

А.С. Могиленских<sup>1,2</sup>, А.П. Сулонова<sup>2</sup>, С.Г. Толщина<sup>3</sup>,  
С.В. Сазонов<sup>1,2</sup>, С.М. Демидов<sup>1,2</sup>

## ВЛИЯНИЕ АЗОЛОАННЕЛИРОВАННЫХ ТЕТРАЗИНОВ НА ПЕРВИЧНУЮ КУЛЬТУРУ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И КЛЕТОЧНУЮ ЛИНИЮ SAOS

<sup>1</sup>ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФГБУ ВО Уральский государственный медицинский университет,  
г. Екатеринбург, Российская Федерация;

<sup>3</sup>Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Российская Федерация

**Резюме. Введение.** Существует большое количество противоопухолевых препаратов, однако их эффективность может снижаться из-за возникновения лекарственной резистентности и уменьшения чувствительности к терапии. Поэтому остается актуальным вопрос о разработке новых препаратов. Азолоаннелированные тетразины являются полиазотсодержащими аналогами пурина и представляют интерес как биологически активные соединения. **Материалы и методы.** В качестве модели для оценки использовались клеточные культуры двух типов: иммортализованная клеточная линия остеосаркомы (SAOS2) и первичная клеточная культура. Для всех препаратов использовалась концентрация 2 мкг/мл. Контрольная группа находилась в тех же условиях, без воздействия препарата. Окрашивание производили флуоресцентным красителем DAPI, подсчет и оценку клеток производили с помощью программы Image G. **Результаты и обсуждение.** Цитотоксический эффект только на клетки первичной культуры рака молочной железы оказал препарат KAD-33, при этом не было отмечено уменьшения клеток. В случае с SAOS, наоборот, размер клеток значительно уменьшился. Препарат KAD-40 не вызвал уменьшение размера клеток, однако количество клеток значительно уменьшилось как в культуре рака молочной железы, так и в культуре SAOS. В нашем исследовании наиболее эффективным действием на клеточные модели рака молочной железы и остеосаркомы обладала натриевая соль 6-гидрокси-3-(4-фторфенил)[1,2,4]триазоло[4,3-b][1,2,4,5]тетразина (KAD-28). **Выводы.** Полученные данные можно использовать как основу для выбора новых производных азолоаннелированных тетразинов для дальнейшего изучения их свойств на клеточных моделях и лабораторных животных как веществ с потенциальной противоопухолевой активностью.

**Ключевые слова:** азолоаннелированные тетразины, рак молочной железы, первичная культура, SAOS

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Сазонов Сергей Владимирович

prof-ssazonov@yandex.ru

Дата поступления: 31.01.2024

Образец цитирования:

Могиленских А.С., Сулонова А.П., Толщина С.Г., Сазонов С.В., Демидов С.М. Влияние азолоаннелированных тетразинов на первичную культуру клеток рака молочной железы и клеточную линию SAOS. [Электронный ресурс] Вестник уральской медицинской академической науки. 2024, Том 21, № 1, с. 62–71, DOI:10.22138/2500-0918-2024-21-1-62-71

## Введение

Онкологические заболевания являются одной из главных причин смерти среди населения [1]. Существует большое количество противоопухолевых препаратов, однако их эффективность может снижаться из-за возникновения лекарственной резистентности и уменьшения чувствительности к терапии. Поэтому остается актуальным вопрос о разработке новых препаратов [2-4].

Азоаннелированные тетразины являются полиазотсодержащими аналогами пурина и представляют интерес как биологически активные соединения. Известны примеры азолотетразинов, обладающих выраженной биологической активностью, например, противомикробной [5], противотуберкулезной [6-8], фунгистатической [9-11], противоопухолевой [12-14]. В данной работе исследована противоопухолевая активность ряда гидроксипроизводных азолотетразинов, преимуществом которых является хорошая растворимость в водных средах и, как следствие, более высокая биодоступность по сравнению с водонерастворимыми аналогами.

Для оценки активности были изучены натриевые соли 6-гидрокси-3-(4-фторфенил)[1,2,4]триазоло[4,3-b][1,2,4,5]тетразина (KAD-28), 3-гидрокси-7-пиразол-1-ил)[1,2,4]триазоло[1,5-b][1,2,4,5]тетразина (KAD-33), а также 3-гидрокси-6-изопропилтиоимидазо[1,2-b][1,2,4,5]тетразин в форме ОН-кислоты (KAD-40). Данные соединения были получены с помощью реакций нуклеофильного замещения из описанных в литературе азолотетразинов 4 [13], 5 [11], 6 [10], содержащих в тетразиновом цикле 3,5-диметилпиразолильную группу (рисунок 1).

