

Влияние новых противоопухолевых соединений на основе производных азолазинов на уровень повреждений ДНК нормальных клеток линии Vero в тесте ДНК-комет

А.Х. Хумаири^{1,2}, Д.Л. Сперанский¹, М.Ю. Минакова², Н.В. Чердынцева³, В.В. Удут²

¹ Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава России
400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

² НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга
Томского национального исследовательского медицинского центра РАН
634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

³ НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН
634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

Резюме

Цель работы – изучить влияние новых производных азолазинов на уровень ДНК-повреждений клеток линии Vero *in vitro* методом щелочного гель-электрофореза (тест ДНК-комет). **Материал и методы.** Объекты исследования – 8-(пиперидинокарбонил)-3-циклогексимидазо[5,1-*d*][1,2,3,5]тетразин-4(3*H*)-он (**1**), диэтиловый эфир 4-аминоимидазо[5,1-*c*][1,2,4]триазин-3,8-дикарбоновой кислоты (**2**), 4-амино-8-этоксикарбонилимидазо[5,1-*c*][1,2,4]триазин-3-*N*-(*n*-толуил)карбоксамид (**3**). Препаратом сравнения выбран эпирубицин. Соединения применялись в дозах 1/2, 1/10 и 1/50 IC₅₀. В качестве клеточной модели выбрана линия клеток Vero, культивируемая согласно стандартному протоколу. Для оценки генотоксичности применялся щелочной вариант метода ДНК-комет, обладающий высокой чувствительностью и позволяющий выявлять повреждения ДНК. **Результаты и обсуждение.** Анализ полученных данных свидетельствует, что тестируемые соединения **1–3** увеличивают количество повреждений ДНК в неопухолевых клетках. Наиболее выраженным генотоксическим действием обладает соединение **1**. Так, использование этого вещества в дозе 1/2 IC₅₀ привело к достоверному возрастанию длины хвоста кометы в 1,5 раза. Отмечено, что количество повреждений ДНК при действии соединения **1** в исследуемых дозах и эпирубицина находилось на одном уровне. **Заключение.** Полученные результаты доказывают, что соединения **1–3** могут обладать потенциально канцерогенным действием. Однако это предположение требует дальнейших углубленных экспериментальных исследований.

Ключевые слова: азолазины, генотоксичность, Vero, канцерогенное действие.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Хумаири А.Х., e-mail: ahmed.h.mneahil@gmail.com

Для цитирования: Хумаири А.Х., Сперанский Д.Л., Минакова М.Ю., Чердынцева Н.В., Удут В.В. Влияние новых противоопухолевых соединений на основе производных азолазинов на уровень повреждений ДНК нормальных клеток линии Vero в тесте ДНК-комет. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2023;43(6):117–124. doi: 10.18699/SSMJ20230614

Effect of new antitumor compounds based on azoloazine derivatives on the level of DNA damage in normal Vero cells in the DNA comet test

А.Н. Al-Humairi^{1,2}, D.L. Speranskiy¹, M.Yu. Minakova², N.V. Cherdyntseva³, V.V. Udut²

¹ Volgograd State Medical University of Minzdrav of Russia
400131, Volgograd, Pavshikh Bortsov ave., 1

² Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after E.D. Goldberg
of Tomsk National Research Medical Center of RAS
634028, Tomsk, Lenina ave., 3

³ Research Institute of Oncology of Tomsk National Research Medical Center of RAS
634009, Tomsk, Kooperativny In., 5

Abstract

The aim of the work is to study the effect of new azoloazine derivatives on the level of DNA damage to Vero cells (DNA comet test) in vitro by alkaline gel electrophoresis. **Material and methods.** The objects of the study are 8-(piperidinocarbonyl)-3-cyclohexylimidazo[5,1-*d*][1,2,3,5]tetrazine-4(3*H*)-one (**1**), diethyl ether 4-aminoimidazo[5,1-*c*][1,2,4]triazine-3,8-dicarboxylic acid (**2**), 4-amino-8-ethoxycarbonylimidazo[5,1-*c*][1,2,4]triazine-3-*N*-(*p*-toluyl)carboxamide (**3**). Epirubicin was chosen as a comparison drug. The compounds were used in doses of 1/2, 1/10 and 1/50 IC₅₀. The Vero cell line cultured according to the standard protocol was selected as the cell model. To assess genotoxicity, an alkaline version of the DNA comet method was used, which has a high sensitivity and allows detecting DNA damage. **Results.** Analysis of the data obtained indicates that the tested compounds **1-3** enhance DNA damage in non-tumor cells. Compound **1** has the most pronounced genotoxic effect. Thus, the use of this substance in a dose of 1/2 IC₅₀ led to a significant increase in the length of the comet's tail by 1.5 times. It was noted that DNA damage under the action of compound **1** in the studied doses and of epirubicin was on the same level. **Conclusions.** The results obtained prove that compounds **1-3** may have a potentially carcinogenic effect. However, this assumption requires further in-depth experimental studies.

