

E.D. Kubasova - Candidate of Sciences (Biology), Associate Professor

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):  
uralskaya5@gmail.com

УДК 616-006.66

## ИЗУЧЕНИЕ НОВЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВЕЩЕСТВ НА ОСНОВЕ АНАЛОГА ТЕМОЗОЛОМИДА - ИМИДАЗОТЕТРАЗИНА В УСЛОВИЯХ IN VITRO И IN VIVO

Хумаири Ахмед Хамид, Леонид Дмитриевич Сперанский

Кафедра онкологии, гематологии и трансплантологии

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения РФ

Волгоград, Россия

### Аннотация

**Введение.** Рак молочной железы – самая частая опухоль, выявляемая у женщин. Общеизвестные противоопухолевые препараты недостаточно эффективны. Перспективными и эффективными средствами могут являться химические вещества, синтезированные на основе имидазотетразина. **Цель исследования** - оценить противоопухолевую активность 11 новых производных имидазотетразина, являющиеся аналогами темозоломида, используя клеточную культуру MCF-7 *in vitro* и *in vivo*. **Материал и методы.** Цитотоксические эффекты оценивались *in vitro* на клеточной культуре РМЖ - MCF-7 с помощью МТТ-теста. Определение противоопухолевой активности *in vivo* проведено в соответствии с биоэтическими нормами. Исследования по изучению влияния веществ на ксеногенной модели опухоли выполнены на мышах BALB/c с перевитой ортотопически MCF-7. Степень дифференцировки и распространенность опухоли в ткани, а также характер метастазирования исследовали с помощью анализа гистологических срезов после выведения животных из эксперимента. **Результаты.** На основании проведенных исследований противоопухолевая активность тестируемых соединений была расположена в ряду: производное 4; производное 9; производное 6  $\geq$  эпирубицин. То есть наиболее активным соединением, вызывающим торможение роста опухоли *in vivo* на 60,8%, оказалось производное 4. **Выводы.** Полученные данные указывают на несомненную перспективность исследуемых соединений при разработке эффективных и безопасных противоопухолевых препаратов.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, цитотоксическая активность, клеточная линия MCF-7, имидазотетразин, ксеногенные модели.

## STUDY OF NEW IMIDAZOTETRAZINE-BASED ANTITUMOR AGENTS - TEMOZOLOMIDE ANALOGUES UNDER IN VITRO AND IN VIVO CONDITIONS

Al-Humairi Ahmed Hamid, Leonid D. Speransky

Department of Oncology, Hematology and Transplantology,

Volgograd state medical university  
Volgograd, Russia

## Abstract

**Introduction.** Breast cancer is the most common tumor diagnosed in women. Well-known anticancer drugs are not effective enough. Chemical substances synthesized on the basis of imidazotetrazine can be promising and effective agents. **The purpose of the study** is to evaluate the antitumor activity of 11 new imidazotetrazine derivatives, which are analogues of temozolomide, using MCF-7 cell culture *in vitro* and *in vivo*. **Material and methods.** Cytotoxic effects were evaluated *in vitro* on BC cell culture - MCF-7 using the MTT test. The determination of antitumor activity *in vivo* was carried out in accordance with bioethical standards. Studies on the effect of substances on a xenogenic tumor model were performed on BALB/c mice with orthotopically transplanted MCF-7. The degree of differentiation and spread of the tumor in the tissue, as well as the nature of metastasis, were studied using the analysis of histological sections after the animals were removed from the experiment. **Results.** Based on the studies, the antitumor activity of the tested compounds was located in the series derivative 4; derivative 9; derivative 6  $\geq$  epirubicin. It means that derivative 4 turned out to be the most active compound, causing inhibition of tumor growth *in vivo* by 60,8%. **Conclusions.** The data obtained point to the undoubted promise of the studied compounds in the development of effective and safe antitumor drugs.