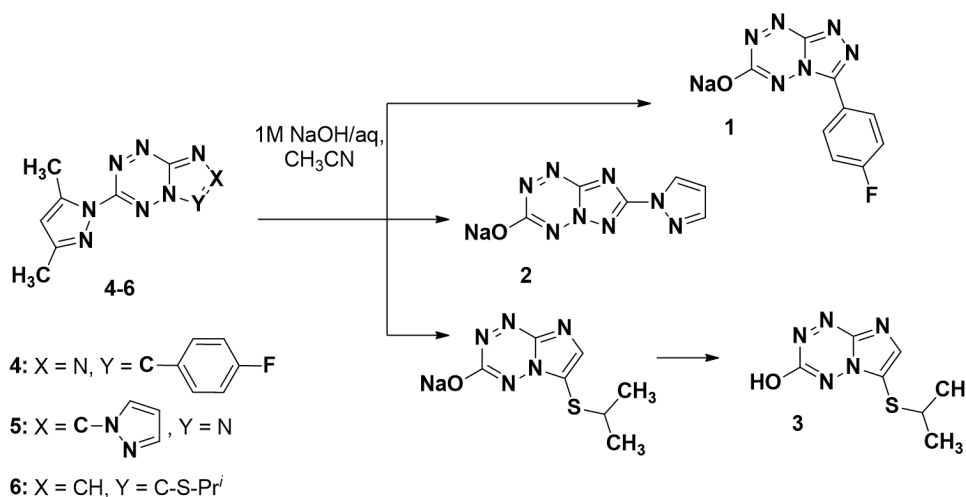


Рисунок 1. Схема получения азоаннелированных тетразинов и структуры соединений  
Fig. 1. The pattern for the preparation of azoannelated tetrazines and structure of compounds

## Материалы и методы

В качестве модели для оценки цитотоксического эффекта использовались клеточные культуры двух типов: иммортализованная клеточная линия остеосаркомы (SAOS2) и первичная клеточная культура [15]. Выбор обусловлен разной биологической природой и фенотипом данных культур. Первичная клеточная культура была использована как модель, наиболее приближенная к клиническому образцу [15-18].

Клеточные культуры культивировали в стандартных условиях (37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности). Для клеточной линии SAOS2 (остеосаркома костной ткани человека) использовалась ростовая среда ДМЕМ:F12 (Панэко, Россия) с 10%-ной бычьей сывороткой (Панэко, Россия), 0,01% гентамицина сульфата, 1% глутамина.

Первичную клеточную культуру рака молочной железы получили из хирургических образцов. Выделение клеток производилось по ранее описанной схеме [19]. Для поддержания клеточной культуры использовалась среда Mammocult™ (STEMCELL, Канада) с добавлением с 5%-ной бычьей сывороткой (ПанЭко, Россия), 0,01% гентамицина сульфата, 1% 0,5% гидрокортизона, 0,01% гепарина.

После получения монослоя клетки снимали с подложки. Во флаконы помещали раствор Триспи-на 0,25% с солями Хэнкса (ПанЭко, Россия) на 10 минут в н.у. Затем смешивали вдвое большем объеме раствора Хэнкса с 2% бычьей сывороткой и центрифугировали 1.4 RPM 5 минут. Далее

осадки растворяли в питательных средах и высаживали в 24-луночные планшеты.

Для всех препаратов использовалась концентрация 2 мкг/мл. Контрольная группа находилась в тех же условиях, без воздействия препарата.

Культивирование осуществлялось в течение 3х дней. За ростом культуры контроль осуществлялся с помощью микроскопа Eclipse TS100 (Nikon, Япония).

Далее среду сливали, клетки фиксировали глутаровым альдегидом в течение 30 минут. После промывали PBS и производили проводку по спиртам возрастающей концентрации (30%, 50%, 70%, 95%). Далее на поверхность с окрашиваемыми клетками наносили 300 мкл раствора DAPI (Thermo Fisher, США) в PBS на 5 мин при н.у. в отсутствии прямого света. Микроскопирование и фотографирование материала производили с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Lab.A1 FL (Carl Zeiss, Германия). Подсчет количества клеток по снимкам был выполнен в каждой лунке в 5 полях при 100-кратном увеличении с использованием программы «ImageJ» (Wayne Rasband, NIH, США).

Статистическая обработка результатов исследований проводилась с использованием пакета «Statistica 6.0». Для средних значений была определена ошибка среднего, стандартное отклонение, доверительный интервал. Оценка значимости различия средних значений двух несвязанных выборок осуществлялась с использованием критерия Стьюдента.