Key words: azoloazines, genotoxicity, Vero, carcinogenic effect.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Al-Humairi A.H., e-mail: ahmed.h.mneahil@gmail.com

Citation: Al-Humairi A.H., Speranskiy D.L., Minakova M.Yu., Cherdyntseva N.V., Udut V.V. Effect of new antitumor compounds based on azoloazine derivatives on the level of DNA damage in normal Vero cells in the DNA comet test. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(6):117–124. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230614

Введение

В современной клинической онкологии значение химиотерапевтических препаратов остается обязательным для лечения пациентов со злокачественными новообразованиями [1]. В арсенал современной химиотерапии входят цитостатики, различающиеся по химическому строению, механизмам действия и источникам происхождения [1, 2]. Интересными в этом плане могут быть химические вещества, относящиеся к производным азолоазинов. Яркий представитель данной группы – темозоломид, одно из успешных противоопухолевых средств [3], который назначают с 2000 г. для лечения различных опухолей головного мозга. Он широко используется под торговыми названиями Temodal или Temodar [4, 5]. В настоящее время синтезированы различные аналоги темозоломида, например, производные имидазо[5,1-*c*][1,2,4]триазинов [6] и имидазо[5,1-*d*][1,2,3,5]тетразин-4-онов [7], которые представляют интерес для возможного их изучения в экспериментальной онкофармакологии в качестве перспективных противоопухолевых средств.

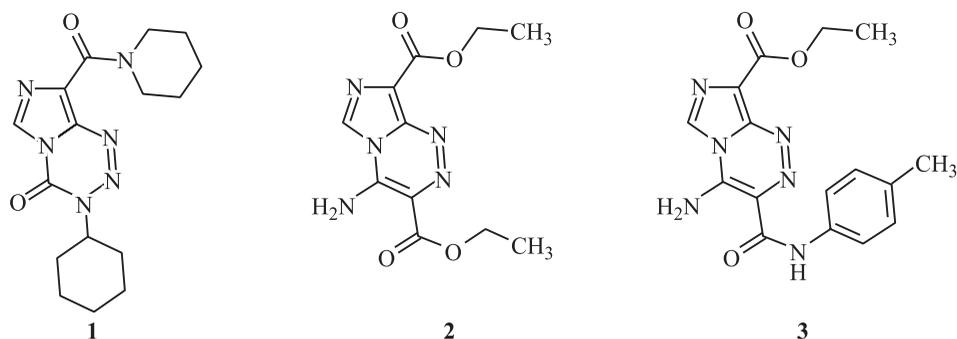
Известно, что нарушение структуры ДНК может стать одной из основных причин появления вторичных опухолей [8]. Особенно это актуально у пациентов со злокачественными новообразованиями, которым назначаются противоопухолевые препараты, в частности, темозоломид. В связи с этим актуальным является изучение возможных мутагенных свойств его аналогов – производных азолоазинов [9]. Ранее

показано, что 8-(пиперидинокарбонил)-3-циклогексylimидазо[5,1-*d*][1,2,3,5]тетразин-4(3*H*)-он (**1**), диэтиловый эфир 4-аминоимидазо[5,1-*c*][1,2,4]триазин-3,8-дикарбоновой кислоты (**2**), 4-амино-8-этоксикарбонилимидазо[5,1-*c*][1,2,4]триазин-3-*N*-(*n*-толуил)карбоксамид (**3**) (рисунок) обладают цитотоксическим и генотоксическим действием в отношении опухолевых клеток MCF-7 [10].

