



© Ахмед Хамид Хумаири<sup>1,2,3,6</sup>, В.В. Новочадов<sup>5</sup>, Н.В. Чердынцева<sup>4</sup>, В.В. Удут<sup>3</sup>

## Противоопухолевые эффекты новых производных метилпиразололтриазина и пиразолобензотриазина при тестировании на культурах клеток рака молочной железы MCF-7, MDA-MB231 и BT-474\*

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Волгоград, Российская Федерация

<sup>2</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет» г. Томск, Российская Федерация

<sup>3</sup>НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Российская Федерация

<sup>4</sup>НИИ онкологии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Российская Федерация

<sup>5</sup>Федеральное государственное автономное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный университет», г. Волгоград, Российская Федерация

<sup>6</sup>Университет Аль-Мустақбаль, Хилла, Вавилон, Республика Ирак

© Ahmed Hamid Humairi<sup>1,2,3,6</sup>, Valeriy V. Novochadov<sup>5</sup>, Nadezda V. Cherdyntseva<sup>4</sup>, Vladimir V. Udut<sup>3</sup>

## Antitumor Activity of New Methylpyrazolotriazine and Pyrazolobenzotriazine Derivatives Tested on MCF-7, MDA-MB-231, and BT-474 Breast Cancer Cell Lines

<sup>1</sup>Volgograd State Medical University, Volgograd, the Russian Federation

<sup>2</sup>National Research Tomsk State University, Tomsk, the Russian Federation

<sup>3</sup>Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, the Russian Federation

<sup>4</sup>Research Institute of Oncology, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, the Russian Federation

<sup>5</sup>Volgograd State University, Volgograd, the Russian Federation

<sup>6</sup>Al-Mustaqbal University, Hillah, Babylon, Republic of Iraq

**Введение.** Рак молочной железы (РМЖ) занимает лидирующие позиции среди онкологических заболеваний по частоте заболеваемости и смертности у женщин во всем мире. Из-за высокой гетерогенности опухолевых клеток и морфофункциональных вариаций подбор эффективных схем лечения часто вызывает затруднения. Ключевыми проблемами при терапии РМЖ является развитие устойчивости к применяемым препаратам, что делает необходимым поиск новых лекарственных средств.

**Цель.** Оценить потенциал двух новых производных метилпиразололтриазина (МПТА 1, МПТА 2) и двух производных пиразолобензотриазина (ПБТА 1, ПБТА 2) на предмет возможности их применения в качестве противоопухолевых средств, в том числе для химиотерапии РМЖ.

**Материалы и методы.** Основной методикой явилось изучение цитотоксической (ЦТА) и цитостатической активности (ЦСА) этих производных в концентрациях от 0,25 до 10,0 мкмоль/л в культурах клеток РМЖ MCF-7, MDA-MB-231 и BT-474, а также нетрансформированных клеток эпителия молочной железы человека MCF-10a. ЦТА определяли методом метилтетразолиевого теста (МТТ). Для

**Introduction.** Breast cancer (BC) remains a leading cause of cancer incidence and mortality among women worldwide. The high heterogeneity of tumor cells and their morphological and functional variability often complicate the selection of effective treatment regimens. A primary challenge in BC therapy is the development of drug resistance, underscoring the need for novel therapeutic agents.

**Aim.** To evaluate the potential of two new methylpyrazolotriazine derivatives (MPTA 1, MPTA 2) and two new pyrazolobenzotriazine derivatives (PBTA 1, PBTA 2) as anticancer agents, including their application in BC chemotherapy.

**Materials and Methods.** The study assessed the cytotoxic (CTA) and cytostatic (CSA) activity of these derivatives at concentrations ranging from 0.25 to 10.0  $\mu$ M. The effects were tested on BC cell lines MCF-7, MDA-MB-231, and BT-474, and on non-tumorigenic human breast epithelial cells MCF-10A. CTA was determined using the methyl tetrazolium (MTT) assay, with the half-maximal cytotoxic concentration ( $IC_{50}$ ) calculated. CSA was evaluated after longer cultivation time

\*Полный текст статьи на английском языке доступен по ссылке <https://voprosyonkologii.ru/index.php/journal/article/view/3-26-Antitumor-Activity>

оценки эффекта рассчитывали  $IC_{50T}$  — концентрацию, вызывающую 50 %-ную гибель клеток. ЦСА изучали при более длительной культивации (72 ч), рассчитывая  $IC_{50S}$  как концентрацию, тормозящую прирост клеток на 50 %. Статистический анализ проводился с использованием непараметрических тестов (Краскела — Уоллиса и Манна — Уитни) при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Наиболее высокая ЦТА в отношении клеток линии MCF-7 выявлена для производного МПТА 1 ( $IC_{50T}$  8,15 мкмоль/л), клеток линии MDA-MB-231 — для производного ПБТА 3 ( $IC_{50T}$  3,79 мкмоль/л), клеток линии BT474 — для производных МПТА 1 ( $IC_{50T}$  4,48 мкмоль/л) и МПТА 2 ( $IC_{50T}$  6,15 мкмоль/л). Все тестируемые соединения проявили сходную ЦСА в отношении клеток линии MCF-7 в среднем в 1,20–1,45 раза выше активности препарата сравнения Темозоломида (минимальная жизнеспособность клеток — 55 %). В культурах MDA-MB-231 и BT-474 МПТА 1 и МПТА 2 проявляли более высокую ЦСА по сравнению с эффектами ПБТА 1, ПБТА 2 и темозоломида в 1,16–1,50 раза. Все исследованные производные метилпиразолотриазина и пиразолобензотриазина и препарат сравнения Темозоломид продемонстрировали низкую ЦСА в отношении неопухолевых эпителиальных клеток линии MCF-10a; их  $IC_{50S}$  лежала за пределами диапазона измерения 10,0 мкмоль/л. Новые производные метилпиразолотриазина и пиразолобензотриазина по возрастанию совокупности ЦТА и ЦСА расположены в порядке: МПТА 2, ПБТА 1 < темозоломид < ПБТА 2 < МПТА 1.