## Результаты

Среднее количество клеток в контрольной группе первичной культуры рака молочной железы составило  $732 \pm 88$  (ДИ=545-919)). При воздействии на клетки препаратов KAD28, KAD-33, KAD40 наблюдается значимое уменьшение количества клеток во всех случаях ( $t_{Эмп}=2,4$ ,  $t_{Эмп}=2,8$ ,  $t_{Эмп}=3,1$ ). Наименьшее количество клеток в культуре после воздействия KAD28 —  $266 \pm 70$  (ДИ=140-223), наибольшее после воздействия KAD40 —  $407 \pm 60$  (ДИ=281-532). При сравнении среднего размера клеток значимые различия обнаружены при воздействии KAD28. Уменьшение среднего размера клеток произошло почти в два раза: в контрольной группе значение составило  $1145 \pm 70$  (ДИ=995-1296), в группе под воздействием препарата:  $656 \pm 114$  (ДИ=338,6±973,4; рис. 2). При оценке занимаемой площади значимые различия были также обнаружены при воздействии KAD-28 и составили  $1,8 \pm 0,3\%$  (ДИ=0,9-2,7) по сравнению с контрольной группой —  $16,4 \pm 2\%$  (ДИ=11,9-21,01,  $t_{Эмп}=4,2$ ). Таким образом, уменьшение количества клеток было значимым при воздействии всех препаратов, однако уменьшение размера клеток и процента занимаемой площади произошло при воздействии KAD-28.

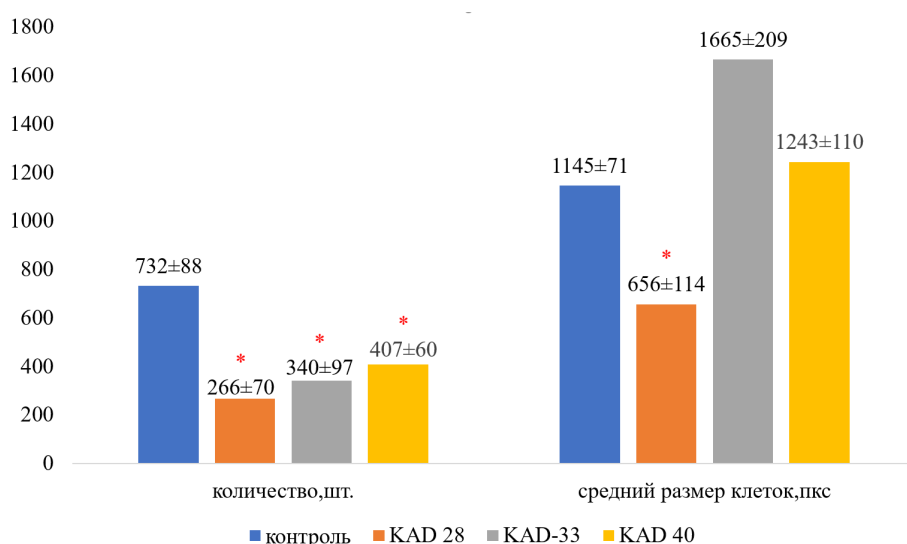


Рисунок 2. Действие препаратов в первичной культуре клеток рака молочной железы, \* значимые различия

Figure 2. The effect of drugs in the primary culture of breast cancer cells, \* significant differences

При подсчете клеток в контрольной группе клеточной культуры SAOS2 среднее количество клеток составило  $1278 \pm 294$  (ДИ=984-1572). При воздействии на клетки препаратов наименьшее влияние оказал KAD-33, нет значимых отличий ( $t_{Эмп}=0,6$ ). В двух других случаях наблюдаются зна-

чимые отличия ( $t_{Эмп}$  KAD-28=4.8,  $t_{Эмп}$  KAD-40=2.6). Однако значимое уменьшение величины клеток по сравнению с контрольной группой было обнаружено при воздействии KAD-33 (668,2;  $t_{Эмп}$ =4,3) и KAD-28 (854,5;  $t_{Эмп}$ =3,7). Препарат KAD-40 не оказал влияния на размер клеток (рис. 3). При оценке занимаемой площади значимые различия были обнаружены при воздействии KAD-28 и составили 7,3% по сравнению с контрольной группой — 13,5% ( $t_{Эмп}$ =3,9).

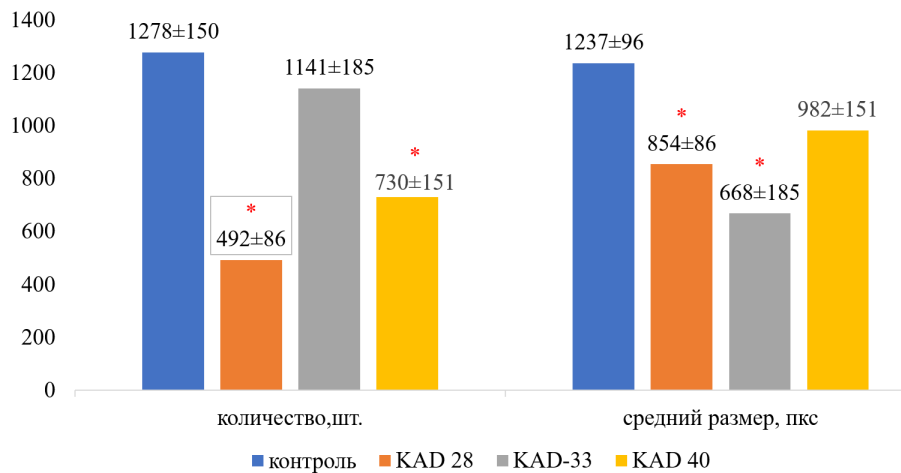


Рисунок 3. Действие препаратов в культуре SAOS, \* значимые различия  
Figure 3. The effect of drugs in the SAOS culture, \* significant differences