**Keywords:** breast cancer, cytotoxic activity, MCF-7 cell line, imidazotetrazine, xenogeneic models.

## ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) относится к наиболее распространенным и опасным видам злокачественных опухолей у женщин, составляя 23% от общего числа случаев и 14% смертей от опухолей, что делает чрезвычайно актуальными научные исследования в этой области [1]. В 2020 году РМЖ определялся в каждом восьмом случае злокачественных новообразований, заболевание было выявлено у 2,3 млн. человек, а 685 тысяч от него скончались [2]. Химиотерапия активно используется на всех стадиях лечения РМЖ, в том числе в составе комбинированных схем [3]. Общеизвестные противоопухолевые препараты недостаточно эффективны, высокотоксичны, быстро развивается химиорезистентность опухолевых клеток [4]. Значительный прогресс в лечении рака пока еще не обеспечивает должного снижения роста заболеваемости РМЖ, что актуализирует поиск новых вариантов терапии этой нозологии [5]. Перспективными и эффективными средствами могут быть химические вещества, синтезированные на основе имидазотетразина, являющиеся аналогами митозоломида и темозоломида. Эти препараты относятся к алкилирующим агентам и широко используются в химиотерапии опухолей [6].

**Цель исследования** - оценить противоопухолевую активность 11 новых производных имидазотетразина, которые являются аналогами темозоломида, используя клеточную культуру MCF-7 *in vitro* и *in vivo*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для оценки потенциальных противоопухолевых свойств были использованы 11 производных имидазотетразина. Препаратом сравнения являлся эпирубицин. Как основная клеточная линия РМЖ человека использовалась MCF-7, которая является самой популярной линией для исследования цитотоксичности противоопухолевых соединений и молекулярных особенностей протекания рака молочной железы. Клетки имеют эпителиоподобное строение, экспрессируют рецепторы к эстрогенам, могут синтезировать эстрадиол, что делает их оптимальными мишенями для изучения рецепторов и новых препаратов химиотерапии.

Для определения цитотоксичности MCF-7 культивировали согласно стандартному протоколу. В каждую лунку планшета помещали 100 мкл суспензии (104 клеток) и добавляли исследуемые вещества в необходимых конечных концентрациях – 0,25; 1,0; 2,5; 5,0 и 10,0 мкмоль/л. Помимо этого, на планшете были: отрицательный контроль, растворитель 1% ДМСО и положительный контроль (10% ДМСО). Планшет с внесенными соединениями помещали на 1 ч в CO<sub>2</sub>-инкубатор.

Для выявления жизнеспособности клеток использовали МТТ-тест. Определяли концентрацию тестируемого соединения, при которой наступало максимальное подавление жизнеспособности клеток от контроля. Концентрацию вещества, которая вызывает 50% гибель клеток (IC50), рассчитывали графически по дозозависимой кривой с помощью программного обеспечения Origin (OriginLabCorporation).

При исследовании *in vivo* экспериментальную модель готовили путем внутрибрюшинного введения раствора азатиоприна из расчета 1 мг/кг массы тела за 3 часа до начала основного этапа эксперимента (инъекции повторяли через 24 и 48 часов). Шесть иммунодефицитных животных составили контрольную группу. На основном этапе мышам вводили в подкожную клетчатку брюшной стенки по 10<sup>6</sup> злокачественных клеток линии MCF-7. Для уменьшения прививочной дозы клеток использовали в качестве носителя Матригель. Для изучения спектра противоопухолевой активности использовали не менее двух терапевтических доз вещества, при этом уменьшение массы тела животных должно быть менее 10%. Исследование проводили с лекарственными формами веществ, рекомендованными для доклинического изучения.

Всех животных с привитыми клетками линии MCF-7 делили на шесть групп, которым через 48 часов после инъекции внутрибрюшинно вводили:

- группа сравнения (N=6) – 0,2 мл физиологического раствора;
- первая основная группа (N=6) – 0,2 мл раствора, содержащего 0,1 мкмоль/л субстанции 4; - вторая основная группа (N=6) – 0,2 мл раствора, содержащего 0,4 мкмоль/л субстанции 6; - третья основная группа (N=6) – 0,2 мл раствора, содержащего 0,1 мкмоль/л субстанции 9; - четвертая основная группа (N=6) – 0,2 мл раствора, содержащего 0,4 мкмоль/л субстанции 9; - пятая основная группа (N=6) – 0,2 мл раствора, содержащего 0,4 мкмоль/л эпирубина.

Степень дифференцировки и распространенность опухоли в ткани, а также характер метастазирования исследовали с помощью анализа

гистологических срезов после выведения животных из эксперимента. Для визуализации и морфометрического исследования клеток и тканей использовали возможности классической световой и флуоресцентной микроскопии (маркеры линии MCF-7– PR, ER- $\alpha$ , BRCA1).

