositch AF, Unger-Saldaña K, DeBoer RJ, et al. The role of dissemination and implementation science in global breast cancer control programs: Frameworks, methods, and examples. *Cancer.* 2020;126(Suppl. 10):2394–404. DOI:10.1002/cnrc.32877
- Cao J, Zhang M, Wang B, et al. Chemoresistance and metastasis in breast cancer molecular mechanisms and novel clinical strategies. *Front Oncol.* 2021;11:658552. DOI:10.3389/fonc.2021.658552
- 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 [Al-Humairi AH, Speransky DL, Sadchikova EV. Synthesis and cytotoxic activity of new azolotriazines studied on cell cultures. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2022;56(6):17–22 (in Russian)]. DOI:10.30906/0023-1134-2022-56-6-17-22
- Хумаири А.Х., Сперанский Д.Л., Новочадов В.В., и др. Противоопухолевая активность трех новых производных азолоазинов на модели ортотопической трансплантации клеток рака молочной железы человека мышам. *Фармация и фармакология.* 2023;11(4):291–300 [Al-Humairi AH, Speransky DL, Novochadov VV, et al. Antitumor activity of three new azoloazine derivatives in orthotopic transplantation model of human breast cancer cells into mice. *Pharmacy & Pharmacology.* 2023;11(4):291–300 (in Russian)]. DOI:10.19163/2307-9266-2023-11-4-291-300

11. Newlands ES, Stevens MF, Wedge SR, et al. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev.* 1997;23(1):35–61. PMID:9189180
12. Stevens MFG. Temozolomide – birth of a blockbuster. *Drug Discovery.* 2009;(7):48–51.
13. Moody C, Wheelhouse R. The medicinal chemistry of imidazotetrazine prodrugs. *Pharmaceuticals (Basel).* 2014;7(7):797–838. DOI:10.3390/ph7070797
14. Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. *J Cancer.* 2017;8(16):3131–41. DOI:10.7150/jca.18457
15. Гильдеева ГН. Актуальные проблемы доклинических исследований: переход к альтернативной in vitro-токсикологии. *Вестник Росздравнадзора.* 2015;(5):59–62 [Gildeeva GN. Topical issues of pre-clinical studies: transition to alternative in vitro toxicology. *Vestnik Roszdravnadzora.* 2015;(5):59–62 (in Russian)].
16. Sadchikova EV, Mokrushin VS. Interaction of 3,8-disubstituted imidazo[5,1-c][1,2,4]triazines with nucleophiles. *Chem Heterocyclic Comp.* 2014;50(7):1014–20. DOI:10.1007/s10593-014-1557-5
17. Alexeeva DL, Sadchikova EV, Volkova NN, et al. Reactivity of 3-substituted pyrazole-5-diazonium salts towards 3-azolylenamines. Synthesis of novel 3-azolylenpyrazolo[5,1-c][1,2,4]triazines. *ARKIVOC.* 2016;IV:114–29. DOI:10.3998/ark.5550190.p009.571
18. Alexandrova R, Dinev D, Gavrilova-Valcheva I, Gavrilov I. Cell cultures as model systems in breast cancer research. *Merit Res J Med Med Sci.* 2019;7(2):73–9.
19. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem.* 2018;120(3):159–67. DOI:10.1016/j.acthis.2018.02.005
20. Garza-Morales R, Gonzalez-Ramos R, Chiba A, et al. Temozolomide enhances triple-negative breast cancer virotherapy in vitro. *Cancers (Basel).* 2018;10(5):144. DOI:10.3390/cancers10050144
21. 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;39:e391624. DOI:10.1590/acb391624
22. Arnedos M, Vicier C, Loi S, et al. Precision medicine for metastatic breast cancer – limitations and solutions. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015;12(12):693–704. DOI:10.1038/nrclinonc.2015.123
23. Жукова Л.Г., Андреева Ю.Ю., Завалишина Л.Э., и др. Рак молочной железы. Клинические рекомендации. *Современная Онкология.* 2021;23(1):5–40 [Zhukova LG, Andreeva Iulu, Zavalishina LE, et al. Breast cancer. Clinical recommendations. *Journal of Modern Oncology.* 2021;23:5–40 (in Russian)]. DOI:10.26442/18151434.2021.1.200823
24. Коломейцева А.А., Бокова С.Е. Качество и продолжительность жизни как основные приоритеты пациентов с распространенным раком молочной железы, получающих лекарственную терапию. Результаты социологического исследования. *Современная Онкология.* 2022;24(1):115–8 [Kolomeytseva AA, Bokova SE. Quality of life and overall survival are primary priorities of patients with advanced breast cancer: results of sociological research. *Journal of Modern Oncology.* 2022;24(1):115–8 (in Russian)]. DOI:10.26442/18151434.2022.1.201440
25. 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
26. 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

Статья поступила в редакцию / The article received: 14.10.2024

Статья принята к печати / The article accepted for publication: 06.06.2025



OMNIDOCTOR.RU