Таким образом, на все три параметра: количество клеток, средний размер и площадь, оказал KAD-28 (рис. 4).

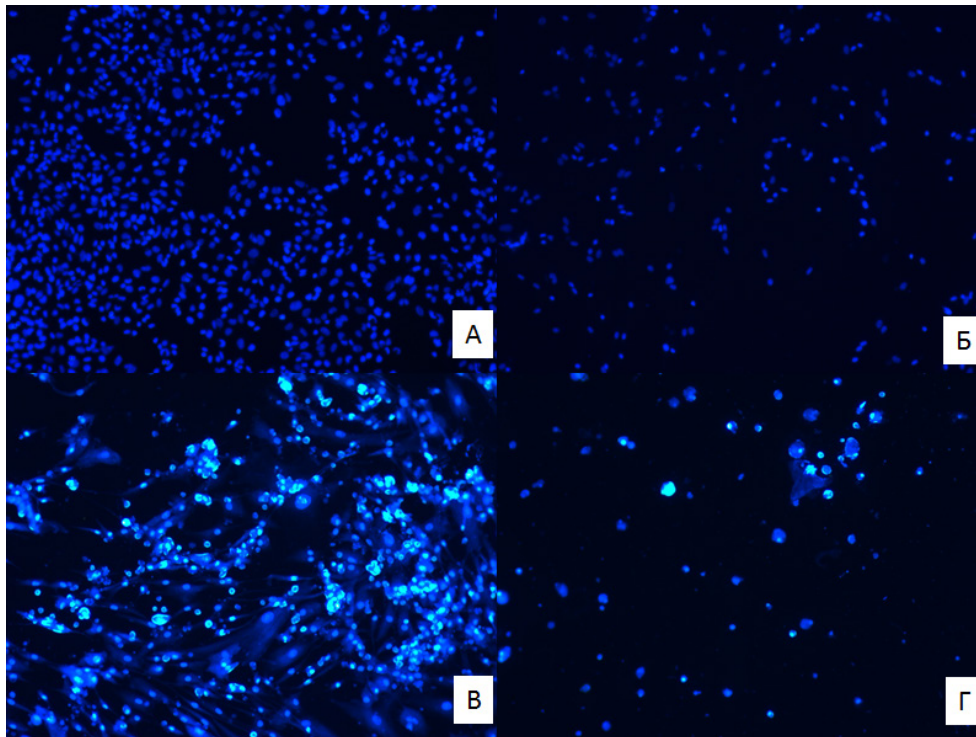


Рисунок 4. Изменение размера и количества клеток в культурах под воздействием препарата. А, Б — первичная культура клеток рака молочной железы, контроль и после воздействия KAD-28; В, Г — клеточная линия остеосаркомы, контроль и после воздействия KAD-28, флуоресцентная микроскопия, ув.100

Figure 1. Changes in the size and number of cells in cultures under the influence of the drug. A, B — primary culture of breast cancer cells, control and after exposure to CAD-28; C, D — osteosarcoma cell line, control and after exposure to CAD-28, fluorescence microscopy, magnification 100

## Обсуждение

За последние 10-15 лет различные изомерные формы тетразола (NH-незамещенные, 1H-1-замещенные и 2H-2-замещенные тетразолы) успешно использовались при разработке перспективных противоопухолевых препаратов. Перспективными противоопухолевыми агентами признаны соединения переходных металлов, содержащие тетразолы в качестве лигандов, полусинтетические тетразолильные производные природных соединений (биогенные кислоты, пептиды, стероиды, комбретастантин и т.д.), 5-оксо- и 5-тиотетразолы и некоторые другие родственные соединения [20-22].

Цитотоксический эффект только на клетки первичной культуры рака молочной железы оказал KAD-33, при этом не было отмечено уменьшения клеток. В случае с SAOS, наоборот, размер клеток значительно уменьшился.

Препарат KAD-40 не вызвал уменьшение размера клеток, однако, количество клеток значительно уменьшилось как в культуре рака молочной железы, так и в культуре остеосаркомы. Для того, чтобы определить противоопухолевую активность данных препаратов, необходимо поставить эксперимент на других клеточных линиях, в том числе не обладающих признаками опухолевой ткани.