Статистическую оценку результатов эксперимента *in vitro* проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса (непараметрический вариант ANOVA) с последующими множественными сравнениями по Бонферрони-Данну (пакет Statistica 10.0). Сравнение между группами проводилось по критерию Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне доверительной вероятности  $p$  меньше 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При проведении скрининговой оценки цитотоксичности 11 новых производных имидазотетразина с использованием МТТ-теста, показано, что производные 2, 3, 10 и 11 приводили к цитотоксичности, которая была ниже такового показателя у препарата сравнения-эпирубицин ( $IC_{50}$  – 9,37 мкмоль/л, максимальное подавление – 2,10).  $IC_{50}$  при тестировании этих субстанций так и не была достигнута, а величина максимального подавления варьировала в пределах 1,34–1,74. В итоге эти производные были отнесены к соединениям с отсутствующим или крайне низким цитотоксическим эффектом. Производные 1, 5, 7 и 8 показали цитотоксическую активность выше, чем у препарата сравнения. По результатам МТТ-теста производное 1 ( $IC_{50}$  – 7,72 мкмоль/л, Ск/Стах – 2,48), производное 5 ( $IC_{50}$  – 6,92 мкмоль/л, Ск/Стах – 2,84), производное 7 ( $IC_{50}$  – 5,50 мкмоль/л, Ск/Стах – 2,61) и производное 8 ( $IC_{50}$  – 8,44 мкмоль/л, Ск/Стах – 2,20) были отнесены к соединениям с умеренным цитотоксическим эффектом. Наконец, три производных были выделены, как проявляющие высокую цитотоксическую активность на всем диапазоне изучаемых концентраций. Как итог, производное 4 ( $IC_{50}$  – 0,85 мкмоль/л, Ск/Стах – 7,34), производное 6 ( $IC_{50}$  – 2,98 мкмоль/л, Ск/Стах – 4,02) и производное 9 ( $IC_{50}$  – 5,05 мкмоль/л, Ск/Стах – 3,95) были отобраны в качестве соединений с потенциально сильным противоопухолевым действием для дальнейшего исследования. Полученные в эксперименте *in vivo* результаты свидетельствовали о наличии противоопухолевой активности у всех трех выбранных тестируемых соединений. При действии эпирубицина конечная масса животных оказалась равной 89,2% от первоначальной против 83,4% в контроле, торможение роста опухоли составило 24,5%. Для производного 4 получены результаты в 101,6% и 60,8%, для производного 6 – 94,5% и 32,7%, для производного 9 – 96,9% и 38,8% соответственно. Гистологическая картина во всех сериях экспериментов свидетельствовала об уменьшении и распаде части опухолевых структур в тканях мышей. Гистологический индекс во всех группах практически не отличался от контроля (максимальное снижение при введении производного 4–9,3%), что еще раз подтверждало тот факт, что клетки, нечувствительные к примененной химиотерапии, сохраняют высокую способность к злокачественной прогрессии в организме и даже могут ее увеличивать. Таким образом, на основании проведенных исследований противоопухолевая активность тестируемых соединений была расположена в

ряду: производное 4; производное 9; производное 6  $\geq$  эпирубицин, то есть наиболее активное соединением оказалось производное 4, вызывающим торможение роста опухоли *in vivo* на 60,8%.

### **ОБСУЖДЕНИЕ**

В результате изучения цитотоксической чувствительности *in vitro* в культуре клеток рака молочной железы человека MCF-7 из 11 новых производных имидазотетразина, являющиеся аналогами темозоломида, было обнаружено, что не все вещества обладают токсическими свойствами, несмотря на сходную химическую структуру и механизм действия на клетку. Возможным механизмом генотоксического эффекта является метилирование в N<sub>7</sub> и O<sub>6</sub> гуанина и O<sub>3</sub> аденина. При возникшем повреждении в ДНК встраивается тимидин вместо цитозина. Такие нарушения ведут к нарушению синтеза белка репарации ДНК, что ведет к гибели клетки [7]. Наиболее токсичными соединениями против клеток MCF-7 являются производные 4,6 и 9 с показателями цитотоксичности в 11,0 и 3,1 раза выше по сравнению с таковыми у препарата сравнения - эпирубицина. При определении связи «структуры-эффекта» показано, что имидазолпиримидиновое ядро, входящее в состав имидазотетразина, в большей степени способствует повышению фармакологических свойств. Кроме этого, противоопухолевая активность производных 4,6,9 подтверждается на ксеногенной мышинной модели рака молочной железы человека путем ортотопической инъекции клеток MCF-7.