В настоящее время в спектр обязательных краткосрочных тестов по выявлению мутагенных и канцерогенных свойств различных веществ входит анализ повреждений ДНК (метод ДНК-комет) [11]. Оценка генотоксичности новых производных азолоазинов в этом тесте на нормальных клетках ранее не проводилась. Целью настоящей работы является изучение влияния азолоазинов **1–3** на уровень повреждений ДНК клеток линии Vero *in vitro* методом ДНК-комет.

Материал и методы

Клеточной моделью являлась линия клеток Vero, полученная из почек африканской зеленой марьшиски [12]. После размораживания клетки дважды отмывали в растворе Хенкса, ресуспендируя и центрифугируя в течение 5 минут при 500g, рассеивали во флакон и культивировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °C и контроле 5 % CO₂ на полной питательной среде (9 мл MEM + 1 мл FBS + 100 мкл антибиотиков) до формирования монослоя. Для посева на 96-луночный планшет удаляли питательную среду и переводили клетки в раствор дезинтегратора



Химическая структура соединений 1–3
Chemical structure of compounds 1–3

(трипсин-ЭДТА 0,25 %), после чего центрифугировали 5 мин при 500g. Осадок ресуспендировали в 2 мл полной питательной среды и готовили суспензию из расчета 10^6 клеток в 10 мл среды. В каждую лунку планшета помещали 100 мкл суспензии (10^4 клеток) и сразу добавляли исследуемые вещества в необходимых конечных концентрациях (см. ниже). Помимо этого на планшете был отрицательный (без добавления веществ) и положительный (добавление эпирубицина) контроль. Эпирубицин выбран в качестве позитивного контроля в связи с тем, что он, согласно клиническим рекомендациям Ассоциации онкологов России, а также метаанализу клинических обзоров за последние 5 лет, включен во многие схемы химиотерапии, где играет решающую роль при лечении пациентов как с ранним, так и прогрессирующим/метастатическим раком молочной железы. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C , затем отделяли клетки от поверхности с помощью 0,25%-го раствора трипсин/ЭДТА, центрифугировали, ресуспендировали осадок в растворе Хенкса.

Соединения 1–3 синтезированы и любезно предоставлены сотрудниками Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина. Ранее для них и эпирубицина были определены IC_{50} в опухолевой клеточной культуре MCF-7: эпирубицин – 9,37 мкмоль/л; соединение 1 – 0,85 мкмоль/л; соединение 2 – 2,98 мкмоль/л; соединение 3 – 3,95 мкмоль/л [10, 13]. В настоящей работе вещества применялись в дозах 1/2, 1/10 и 1/50 IC_{50} .

Для оценки генотоксичности использовали щелочной вариант метода ДНК-комет, обладающий высокой чувствительностью и позволяющий выявлять повреждения ДНК [14]. Критерием положительного результата теста является статистически значимое увеличение основных показателей поврежденности ДНК. Для проведения кометного анализа вносили 20 мкл клеточной суспензии в 180 мкл 1%-го раствора ага-

розы в фосфатном буфере ($\text{pH } 7,5 \pm 1,0$), смесь помещали на предметные стекла, инкубировали в щелочной камере (10 M NaOH + 200 mM ЭДТА, $\text{pH} > 13,0$) и проводили горизонтальный электрофорез, используя камеры CSL-COM20 (Cleaver Scientific, Великобритания), в течение 20 мин при напряженности поля 1 В/см и силе тока ~ 300 мА. Стекла фиксировали 70%-м раствором этанола и оставляли при комнатной температуре на 1–2 ч до полного высыхания. Полученные микропрепараты окрашивали раствором SYBR Green I и анализировали на флуоресцентном микроскопе Axio Imager (Carl Zeiss, Германия) при 530 нм с помощью цифровой камеры NX3000 (Samsung, Южная Корея). Краситель выбран согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [15], так как он позволяет получить с микропрепаратов яркие высококонтрастные изображения.

Результаты проведенного ДНК-кометного анализа оценивали по следующим параметрам: доля ДНК в хвосте (%), момент хвоста (произведение длины хвоста кометы и доли ДНК в хвосте, условные единицы) [14], длина хвоста кометы (расстояние миграции ДНК от центра или края головы до конца хвоста, пиксели). Анализ перечисленных параметров ДНК-комет осуществляли с помощью программы CometScore 2.0.0.38 (TriTek Corp., США). С каждого микропрепарата рандомизированно анализировали состояние ДНК не менее 100 клеток. Индекс повреждения ДНК (условные единицы) рассчитывали по формуле:

$$\text{Индекс ДНК-комет} = \frac{0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4}{\Sigma},$$

где $n_0 - n_4$ – число ДНК-комет каждого типа; Σ – сумма проанализированных ДНК-комет. Для вычисления индекса генотоксичности ДНК-кометы были ранжированы на пять условных типов с соответствующим для каждого числовым значением от 0 до 4 [15].