В нашем исследовании наиболее эффективным действием на клеточные модели рака молочной железы и остеосаркомы обладает натриевая соль 6-гидрокси-3-(4-фторфенил)[1,2,4]триазоло[4,3-b][1,2,4,5]тетразина (KAD-28). Данный препарат вызывает резкое снижение численности клеточной популяции и уменьшение размеров монослоя, соответственно, влияет на способность клеток к адгезии. Уменьшение размера клеток — один из морфологических признаков апоптоза [23]. Имеются данные, что производные тетразина запускают процесс индукции апоптоза, основанной на деполяризации митохондриальной мембраны. Для подтверждения данной гипотезы относительно KAD-28 необходимы дополнительные исследования.

## Выводы

Полученные данные можно использовать как основу для выбора новых производных азолоаннелированных тетразинов для дальнейшего изучения их свойств на клеточных моделях и лабораторных животных как веществ с потенциальной противоопухолевой активностью.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Мерабишвили В.М. Состояние онкологической помощи в России: рак молочной железы среди женского населения. Заболеваемость, смертность, достоверность учета, детальная локализационная и гистологическая структура (популяционное исследование на уровне федерального округа). Вопросы онкологии. 2022. Т. 68, № 3
2. Gao L., Wu Z.X., Assara, Y.G., Chen Z.S., Wang L. Overcoming anti-cancer drug resistance via restoration of tumor suppressor gene function. Drug Resist Updat. DOI:10.1016/j.drug.2021.100770
3. Zhang H, Wang Y, Liu X, Li Y. Progress of long noncoding RNAs in anti-tumor resistance. Pathol Res Pract. 2020. 216(11). DOI:10.1016/j.prp.2020.153215.
4. Карабина Е.В., Любченко Л.Н., Давыдов М.М. Механизмы приобретенной резистентности к анти-EGFRпрепаратам при немелкоклеточном раке легкого, не связанной с мутацией T790M, и их значение в клинической практике. Успехи молекулярной онкологии 2018. 5(3).С. 17–24.
5. Shawali A. S., Tawfik N. M. Novel facile synthesis of imidazo[1,2-b][1,2,4,5]tetrazines with potential antimicrobial activity. Arch. Pharm. Res. 2009. V. 32. N 7. P. 975-982.
6. Пат. 2462466 РФ, МПК С 07 D 487/04. Замещённые азоло[1,2,4,5]тетразины – ингибиторы актинобактериальных серин-треониновых протеинкиназ. О.Б. Беккер, В.Н. Даниленко, Р.И. Ишметова, Г.Л. Русинов, С.Г. Толщина, В.Н. Чарушин, Д.А. Маслов. Заявитель и патентообладатель Автономная некоммерческая организация «БИОАН». опубли. 27.09.2012, Бюл. № 27.
7. Беккер О.Б., Даниленко В.Н., Коротина А.В., Ишметова Р.И., Русинов Г.Л., Толщина С.Г. и др.. Заявитель Пат. 2545458 РФ, МПК С 07 D 487/04. Противотуберкулёзное лекарственное средство: композиция имидазо[1,2-b]тетразина с пиразинамидом. и патентообладатель Автономная некоммерческая организация «БИОАН»; опубли. 27.03.2015, Бюл. № 9.
8. Maslov D.A., Korotina A.V., Shur K.V., Vatlin A.A., Bekker O.B., Tolshchina S.G., et. al. Synthesis and antimycobacterial activity of imidazo[1,2-b][1,2,4,5]tetrazines. Eur. J. Med. Chem. 2019. V. 178. P.

39-47.

9. Mohan J. Heterocyclic systems containing bridgehead nitrogen atom. Facile synthesis and biological activity of spiro [cycloheptane-1,7'(8'H)-[6H]pyrazolo[3',4':4,5]thiazolo[3,2-b]-s-tetrazines]. *Ind. J. Heterocycl. Chem.* 2005. V. 15. P. 187-188.

10. Ишметова Р.И., Игнатенко Н.К., Белянинова И.А. Синтез и противогрибковая активность 3-замещенных имидазо[1,2-b][1,2,4,5]тетразинов. *Изв. АН. Сер. хим.* – 2015. № 9. С. 2100-2105.

11. Korotina A.V., Tolshchina S.G., Ishmetova R.I., Evstigneeva N.P., Gerasimova N.A., Zilberberg N.V. et al. Synthesis of novel [1,2,4]triazolo[1,5-b][1,2,4,5]tetrazines and investigation of their fungistatic activity. *Beilstein J. Org. Chem.* 2022. V. 18. P. 243–250.

12. Xu F., Yang Z.Z., Jiang J.R., Pan W.G., Yang X.L., Wu J.Y. et al. Jiang Synthesis, antitumor evaluation and molecular docking studies of [1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4,5]tetrazine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016. V.26. N 13.P. 3042-3047.