**Выводы.** Таким образом, МПТА 1 (3-(3'-Фенил-4'-метоксикарбонил-изоксазол-7-метилпиразоло[5,1-c][1,2,4]триазин) является лидером по ЦТА и ЦСА среди протестированных новых соединений и рекомендуется для дальнейших доклинических испытаний.

**Ключевые слова:** пиразолотриазины; цитотоксическая активность; цитостатическая активность; рак молочной железы; MCF-7; MDA-MB-231, BT-474, MCF-10a

**Для цитирования:** Хумаири Ахмед Хамид, Новочадов В.В., Чердынцева Н.В., Удут В.В. Противоопухолевые эффекты новых производных метилпиразолотриазина и пиразолобензотриазина при тестировании на культурах клеток рака молочной железы MCF-7, MDA-MB231 и BT-474. *Вопросы онкологии*. 2026; 72(3): 711-718.-DOI: 10.37469/0507-3758-2026-72-3-OF-2446

✉ Контакты: Хумаири Ахмед Хамид, ahmed.h.mneahil@gmail.com

## Введение

Среди злокачественных новообразований рак молочной железы (РМЖ) занимает лидирующие позиции среди онкологических заболеваний по частоте заболеваемости и смертности у женщин во всем мире. По данным Международного агентства по изучению рака, число вновь выявленных заболеваний за год в мире приближается к миллиону, а ежегодные потери женского населения от РМЖ составляют 0,67 млн [1, 2].

Именно генетическое и морфологическое разнообразие РМЖ часто становится препятствием на пути подбора эффективных программ лечения [3], что вкупе с постоянно возрастающей химиорезистентностью опухолевых клеток диктует необходимость в разработке новых лекарственных средств для борьбы с заболеванием [4, 5].

(72 hours), with the  $IC_{50S}$  defined as the concentration that inhibited cell growth by 50 %. Statistical analysis employed nonparametric tests (Kruskal–Wallis and Mann–Whitney) with a significance level of  $p < 0.05$ .

**Results.** The highest CTA against MCF-7 cells was observed for derivative MPTA 1 ( $IC_{50T}$  8.15  $\mu$ M), against MDA-MB-231 cells for PBTA 3 ( $IC_{50T}$  3.79  $\mu$ M), and against BT-474 cells for MPTA 1 ( $IC_{50T}$  4.48  $\mu$ M) and MPTA 2 ( $IC_{50T}$  6.15  $\mu$ M). All tested compounds exhibited similar CSA against MCF-7 cells, averaging 1.20–1.45 times higher than the reference drug temozolomide (minimum cell viability 55 %). In MDA-MB-231 and BT-474 cultures, MPTA 1 and MPTA 2 exhibited superior CSA compared to PBTA 1, PBTA 2, and temozolomide, with a 1.16–1.50-fold increase. All the investigated derivatives of methylpyrazolotriazine and pyrazolobenzotriazine and the reference drug temozolomide showed low CSA against non-cancerous epithelial MCF-10A cells, with  $IC_{50S}$  values exceeding the tested concentration range ( $> 10.0 \mu$ M). Ranking the new methylpyrazolotriazine and pyrazolobenzotriazine derivatives by the combined potency of CTA and CSA yields the following order: MPTA 2, PBTA 1 < temozolomide < PBTA 2 < MPTA 1.

**Conclusion.** Derivative MPTA 1 (3-(3'-Phenyl-4'-methoxycarbonyl-isoxazolyl)-7-methyl-pyrazolo[5,1-c]triazine) demonstrated the highest CTA and CSA among the tested derivatives and is recommended for further preclinical studies.

**Keywords:** pyrazolotriazines; cytotoxic activity; cytostatic activity; breast cancer; MCF-7; MDA-MB-231; BT-474; MCF-10A

**For Citation:** Ahmed Hamid Humairi, Valeriy V. Novochadov, Nadezda V. Cherdynseva, Vladimir V. Udut. Antitumor activity of new methylpyrazolotriazine and pyrazolobenzotriazine derivatives tested on MCF-7, MDA-MB-231, and BT-474 breast cancer cell lines. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2026; 72(3): 711-718.-DOI: 10.37469/0507-3758-2026-72-3-OF-2446

Основной комплексной химиотерапии метастатического РМЖ являются алкилирующие агенты [5]. Среди этих противоопухолевых препаратов мы изучали эффекты новых производных азолозинов, которые с успехом используются в клинике и наиболее известным из которых является темозоломид [7]. К сожалению, как и для большинства классов химиотерапевтических средств, к темозоломиду в настоящее время резистентны многие опухоли, и актуален поиск новых производных пиразолотетразина и пиразолотриазина [8]. Цель исследования — проверить потенциал двух новых производных метилпиразолотриазина (МПТА) и двух производных пиразолобензотриазина (ПБТА) в качестве новых противоопухолевых препаратов путем изучения их цитотоксической (ЦТА) и цитостатической (ЦСА) активности на культурах клеток рака молочной железы.