При статистической обработке результатов эксперимента предварительно была проверена нормальность распределения данных по критерию Шапиро – Уилка. Внутригрупповой сравнительный анализ проводился по критерию Краскела – Уоллиса (непараметрический вариант) с последующими множественными сравнениями по Бонферрони – Данну. Различия считались статистически значимыми при уровне доверительной вероятности $p < 0,05$.

Результаты

При изучении влияния азолазинов **1–3** и эпирубицина на генетический аппарат неопухолевых клеток Vero установлено, что культивирование данной клеточной линии с эпирубицином в дозе $1/10 IC_{50}$ оказало наиболее выраженное канцерогенное действие по сравнению с дозами $1/2$ и $1/50 IC_{50}$: доля ДНК в хвосте кометы оказалась максимальной, в то время как момент хвоста – минимальным. Влияние препарата на длину хвоста в указанных концентрациях варьировало незначительно (таблица).

При изучении влияния соединения **1** на долю ДНК в хвосте комет неопухолевых клеток зафиксированы статистически значимые различия между дозами $1/10 IC_{50}$ и $1/50 IC_{50}$. Следует отметить, что использование имидазотетразина **1** в дозе $1/2 IC_{50}$ привело к достоверному увеличению данного показателя в 1,5 раза относительно

такового при использовании меньших доз. Кроме того, эффект соединения **1** в исследуемых дозах и эпирубицина в отношении показателя «момент хвоста» находился на одном уровне. При внутригрупповом сравнении статистически значимые различия наблюдались между дозами $1/10 IC_{50}$ и $1/2 IC_{50}$ изучаемого вещества (см. таблицу).

Использование соединения **2** в дозе $1/50 IC_{50}$ привело к увеличению доли ДНК в хвосте кометы в 52,1 раза ($p < 0,05$) относительно отрицательного контроля и достигло значения в группе эпирубицина. После культивирования неопухолевой клеточной линии Vero с имидазотриaziном **2** получены статистически значимые различия между дозами $1/10 IC_{50}$ и $1/50 IC_{50}$, с одной стороны, и дозой $1/2 IC_{50}$, с другой ($p < 0,05$), в отношении показателя «момент хвоста», величина которого была соответственно в 1,5 и 1,7 раза больше, чем в группе максимальной дозы вещества. При внутригрупповой оценке длины хвоста кометы под воздействием соединения **2** не обнаружено статистически значимых различий между использованными дозами (см. таблицу).

Введение в неопухолевую клеточную линию соединения **3** в трех концентрациях привело к статистически значимому увеличению доли ДНК в хвосте кометы для всех доз по сравнению с величиной показателя в отрицательном контроле. Внутригрупповой анализ показал, что при введении субстанции **3** наблюдались статистически

Генотоксическое действие соединений 1–3 и эпирубицина на неопухолевую клеточную культуру Vero, зарегистрированное методом ДНК-комет

Genotoxic effect of compounds 1–3 and epirubicin on a non-tumor Vero cell culture recorded by the DNA comet method