13. Xu F., Yang Z.Z., Ke Z.L., Xi L.M., Yan Q.D., Yang W.Q. Synthesis, antitumor evaluation and 3D-QSAR studies of [1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4,5]tetrazine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016. V. 26. P. 4580-4586.

14. Беккер О.Б., Даниленко В.Н., Игнатенко Н.К., Ишметова Р.И., Русинов Г.Л., Толщина С.Г. Пат. 2527258 Российская Федерация, МПК С 07 D 487/04. 6-Замещенные 3-азолиимидазо[1,2-b][1,2,4,5] тетразины, проявляющие противоопухолевую активность / заявитель и патентообладатель Автономная некоммерческая организация «БИОАН»; опубл. 27.08.2014, Бюл. № 24.

15. Межевова И.В., Ситковская А.О., Кит О.И. Первичные культуры опухолевых клеток: современные методы получения и поддержания *in vitro*. *Южно-Российский онкологический журнал.* 2020;1(3):36-49.

16. Могиленских А.С., Сазонов С.В. Создание клеточных линий карциномы молочной железы. *Гены и клетки.* 2021 №1. Т.16 С.15-23

17. Minafra L., Norata R., Bravatà V. Massimo V., Carmelo L., Cecilia G. & Cristina M. Unmasking epithelial-mesenchymal transition in a breast cancer primary culture: a study report. *BMC Res Notes.* 2012; 5:343.

18. Сазонов С.В. Бриллиант А.А., Фадеев Ф.А., Демидов С.М., Леонтьев С.Л. Первый опыт культивирования клеток рака молочной железы. *Вестник уральской медицинской академической науки.* 2018. Том 15. №6. с. 860–867, DOI:10.22138/2500-0918-2018-15-6-860- 867

19. Могиленских А. С., Гребенюк Е. В., Сазонов С. В., Шамшурина Е.О., Коньшев К.В. Опыт получения клеточной культуры рака молочной железы из опухоли люминального В подтипа. *Вестник Уральской медицинской академической науки.* – 2022. – Т. 19, № 1. – С. 4-13. – DOI 10.22138/2500-0918-2022-19-1-4-13

20. Popova E.A., Protas A.V., Trifonov R.E. Tetrazole Derivatives as Promising Anticancer Agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 2018;17(14):1856-1868. DOI:10.2174/1871520617666170327143148.

21. Liu D., Yang J.G., Cheng J., Zhao L.X. Synthesis and antitumor activity of 3-methyl-4-oxo-3,4-dihydroimidazo [5,1-d][1,2,3,5]tetrazine-8-carboxylates and -carboxamides. *Molecules.* 2010;15(12):9427-37. DOI:10.3390/molecules15129427.

22. Liu J., Qiu L., Xia J., Chen S., Yu X., Zhou Y. ZGDHu-1 for cancer therapy. *Oncol Lett.* 2017; 14 (6):6334-6340. DOI:10.3892/ol.2017.7096.

23. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35 (4):495-516. DOI:10.1080/01926230701320337.

Авторы

Могиленских Анна Сергеевна

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

Научный сотрудник

annasajler@yandex.ru

Екатеринбург, Российская Федерация

Суслонина Анастасия Павловна

ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет

Студентка 2 курса педиатрического факультета  
asya.pin@yandex.ru  
Екатеринбург, Российская Федерация

Толщина Светлана Геннадьевна  
Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук

К.х.н., старший научный сотрудник лаборатории гетероциклических соединений  
kochevasg@gmail.com  
Екатеринбург, Российская Федерация

Сазонов Сергей Владимирович  
ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет  
Заведующий кафедрой гистологии, доктор медицинских наук, профессор  
prof-ssazonov@yandex.ru  
Екатеринбург, Российская Федерация

Демидов Сергей Михайлович  
ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет  
Заведующий кафедрой онкологии и лучевой диагностики, доктор медицинских наук, профессор  
demidov@gkb40.ur.ru  
Екатеринбург, Российская Федерация

*A.S. Mogilenskikh<sup>1,2</sup>, A.P. Suslonova<sup>2</sup>, S.G. Tolshina<sup>3</sup>,  
S.V. Sazonov<sup>1,2</sup>, S.M. Demidov<sup>1,2</sup>*

## THE EFFECT OF AZOLOANNELED TETRAZINES ON PRIMARY BREAST CANCER CELL CULTURE AND THE SAOS CELL LINE

<sup>1</sup>Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russian Federation;

<sup>2</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Yekaterinburg, Russian Federation;

<sup>3</sup>Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of RAS, Yekaterinburg, Russian Federation

**Abstract. Introduction.** There are a large number of anticancer drugs, but their effectiveness may decrease due to the occurrence of drug resistance and decreased sensitivity to therapy. Therefore, the issue of developing new drugs remains relevant. Azoloanneled tetrazines are polyazot-containing analogues of purine and are of interest as biologically active compounds.