### **ВЫВОДЫ**

Проведенное исследование было построено по классической схеме и включало в себя последовательный анализ современного состояния проблемы, выбора необходимых методик, исследования на клеточных культурах *in vitro* цитотоксичность в сравнении с широко известным противоопухолевым препаратом эпирубицином, а также заключительную проверку основной гипотезы на лабораторных животных в модели ксеногенной трансплантации опухолевых клеток *in vivo* доказывают их высокую активность и возможность дальнейшего их изучения в качестве противоопухолевых препаратов.

### **СПИСОК ИСТОЧНИКОВ**

1. Хумаири, А.Х. Синтез и цитотоксическая активность новых производных азолотриазина при изучении на клеточных культурах / А.Х. Хумаири, Д.Л. Сперанский, Е.В. Садчикова // Химико-фармацевтический журнал. – 2022. – Т. 56, № 6. – С. 31–37.
2. Хумаири, А.Х. Развитие и расширение спектра клеточных технологий для решения проблем разработки новых лекарственных средств для лечения рака / А.Х. Хумаири // Всероссийский научный форум студентов с международным участием «СТУДЕНЧЕСКАЯ НАУКА – 2021». Forcipe. – 2021. – Т. 4, S1. – С. 629.
3. Хумаири, А.Х. Экспериментальное обоснование активности новых фармакологических композиций азолоазинов *in vitro* и *in vivo* при создании противоопухолевых препаратов в лекарственной терапии рака молочной железы / А.Х. Хумаири // Достижения и проблемы фундаментальной науки и клинической медицины: Материал международной научно-практической

конференции. – Душанбе: Таджикский государственный медицинский университет имени Абуали ибни Сино, 2021. – Т. 2. – С. 403–404.

4. Gradishar, W. Breast Cancer, Version 3.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. / W. Gradishar, B. Anderson, J. Abraham // J. Nat. Comprehensive Cancer Net. 2020;18:452–478.

5. Хумаири, А.Х. Совершенствование клеточных технологий для решения проблемы химиорезистентности в химиотерапии злокачественных опухолей молочной железы / А.Х. Хумаири // Гуманитарное и медико-биологическое образование: проблемы, перспективы, интеграция: сборник материалов Юбилейной научно-практической конференции с международным участием. – Ставрополь: Изд-во Ставропольского гос. мед. ун-та, 2021. – С. 274–279.

6. Comsa, S. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research / S. Comsa, A.M. Cimpan, M. Raica // Anticancer Res. – 2015. – Vol. 35. – P. 3147–3154.

7. Ramis, G. et al. EGFR inhibition in glioma cells modulates rho signaling to inhibit cell motility and invasion and cooperates with temozolomide to reduce cell growth / G. Ramis, E. Thomas-Moya, S.F. de Mattos // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – e38770.

#### **Сведения об авторах**

Хумаири Ахмед Хамид\* – аспирант

Л.Д. Сперанский – ассистент кафедры

#### **Information about the authors**

Al-Humairi Ahmed Hamid\* – Postgraduate student

Speransky Leonid Dmitrievch – Department assistant

**\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):**

ahmed.h.mneahil@gmail.com

**УДК 543.554.2**

### **ИЗМЕНЕНИЕ ВЕЛИЧИНЫ pH ТРАВЯНЫХ ОТВАРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ**

Ольга Николаевна Чиркова, Валерия Алексеевна Морозова, Татьяна

Анатольевна Афанасьева

Кафедра фармации и химии,

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения РФ

Екатеринбург, Россия

#### **Аннотация**

**Введение.** С каждым годом возрастает интерес к применению травяных отваров. Однако приготовленные настои имеют относительно небольшой срок хранения. **Цель исследования** - выяснить, вода какой степени очистки меньше подвержена влиянию различных условий внешней среды и определить оптимальные температурные режимы хранения отваров. **Материал и методы.** Исследование проводилось в лаборатории ФГБОУ ВО УГМУ Министерства здравоохранения РФ кафедры фармации и химии в период с 19.12.2022г.-