**Материалы и методы**

В работе исследовано четыре производных пиразолотриазина: 3-(3'-Фенил-4'-метоксикарбонил-изоксазолил)-7-метилпиразоло[5,1-с][1,2,4]триазин (метилпиразолотриазин 1, МПТА 1); 3-(4'-Метоксикарбонил-тиадиазолил)-7-метилпиразоло[5,1-с][1,2,4]триазин (метилпиразолотриазин 2, МПТА 2); 6,8-Диметокси-2-(п-толил)пиразоло[5,1-с][1,2,4]бензо[е]триазин (пиразодобензотриазин 1, ПБТА 2); 6,8-Диметокси-2-(п-хлорфенил)пиразоло[5,1-с][1,2,4]бензо[е]триазин (пиразодобензотриазин 2, ПБТА 2), синтезированных в Уральском федеральном университете имени первого Президента России Б.Н. Ельцина. Как видно из структурных формул соединений, МПТА 1 и МПТА 2 в своей основе содержат молекулу метилпиразолотриазина, а ПБТА 1 и ПБТА 2 являются производными пиразодобензотриазина (рис. 1).

Чистота тестируемых соединений по результатам спектрального анализа, проведенного при их синтезе, составила от 96,2 до 98,1 %. Темозоломид производства АО «Исследовательский институт химического разнообразия» (Россия, серия 04630030160045, годен до 20.10.26) был использован в качестве препарата сравнения.

Исследование проводили на трех линиях клеток РМЖ человека, полученных из Банка клеточных линий Института цитологии РАН (Санкт-Петербург): MCF-7 — линия клеток РМЖ люминального типа, положительная по рецепторам эстрогена и прогестерона и отрицательная по рецепторам HER2; MDA-MB-231, представленная клетками тройного негативного РМЖ базального типа и общепризнанная в качестве тест-системы для тестирования потенциальных химиотерапевтических средств; BT-474 является клеточной моделью тройного позитивного РМЖ люминального типа с наиболее неблагоприятным клиническим прогнозом. Для определения влияния исследуемых веществ на нетрансформированные клетки использовали

линию MCF-10a люминального эпителия молочной железы человека. После размораживания клеток их дважды отмывали в растворе Хенкса, осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 500 g. Клетки культивировали в CO<sub>2</sub> инкубаторе MCO-19M производства Sanyo (Япония) во флаконах емкостью 10 мл 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) при температуре 37 °С в присутствии 5 % CO<sub>2</sub> в газовой фазе до получения монослоя. После этого удаляли питательную среду, переводили клетки в суспензию с помощью 0,25 % раствора трипсин-ЭДТА, осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 500 g, ресуспензировали в питательной среде и перемещали на 96-луночные планшеты из расчета 10<sup>4</sup> клеток в 100 мкл на лунку для проведения тестов.

Для определения ЦТА использовали метилтетразолиевый тест [9] в модификации [10], конкретизирующей оптимальное число высеваемых клеток и время адаптации и инкубации с учетом особенностей клеток РМЖ. Конечная концентрации тестируемых веществ в лунках составила 0,25; 1,0; 2,5; 5,0 и 10,0 мкмоль/л. Эти концентрации были ранее подобраны эмпирически при тестировании других производных азолоазинов [11]. Отрицательный контроль содержал 1 % раствор ДМСО, положительный контроль — 10 % раствор ДМСО. После раскапывания планшетов их инкубировали в течение 1 ч при 37 °С, затем заменяли среду на 1 % раствор метилтетразолия, инкубировали еще 2 ч для выпадения кристаллов формазана, которые растворяли в 96 % растворе ДМСО. Оптическую плотность конечных растворов в лунках измеряли на планшетном фотометре MARK (BioRad, США) при 530 нм, из которой сразу вычитали фоновую плотность при 620 нм. Рассчитывали процент жизнеспособных клеток как отношение