Группа наблюдения, концентрация	Доля ДНК в хвосте кометы, %	Длина хвоста кометы, пиксель	Момент хвоста, усл. ед.
Отрицательный контроль	1,0 [0,8 ÷ 1,4]	14,0 [12,5 ÷ 16,1]	0,05 [0,03 ÷ 0,07]
Эпирубицин, $1/50 IC_{50}$	52,9 [47,0 ÷ 55,29] *	287,1 [227,3 ÷ 335,5] *	149,6 [151,0 ÷ 194,4] *
Эпирубицин, $1/10 IC_{50}$	64,9 [55,4 ÷ 70,9] *	228,6 [226,6 ÷ 231,1] *#	107,9 [103,9 ÷ 118,7] *
Эпирубицин, $1/2 IC_{50}$	51,2 [48,2 ÷ 53,3] *	279,9 [263,4 ÷ 271,1] *^	148,6 [135,8 ÷ 156,0] *
Соединение 1 , $1/50 IC_{50}$	59,9 [57,9 ÷ 61,2] *#	284,2 [259,8 ÷ 334,4] *	143,1 [136,8 ÷ 186,0] *
Соединение 1 , $1/10 IC_{50}$	65,1 [61,2 ÷ 70,9] *‡	284,9 [235,8 ÷ 301,8] *^	103,9 [101,4 ÷ 111,3] *
Соединение 1 , $1/2 IC_{50}$	57,2 [53,2 ÷ 59,3] *†	402,5 [367,3 ÷ 421,2] *†‡•	200,9 [182,0 ÷ 205,2] *†•
Соединение 2 , $1/50 IC_{50}$	52,1 [36,3 ÷ 56,6] *	348,5 [312,6 ÷ 357,0] *	191,8 [184,3 ÷ 208,7] *
Соединение 2 , $1/10 IC_{50}$	49,8 [38,5 ÷ 54,8] *	367,1 [320,3 ÷ 378,9] *	172,2 [169,7 ÷ 184,7] *
Соединение 2 , $1/2 IC_{50}$	35,8 [32,4 ÷ 39,8] *	330,6 [309,6 ÷ 338,6] *	116,6 [108,1 ÷ 121,6] *‡•
Соединение 3 , $1/50 IC_{50}$	41,0 [28,3 ÷ 49,3] *	227,1 [184,3 ÷ 290,8] *	365,6 [307,6 ÷ 391,6] *
Соединение 3 , $1/10 IC_{50}$	37,8 [27,6 ÷ 41,1] *‡	203,7 [168,4 ÷ 251,6] *‡	341,5 [315,7 ÷ 373,3] *‡
Соединение 3 , $1/2 IC_{50}$	35,6 [27,9 ÷ 42,8] *•	303,9 [251,6 ÷ 330,3] *•	355,1 [346,9 ÷ 358,4] *•

Примечание. Результаты представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – отрицательного контроля; # – эпирубицина в дозе $1/50 IC_{50}$; ^ – эпирубицина в дозе $1/10 IC_{50}$; † – эпирубицина в дозе $1/2 IC_{50}$; ‡ – того же соединения в дозе $1/50 IC_{50}$; • – того же соединения в дозе $1/10 IC_{50}$.

значимые различия (в 1,2 раза) длины хвоста кометы между дозами $1/2 IC_{50}$ и $1/50 IC_{50}$ относительно дозы $1/10 IC_{50}$. При действии имидазотриазина **3** на клеточную линию Vero в концентрации $1/2 IC_{50}$ и $1/50 IC_{50}$ показатель «момент хвоста» оставался на одном уровне, доза $1/10 IC_{50}$ привела к его снижению относительно минимальной и максимальной дозы (см. таблицу).

Установлено следующее распределение значений показателя индекса повреждения после введения эпирубина в клеточную линию Vero по дозам: для $1/2 IC_{50}$ – 54,4, для $1/10 IC_{50}$ – 48,8, для $1/50 IC_{50}$ – 55,1. Статистически значимые различия зафиксированы при внутригрупповом сравнении эффекта эпирубина. Индекс повреждения клеточной линии Vero после введения соединения **1** был наибольшим и в среднем составил 60 %, наименьшее значение показателя получено от соединения **3** в дозе $1/2 IC_{50}$.

Обсуждение

Согласно данным виртуального скрининга и различным экспериментальным исследованиям, азолазины обладают противовоспалительным, противодиабетическим и противовирусным действием [16]. Также известно о наличии у них противоопухолевой активности. Так, начиная с 1980-х годов, химические соединения, в основе которых лежит имидазо[5,1-*d*][1,2,3,5]тетразин, начали широко применяться в качестве противоопухолевых агентов [3–5]. На сегодняшний день синтезировано несколько сотен новых производных азолазинов, которые отличаются по химическому составу, что делает их перспективными для изучения в экспериментальной онкологии [6, 17].

Ранее в скрининговых экспериментах нами изучено 11 новых производных азолазинов. Показано их умеренное цитотоксическое действие в отношении опухолевых клеток MCF-7. По результатам этого исследования были выбраны соединения **1–3** как наиболее перспективные, с потенциально сильным противоопухолевым действием [10, 13]. Показано, что наибольшую цитотоксическую активность имеет соединение **1**. Далее следует соединение **2**. Менее токсично для опухолевых клеток соединение **3** [10, 13].