**Materials and methods.** Two types of cell cultures were used as a model for evaluation: immortalized osteosarcoma cell line (SAOS2) and primary cell culture. A concentration of 2 micrograms/ml was used for all preparations. The control group was in the same conditions, without exposure to the drug. The staining was performed with a fluorescent dye DAPI, the cells were counted and evaluated using the Image G program.

**Results and discussion.** The drug KAD-33 had a cytotoxic effect only on the cells of the primary breast cancer culture, while there was no decrease in cells. In the case of SAOS, on the contrary, the cell size has significantly decreased. The drug KAD-40 did not cause a decrease in cell size, however, the number of cells significantly decreased both in breast cancer culture and in SAOS culture. In our study, the sodium salt 6-hydroxy-3-(4-fluorophenyl) had the most effective effect on cellular models of breast cancer and osteosarcoma[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4,5]tetrazine (CAD-28).

**Conclusions.** The obtained data can be used as a basis for the selection of new derivatives of azoloanneled tetrazines for further study of their properties in cell models and laboratory animals as substances with potential antitumor activity.

**Keywords:** azoloanneled tetrazines, breast cancer, primary culture, SAOS

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Sergey V. Sazonov

prof-ssazonov@yandex.ru

Received 31.01.2024

For citation:

Mogilenskikh A.S., Suslonova A.P., Tolshina S.G., Sazonov S.V., Demidov S.M. The effect of azoloanneled tetrazines on primary breast cancer cell culture and the SAOS cell line. [Online] Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2024, Vol. 21, no. 1, pp. 62–71. DOI:10.22138/2500-0918-2024-21-1-62-71 (In Russ)

## REFERENCES

1. Merabishvili V.M. The state of cancer care in Russia: breast cancer among the female population. Morbidity, mortality, reliability of accounting, detailed localization and histological structure (population study at the federal district level). *Issues of oncology*. 2022. Vol. 68, No. 3
2. Gao L., Wu Z.X., Assara, Y.G., Chen Z.S., Wang L. Overcoming anti-cancer drug resistance via restoration of tumor suppressor gene function. *Drug Resist Updat*. DOI:10.1016/j.drup.2021.100770
3. Zhang H, Wang Y, Liu X, Li Y. Progress of long noncoding RNAs in anti-tumor resistance. *Pathol Res Pract*. 2020. 216(11). DOI:10.1016/j.prp.2020.153215.
4. Karabina E.V., Lyubchenko L.N., Davydov M.M. Mechanisms of acquired resistance to anti-EGFR drugs in non-small cell lung cancer unrelated to the T790M mutation and their significance in clinical practice. *Advances in molecular oncology* 2018. 5(3).pp. 17-24.
5. Shawali A. S., Tawfik N. M. Novel facile synthesis of imidazo[1,2-b][1,2,4,5]tetrazines with potential antimicrobial activity. *Arch. Pharm. Res*. 2009. V. 32. N 7. P. 975-982.
6. Pat. 2462466 RF, IPC From 07 D 487/04. Substituted azolo[1,2,4,5]tetrazines are inhibitors of actinobacterial serine-threonine protein kinases. O.B. Becker, V.N. Danilenko, R.I. Ishmetova, G.L. Rusinov, S.G. Tolstoy, V.N. Charushin, D.A. Maslov. The applicant and the patent holder are the Autonomous non-profit organization «BIOAN». publ. 09/27/2012, Issue No. 27.
7. Becker O.B., Danilenko V.N., Korotina A.V., Ishmetova R.I., Rusinov G.L., Thickness S.G., Charushin V.N., Maslov D.A.. Pat. 2545458 RF, IPC C 07 D 487/04. Anti-tuberculosis drug: composition of imidazo[1,2-b]tetrazine with pyrazinamide. The applicant and the patent holder are the Autonomous Non-profit organization «BIOAN»; publ. 03/27/2015, Issue No. 9.
8. Maslov D.A., Korotina A.V., Shur K.V., Vatlin A.A., Bekker O.B., Tolshchina S.G., et. al. Synthesis and antimycobacterial activity of imidazo[1,2-b][1,2,4,5]tetrazines. *Eur. J. Med. Chem*. 2019. V. 178. P. 39-47.
9. Mohan J. Heterocyclic systems containing bridgehead nitrogen atom. Facile synthesis and biological activity of spiro [cycloheptane-1,7'(8'H)-[6H]pyrazolo[3',4':4,5]thiazolo[3,2-b]-s-tetrazines]. *Ind. J. Heterocycl. Chem*. 2005. V. 15. P. 187-188.
10. Ishmetova R.I., Ignatenko N.K., Belyaninova I.A. Synthesis and antifungal activity of 3-substituted imidazo[1,2-b][1,2,4,5]tetrazines. *Izv. AN. Ser. chem. – 2015. No. 9. pp. 2100-2105.*
11. Korotina A.V., Tolshchina S.G., Ishmetova R.I., Evstigneeva N.P., Gerasimova N.A., Zilberberg N.V. et al. Synthesis of novel [1,2,4]triazolo[1,5-b][1,2,4,5]tetrazines and investigation of their fungistatic activity. *Beilstein J. Org. Chem*. 2022. V. 18. P. 243–250.
12. Xu F., Yang Z.Z., Jiang J.R., Pan W.G., Yang X.L., Wu J.Y. et al. Jiang Synthesis, antitumor evaluation and molecular docking studies of [1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4,5]tetrazine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2016. V.26. N 13.P. 3042-3047.
13. Xu F., Yang Z.Z., Ke Z.L., Xi L.M., Yan Q.D., Yang W.Q. Synthesis, antitumor evaluation and