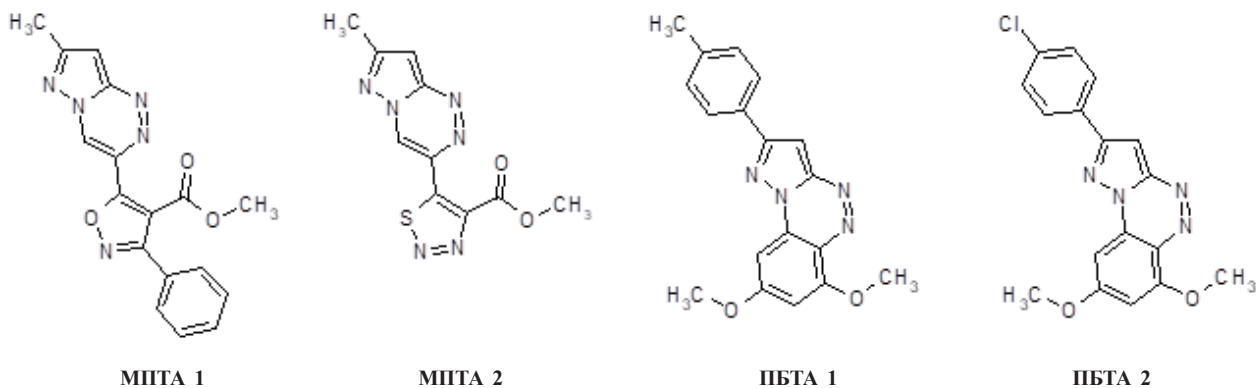


Рис. 1. Структурные формулы тестируемых производных метилпиразолотриазина и пиразодобензотриазина

оптической плотности образца и отрицательного контроля в %. Концентрацию вещества, вызывающего 50 % гибель клеток ( $IC_{50T}$ , мкмоль/л) рассчитывали, используя программное обеспечение OriginLab Corporation (США).

По современным представлениям, цитостатический механизм, заключающийся в сдерживании пролиферации опухолевых клеток, является клинически более эффективным, так как не вызывает усиления вторичного опухолевого роста за счет заселения освободившегося пространства и расселения клеток по организму. Поэтому препарат должен обладать не только ЦТА, но и цитостатическим потенциалом [12]. Для определения ЦСА использовали аналогичный протокол, но для первоначального выращивания высевали в 96-луночные планшеты по 5000 клеток в 100 мкл питательной среды эмпирически подобранное время тестирования составило 72 ч. ЦСА определяли как отношение оптической плотности в лунках с тестируемыми соединениями и лунках с отрицательным контролем, рассчитывали концентрацию вещества, вызывающего 50 % торможение пролиферации клеток ( $IC_{50S}$ , мкмоль/л). Подобный вариант использования метилтетразолиевого теста достаточно распространен при фенотипическом скрининге потенциальных противоопухолевых веществ [13].

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

## Результаты

*Цитотоксическая активность исследуемых веществ.* Сравнение ЦТА и ЦСА четырех новых производных пиразолотриазина на клеточных

культурах трех различных молекулярно-генетических типов РМЖ показало, что, несмотря на сходную структуру и физико-химические свойства, эти соединения проявляют неодинаковую активность в отношении опухолевых клеток.

В отношении опухолевых клеток МСF-7 МПТА 1 демонстрировал умеренный цитотоксический эффект при концентрациях 5,0 и 10,0 мкмоль/л, сопоставимый с препаратом сравнения темозоломидом. МПТА 2 и ПБТА 4 обладали меньшей ЦТА, у ПБТА 1 она практически отсутствовала (табл. 1).

Для клеток линии MDA-MB-231 снижение процента жизнеспособных клеток при воздействии тестируемых соединений во всех случаях превышало эффект препарата сравнения. При в целом близких величинах показателя максимальной ЦТА была зафиксирована для ПБТА 1 и достигалась при концентрации соединения 10,0 мкмоль/л.

В культуре опухолевых клеток BT-474 введение МПТА 1 и МПТА 2 сопровождалось снижением процента жизнеспособных клеток в 2,5 раза, что превышало аналогичный эффект темозоломида в среднем в 1,39 раза. Соединения ПБТА 1 и ПБТА 2 демонстрировали меньшую ЦТА по сравнению с МПТА 1 и МПТА 2 и сопоставимую с препаратом сравнения. Все описанные эффекты были достигнуты при концентрациях пиразолотриазинов 10,0 мкмоль/л.

МПТА 1 в умеренной степени вызвал снижение жизнеспособности неопухолевых клеток линии MCF-10a на всем диапазоне концентраций, минимальный процент жизнеспособных клеток наблюдался при концентрациях 5,0 и 10,0 мкмоль/л. МПТА 2, ПБТА 1, ПБТА 2 и препарат сравнения имели более низкую ЦТА, минимальная жизнеспособность клеток линии MCF-10a при их введении колебалась в узком диапазоне от 67 до 76 %. В этом случае максимальные эффекты достигались при использовании концентраций, равных 5,0 мкмоль/л (МПТА 2 и ПБТА 1) или 10,0 мкмоль/л (МПТА 1, ПБТА 2, темозоломид).

**Таблица 1. Процент жизнеспособных клеток ( $Me [Q1 \div Q3]$ ) после введения в культуральную среду максимально токсической дозы тестируемых соединений (10,0 мкмоль/л)**

Соединение	Клеточная линия			
	MCF-7	MDA-MB-231	BT-474	MCF-10a
Метилпиразолотриазин 1	47 [42 ÷ 53] #	52 [45 ÷ 57] \$	39 [35 ÷ 42] *#	59 [52 ÷ 65]
Метилпиразолотриазин 2	61 [55 ÷ 67] *	44 [39 ÷ 48] *#	40 [35 ÷ 44] *#	67 [60 ÷ 75]
Пиразолобензотриазин 1	88 [79 ÷ 97] *\$	40 [35 ÷ 42] *#	56 [50 ÷ 63] #\$	76 [70 ÷ 85] \$
Пиразолобензотриазин 2	70 [63 ÷ 79] *\$	45 [40 ÷ 51] *#	50 [43 ÷ 56] #\$	72 [65 ÷ 80]
Темозоломид	41 [36 ÷ 45] #	61 [55 ÷ 68]	55 [48 ÷ 61] #	69 [62 ÷ 75]

В этой и следующей таблице: \* — статистически значимые различия со значениями при воздействии темозоломида, # — различия между значениями в культурах опухолевых и неопухолевых клеток, \$ — различия между максимально активной и остальными производными в одной культуре.