3D-QSAR studies of [1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4,5]tetrazine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016. V. 26. P. 4580-4586.

14. Becker O.B., Danilenko V.N., Ignatenko N.K., Ishmetova R.I., Rusinov G.L., Thickness S.G. Pat. 2527258 Russian Federation, MPC C 07 D 487/04. 6-Substituted 3-azolyimidazo[1,2-b][1,2,4,5]tetrazines exhibiting antitumor activity / applicant and patent holder Autonomous non-profit organization «BIOAN»; publ. 08/27/2014, Issue No. 24.

15. Mezhevova I.V., Sitkovskaya A.O., Kit O.I. Primary cultures of tumor cells: modern methods of obtaining and maintaining in vitro. *South Russian Journal of Oncology.* 2020;1(3):36-49.

16. Mogilenskikh A.S., Sazonov S.V. Creation of breast carcinoma cell lines. *Genes and cells.* 2021 No.1. Vol.16, pp.15-23

17. Minafra L., Norata R., Bravatà V. Massimo V., Carmelo L., Cecilia G. & Cristina M. Unmasking epithelial-mesenchymal transition in a breast cancer primary culture: a study report. *BMC Res Notes.* 2012; 5:343.

18. Sazonov S.V. Brilliant A.A., Fadeev F.A., Demidov S.M., Leontiev S.L. The first experience in the cultivation of breast cancer cells. *Bulletin of the Ural medical Academic science.* 2018. Volume 15. No.6. pp. 860-867, DOI:10.22138/2500-0918-2018-15-6-860- 867

19. Mogilenskikh A. S., Grebenyuk E. V., Sazonov S. V., Shamshurina E.O., Konyshev K.V. The experience of obtaining a breast cancer cell culture from a tumor of the luminal B subtype. *Bulletin of the Ural Medical Academic Science.* – 2022. – Vol. 19, No. 1. – pp. 4-13. – DOI 10.22138/2500-0918-2022-19-1-4-13

20. Popova E.A., Protas A.V., Trifonov R.E. Tetrazole Derivatives as Promising Anticancer Agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 2018; 17(14):1856-1868. DOI:10.2174/1871520617666170327143148.

21. Liu D., Yang J.G., Cheng J., Zhao L.X. Synthesis and antitumor activity of 3-methyl-4-oxo-3,4-dihydroimidazo [5,1-d][1,2,3,5]tetrazine-8-carboxylates and -carboxamides. *Molecules.* 2010;15(12):9427-37. DOI:10.3390/molecules15129427.

22. Liu J., Qiu L, Xia J., Chen S., Yu X., Zhou Y. ZGDHu-1 for cancer therapy. *Oncol Lett.* 2017; 14 (6):6334-6340. DOI:10.3892/ol.2017.7096.

23. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35 (4):495-516. DOI:10.1080/01926230701320337.

#### Authors

Anna S. Mogilenskikh

Institute of Medical Cell Technologies

Researcher

annasajler@yandex.ru

Yekaterinburg, Russian Federation

Anastasia P. Suslonova

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation

2nd year student of the Pediatric Faculty

asya.pin@yandex.ru

Yekaterinburg, Russian Federation

Svetlana G. Tolshina

Laboratory of Heterocyclic Compounds, Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of RAS  
PhD, Senior Researcher at the Laboratory of Heterocyclic Compounds

kochevasg@gmail.com

Yekaterinburg, Russian Federation

Sergey V. Sazonov

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation

Head of the Department of Histology, Doctor of Medical Sciences, Professor  
prof-ssazonov@yandex.ru  
Yekaterinburg, Russian Federation

Sergey M. Demidov  
Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ural State Medical University of  
the Ministry of Health of the Russian Federation  
Head of the Department of Oncology and Radiation Diagnostics, Doctor of Medical Sciences, Professor  
demidov@gkb40.ur.ru  
Yekaterinburg, Russian Federation