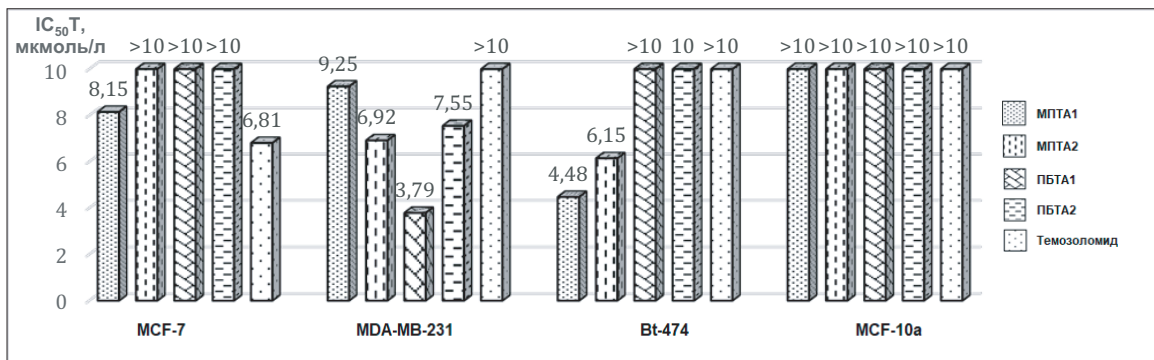


Рис. 2. Концентрация, вызывающая 50 %-ную гибель клеток (IC<sub>50T</sub>, мкмоль/л) после введения в культуральную среду тестируемых соединений

Таблица 2. Жизнеспособность клеток (Ме [Q1÷Q3], %, по отношению к отрицательному контролю) после введения в культуральную среду максимально токсической дозы тестируемых соединений (10,0 мкмоль/л)

Показатель	Клеточная линия			
	MCF-7	MDA-MB-231	BT-474	MCF-10a
Метилпиразолотриазин 1	43 [38 ÷ 47] **	42 [37 ÷ 48] **	40 [34 ÷ 45] **	71 [63 ÷ 78]
Метилпиразолотриазин 2	38 [34 ÷ 43] **	36 [33 ÷ 41] **	35 [33 ÷ 39] **	67 [60 ÷ 75]
Пиразолобензотриазин 1	42 [38 ÷ 47] **	55 [49 ÷ 62] **\$	46 [41 ÷ 52] **	75 [67 ÷ 84]
Пиразолобензотриазин 2	46 [41 ÷ 52] **	44 [40 ÷ 49] **	41 [35 ÷ 47] **	69 [61 ÷ 77]
Темозоломид	55 [48 ÷ 60] #	54 [48 ÷ 60] *	46 [39 ÷ 51] **	69 [62 ÷ 77]

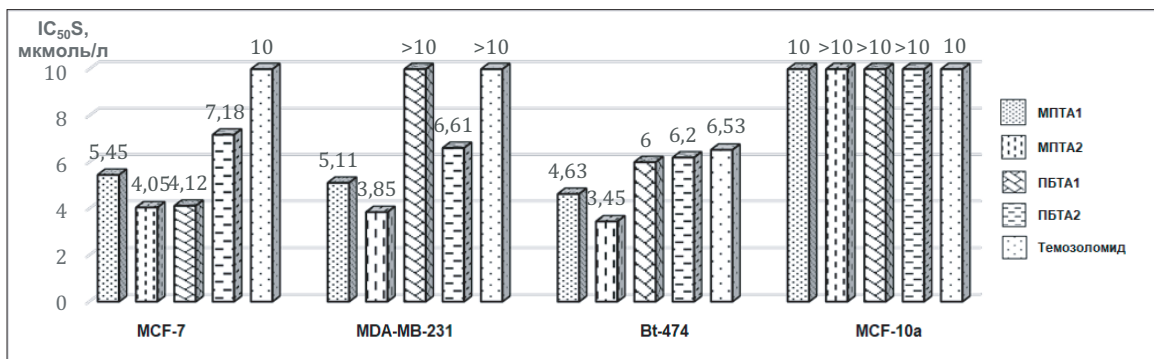


Рис. 3. Концентрация вещества, вызывающего 50 %-ное торможение роста клеток (IC<sub>50S</sub>, мкмоль/л)

Расчет концентрации вещества, вызывающей 50 % гибель клеток (IC<sub>50T</sub>) для линии MCF-7, показал, что только для МПТА 1 и темозоломида она менее 10 мкмоль/л. В остальных случаях расчетная IC<sub>50T</sub> не была достигнута, поскольку превышала максимальную концентрацию тестируемых соединений, что свидетельствует в этих случаях о меньшей ЦТА (рис. 2).

В отношении опухолевых клеток линии MDA-MB-231 по результатам расчета IC<sub>50T</sub> максимальным эффектом обладал ПБТА 1, несколько меньшим эффектом — МПТА 2 и ПБТА 2, минимальным — МПТА 1 и препарат сравнения Темозоломид.

Для клеток тройного негативного РМЖ BT-474 самая низкая IC<sub>50T</sub> была показана для МПТА 1, несколько меньшей активностью обладал МПТА 2; остальные соединения, включая

темозоломид, продемонстрировали величины показателя выше 10,0 мкмоль/л, что свидетельствовало о сравнительно меньшей ЦТА в отношении клеток данной линии.

В отношении неопухолевых эпителиальных клеток линии MCF 10a все исследованные соединения показали меньшую цитотоксичность, их IC<sub>50T</sub> лежала за пределами диапазона измерения 10,0 мкмоль/л.

*Цитостатическая активность исследуемых веществ.* Процент жизнеспособных клеток после введения темозоломида в опухолевых культурах варьировал в пределах от 46 до 55 % при концентрации 10,0 мкмоль/л и был несколько выше в культуре MCF-10a (табл. 2).

В культуре клеток MCF-7 минимальная жизнеспособность при добавлении тестируемых соединений препаратов достигалась при кон-

центрации 10 мкмоль/л и оказывалась ниже, чем при использовании препарата сравнения, в 1,20–1,45 раза, различия ЦСА между исследованными азолотриазинами практически отсутствовали.

В отношении клеток линии MDA-MB-231 препараты проявили сходную ЦСА, максимальная величина которой достигалась при концентрации соединений 10 мкмоль/л. При введении МПТА 1, МПТА 2 и ПБТА 2 цитостатический эффект превышал аналогичный у препарата сравнения в 1,23–1,50 раза, для ПБТА 1 его величина была сходной с таковой у темозоломида.

Клетки линии BT-474 продемонстрировали примерно ту же чувствительность к тестируемому производному метилпиразолотриазина и пиразолобензотриазина. ЦСА после добавления в среду МПТА 1, МПТА 2 и ПБТА 2 оказывалась в 1,12–1,31 раза выше, чем у препарата сравнения, после добавления ПБТА 1 — сопоставимой с его эффектом.

При добавлении тестируемых соединений к культуре неопухолевых клеток MCF 10a ЦСА регистрировалась как близкая (МПТА 2 и ПБТА 2) или несколько ниже, чем у темозоломида (МПТА 1 и ПБТА 1).

Концентрация, вызывающая 50 %-ное торможение роста клеток ( $IC_{50}$ ) при использовании препарата сравнения, оказалась меньше 10,0 мкмоль только в культуре линии BT-474, в остальных случаях она была равна этой величине или превышала ее (рис. 3).

Расчет  $IC_{50}$  тестируемых соединений в культурах линии MCF-7 показал, что у МПТА 1, МПТА 2 и ПБТА 1 она варьирует в пределах от 4,05 до 5,45 мкмоль/л, несколько ниже — у ПБТА 2, хотя и в этом случае ниже, чем у темозоломида.

В отношении опухолевых клеток линии MDA-MB-231 только МПТА 1 и МПТА 2 проявляли достаточно высокую ЦСА. Для ПБТА 2 она была ниже, а в двух остальных случаях расчетная  $IC_{50}$  не была достигнута, поскольку превышала максимальную концентрацию тестируемых соединений.

Для клеток BT-474 самая низкая  $IC_{50}$  была показана для МПТА 2, несколько большие величины показаны для МПТА 1 и ПБТА 1, остальные соединения, включая темозоломид, продемонстрировали величины показателя выше 6 мкмоль/л, что соответствует еще меньшей ЦСА.

Все исследованные производные метилпиразолотриазина и пиразолобензотриазина продемонстрировали относительно низкую ЦСА в отношении неопухолевых эпителиальных клеток линии MCF-10a, их  $IC_{50}$  лежала за пре-

делами диапазона измерения 10,0 мкмоль/л. Выявленные эффекты производных метилпиразолотриазина и пиразолобензотриазина в отношении нетрансформированных эпителиальных клеток молочной железы человека являются для нас важными, так как позволяют предполагать невысокую интенсивность воздействия соединений на эпителий окружающих опухоль тканей и относительно низкий уровень побочных реакций.

Как видно из представленных результатов, в отношении клеток линии MCF-7 все тестируемые соединения проявили ЦСА, превышающую таковую у темозоломида, но в культурах MDA-MB-231 и BT-474 подобной активностью обладали только МПТА 1 и МПТА 2.

### Обсуждение

Важно, что для одного и того же сочетания «клеточная линия — тестируемый пиразолотриазин» значения ЦСА практически во всех случаях были выше значений ЦТА. Эти данные сопоставимы с аналогичными различиями, показанными для изученных нами ранее новых производных имидазотетразина [11], а также экспериментальными значениями, полученными *in vitro* при изучении других алкилирующих соединений [14, 15] и подтверждают важную роль цитостатического механизма в реализации фармакологических эффектов этих соединений. Тот факт, что значения ЦСА для ряда производных были значительно выше, чем для темозоломида, является лишним подтверждением необходимости замены его на новые, более эффективные пиразолотриазины.

Соотношение ЦТА и ЦСА является крайне важным для итоговой эффективности противоопухолевого препарата. Цитотоксический механизм позволяет ликвидировать опухолевые клетки и уменьшить объем первичной опухоли, метастатических очагов и свести к минимуму количество циркулирующих опухолевых клеток. Но освободившееся пространство занимают клетки, резистентные к данному механизму и наблюдается рецидив опухоли. Полихимиотерапия, а желательнее — один препарат, должен сочетать в себе два механизма противоопухолевого действия: сильное цитотоксическое и не меньшее по выраженности цитостатическое воздействие на клетки [16, 17]. Именно это мы наблюдали при тестировании новых производных метилпиразолотриазина и пиразолобензотриазина.

Известными причинами, вызывающими различия в противоопухолевых эффектах гомологичных молекул, являются, во-первых, особенности их распределения в организме и в клетки-мише-

ни, во-вторых, способность проникать в них и проявлять основной фармакологический эффект [18]. Последний механизм и может быть протестирован в экспериментах *in vitro*.

В исследованных соединениях МПТА 1 и МПТА 2 различались наличием у первого производного фенильной группы и изоксалильного кольца в составе основного заместителя, тогда как у МПТА 2 имелось кольцо тиадиазолила, а фенильная группа отсутствовала. ПБТА 1 и ПБТА 2 имели в своей основе 6,8-Диметокси-[5,1-с][1,2,4]бензо[е]триазин и различались наличием метилбензола и хлорбензола в качестве заместителей (рис. 1).

По-видимому, различия в структуре основного пиразолотриазина и явились причиной более высокой активности МПТА 1 и МПТА 2 по сравнению с ПБТА 1 и ПБТА 2, а более высокая их активность в отношении разных клеточных линий (MCF-7 и MDA-MB-231 для ПТА 1 и ВТ-474 — для ПТА 2) может объясняться различиями в структуре заместителя. Часть различий в чувствительности исследованных клеточных линий к производным пиразолотриазина, по-видимому, связана с различной экспрессией на их мембранах трех ключевых маркеров: рецепторов эстрогена, прогестерона и HER2. Выяснение конкретных механизмов этих эффектов, безусловно, требует отдельного дальнейшего исследования на молекулярно-генетическом уровне.

Перспективы дальнейших исследований видятся, во-первых, в дальнейшем доклиническом исследовании соединения-лидера, а также в расширении исследований клеточных линий другого гистогенеза и локализации.

По результатам тестирования цитотоксичности и цитостатических свойств *in vitro* на трех культурах клеток РМЖ человека и культуре неопухолевых клеток MCF-10a четырех новых производных бензолоазолотриазина против препарата сравнения Темозоломида показано, что все вещества обладают ЦТА и ЦСА и могут быть расположены в следующем порядке по возрастанию активности: метилпиразолотриазин 2, пиразолобензотриазин 1 < темозоломид < пиразолобензотриазин 2 < метилпиразолотриазин 1. Последнее производное, (3-(3'-Фенил-4'-метоксикарбонил-изоксазолил)-7-метилпиразоло[5,1-с][1,2,4]триазин), таким образом, является лидером среди протестированных новых соединений и рекомендуется для дальнейших доклинических испытаний. В качестве отдельного момента необходимо отметить высокую чувствительность клеток линии тройного негативного РМЖ ВТ-474 к метилпиразолотриазину 2 (3-(4'-Метоксикарбонил-тиадиазолил)-7-метилпиразоло[5,1-с][1,2,4]триазину).

## Заключение

1. Соединение МПТА 1 проявило цитотоксическое действие в отношении клеток линии MCF-7 ( $IC_{50}$  8,15 мкмоль/л), соединение ПБТА 1 — в отношении линии MDA-MB-231 ( $IC_{50}$  3,79 мкмоль/л), соединения МПТА 1 и МПТА 2 — в отношении ВТ474 ( $IC_{50}$  4,48 и 6,15 мкмоль/л соответственно).

2. Соединения МПТА 1, МПТА 2 и ПБТА3 демонстрируют цитостатическое действие в отношении клеток линии MCF-7 ( $IC_{50}$  4,12–5,45 мкмоль/л), соединения МПТА 1 и МПТА 2 — в отношении линии культуры клеток MDA-MB-231 ( $IC_{50}$  3,85 и 5,11 мкмоль/л), все исследованные производные метилпиразолотриазина и пиразолобензотриазина — в отношении клеток ВТ474 ( $IC_{50}$  3,45–6,20 мкмоль/л).

3. По совокупности ЦТА и ЦСА наиболее перспективным для дальнейшего изучения является соединение МПТА 1 — 3-(3'-Фенил-4'-метоксикарбонил-изоксазолил)-7-метилпиразоло[5,1-с][1,2,4]триазин.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Финансирование

Исследование не имело спонсорской поддержки.

### Funding

The work was performed without external funding.

### Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА в редакции 2013 г. Проведение данной работы одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, протокол № 2021/049 от 27.05.2021.

### Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study was conducted in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki (2013 revision). The study protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee of Volgograd State Medical University (Protocol No. 2021/049, dated May 27, 2021).

### Участие авторов

Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE.

Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.

### Authors' contributions

All authors confirm that their contributions comply with the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) authorship criteria.

All authors have read and approved the final version of the manuscript prior to its submission and agree to be accountable for all aspects of the work, implying proper investigation and resolution of issues related to the accuracy or integrity of any part of the work.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bray F, Laversanne M, Sung H., et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024; 74(3): 229-263.-DOI: 10.3322/caac.21834.
2. Giaquinto A., Sung H., Newman L., et al. Breast cancer statistics 2024. *CA Cancer J Clin.* 2024; 74(6): 477-495.-DOI: 10.3322/caac.21863.
3. Zhukova L.G., Andreeva I.I., Zavalishina L.E., et al. Breast cancer. *Modern Oncology.* 2021; 23(1): 5-40.-DOI: 10.2644/2/18151434.2021.1.200823.
4. 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.
5. Mehmood S., Faheem M., Ismail H., et al. Breast cancer resistance likelihood and personalized treatment through integrated multiomics. *Front Mol Biosci.* 2022; 9: 783494.-DOI: 10.3389/fmolb.2022.783494.
6. 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.
7. 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.
8. Horishny V., Mandzyuk L., Lytvyn R., et al. Synthesis and biological activity of pyrazolo[1,5-c][1,3]benzoxazines containing a thiazolidin-4-one fragment. *Russ J Org Chem.* 2020; 56(4): 588-595.-DOI: 10.1134/S1070428020040053.
9. Stockert J.C., Horobin R.W., Colombo L.L., et al. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica.* 2018; 120(3): 159-167.-DOI: 10.1016/j.acthis.2018.02.005.
10. Яковлев Д.С., Султанова К.Т., Золотова Е.А., et al. Оптимизация МТТ-теста для определения цитотоксичности новых химических соединений на клеточной линии MCF-7. *Волгоградский научно-медицинский журнал.* 2020; (1): 58-61.-DOI: 10.24412/1995-7225-2020-1-58-61. [Yakovlev D. S., Sultanova K. T., Zolotova E. A., et al. Optimization of MTT assay for evaluation of cytotoxicity of new chemical compounds on MCF-7 cell line. *Volgograd Sci Med J.* 2020; (1): 56-61.-DOI: 10.24412/1995-7225-2020-1-58-61 (In Rus)].
11. 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. *Res Results Pharmacol.* 2024; 10(3): 33-42.-DOI: 10.18413/rppharmacology.10.479.
12. Roy M., Fowler A.M., Ulaner G.A., et al. Molecular classification of breast cancer. *PET Clinics.* 2023; 18(4): 441-458.-DOI: 10.1016/j.cpet.2023.04.002.
13. Ghasemi M., Turnbull T., Sebastian S., Kempson I. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(23): 12827.-DOI: 10.3390/ijms222312827.
14. Ayyagari V.N., Hsieh Th.J., Diaz-Sylvester P.L., et al. Evaluation of the cytotoxicity of the Bithionol – Cisplatin combination in a panel of human ovarian cancer cell lines. *BMC Cancer.* 2019; 17: 49.-DOI: 10.1186/s12885-016-3034-2.
15. Косьянова А.А., Брюховецкий И.С. Клофазимин и целекоксиб усиливают противоопухолевое действие темозоломида на модели глиобластомы in vitro. *Дальневосточный медицинский журнал.* 2023; (4): 39-47.-DOI: 10.35177/1994-5191-2023-4-7. [Kosianova A.A., Bryukhovetskiy I.S. The effect of drugs with proven WNT-inhibiting properties on the antitumor activity of temozolomide *Far Eastern Med J.* 2023; (4): 39-47.-DOI: 10.35177/1994-5191-2023-4-7 (In Rus)].
16. Grasselly C., Denis M., Bourguignon A., et al. The antitumor activity of combinations of cytotoxic chemotherapy and immune checkpoint inhibitors is model-dependent. *Front Immunol.* 2018; 9: 2100.-DOI: 10.3389/fimmu.2018.02100.
17. Anttila J.V., Shubin M., Cairns J., et al. (2019) Contrasting the impact of cytotoxic and cytostatic drug therapies on tumour progression. *PLoS Comput Biol.* 2019; 15(11): 1007493.-DOI: 10.1371/journal.pcbi.1007493.
18. Hussein M.M.A., Abdelfattah-Hassan A., Eldoumani H., et al. Evaluation of anti-cancer effects of carnosine and melittin-loaded niosomes in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Front Pharmacol.* 2023; 14: 1258387.-DOI: 10.3389/fphar.2023.1258387.

Поступила в редакцию / Received / 23.07.2025

Прошла рецензирование / Reviewed / 19.10.2025

Принята к печати / Accepted for publication 18.12.2025

## Сведения об авторах / Author's information / ORCID

Ахмед Хамид Хумаири / Al-Humairi Ahmed Hamid / ORCID ID: 0000-0001-7545-8567; SPINcode: 8688-3027.  
Валерий Валерьевич Новочадов / Valeriy V. Novochadov / ORCID ID: 0000-0001-6317-7418; SPINcode: 2712-7366.

Надежда Викторовна Чердынцева / Nadezda V. Cherdyntseva / ORCID ID: 0000-0003-1526-9013; SPINcode: 5344-0990.

Владимир Васильевич Удут / Vladimir V. Udut / ORCID ID: 0000-0002-3829-7132; SPINcode: 8645-9815.