Согласно рекомендациям по проведению доклинических исследований для малых молекул, обладающих каким-либо видом фармакологической активности, должна быть выполнена оценка повреждения ДНК с помощью метода ДНК-комет [15]. В настоящее время с использованием этого метода изучено влияние трех перспективных соединений, относящихся к производным азолазина, на повреждения ДНК опухолевых клеток

MCF-7. Выявлено, что изучаемые вещества обладают выраженным генотоксическим действием. Наиболее токсичным в отношении генетического аппарата опухолевых клеток оказалось соединение **1** [18].

Известно, что цитостатические препараты, ингибирующие развитие злокачественных новообразований, обладают рядом побочных действий в отношении здоровых клеток. В связи с этим были проведены эксперименты для оценки влияния новых производных азолазинов на неопухолевые клетки с целью определения у этих веществ соотношения «риск/польза». Ранее при оценке цитотоксической активности выбранных соединений **1–3** на неопухолевые клетки показано достаточно слабое токсическое действие, что является позитивным моментом в случае их использования в качестве противоопухолевых средств [10]. Известно, что все современные противоопухолевые препараты негативно влияют на ДНК как опухолевых, так и неопухолевых клеток. Полоска генома под воздействием каких-либо факторов может провоцировать канцерогенез [19]. С целью оценки риска возможного образования вторичных опухолей при назначении новых производных азолазинов необходимо дальнейшее их исследование в отношении неопухолевых клеток. Анализ полученных экспериментальных данных свидетельствует, что соединения **1–3** приводят к возрастанию повреждения ДНК в неопухолевых клетках. Наиболее выраженное генотоксическое действие оказало соединение **1**, что согласуется с ранее полученными данными о мутагенных свойствах этого вещества в отношении опухолевых клеток.

Препараты на основе производных азолазинов достаточно токсичны и обладают выраженным повреждающим действием на здоровые клетки, например, клетки крови. В связи с этим повышенное содержание повреждений ДНК в клетках Vero может быть расценено как один из возможных механизмов проявления цитотоксического эффекта этих соединений, которое характерно для этой группы веществ в целом. Также полученные результаты доказывают, что соединения **1–3** потенциально канцерогенны и способны приводить к образованию вторичных опухолей. Основным механизмом повреждения ДНК является метилирование в положении N_7 и O_6 гуанина и O_3 аденина. При возникшей поломке в ДНК встраивается тимидин вместо цитозина. Следствием таких изменений является нарушение синтеза белка и репарации ДНК, что ведет к гибели клетки, т.е. к цитотоксичности [20, 21].

В дальнейшем, несомненно, научный и практический интерес представляет изучение соеди-

нений 1–3 в других обязательных тестах по выявлению повреждений ДНК, таких как тест Эймса, цитогенетические тесты хромосомных повреждений, для поиска однозначного ответа на вопрос о возможном мутагенном действии и канцерогенном потенциале этих веществ.

Заключение

Изучение влияния соединений 1–3 на генетический аппарат неопухоловой клеточной культуры Vero показало, что соединение 1 приводит к наиболее выраженным повреждениям ДНК. Полученные результаты свидетельствуют в пользу возможного канцерогенного действия данного вещества. Однако это предположение требует дальнейших углубленных экспериментальных исследований.

Список литературы

1. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Ред. Н.И. Переводчикова, В.А. Горбунова. М.: Практическая медицина, 2005, 704 с.
2. Чу Э., де Вита-младший В. Химиотерапия злокачественных новообразований. М.: Практика, 2009. 455 с.
3. Juarez-Moreno K., Gonzalez E.B., Girón-Vazquez N., Chávez-Santoscoy R.A., Mota-Morales J.D., Perez-Mozqueda L.L., Garcia-Garcia M.R., Pestryakov A., Bogdanchikova N. Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines. *Hum. Exp. Toxicol.* 2017;36(9):931–948. doi: 10.1177/0960327116675206
4. Синайко В.В., Артемова Н.А., Юркштович Т.Л., Бычковский П.М., Фроленков К.А. Сравнительная эффективность препаратов темобел и темодал в комплексном лечении высокозлокачественных (GRADE III–IV) глиальных опухолей головного мозга. *Рос. биотерапевт. ж.* 2015;14(2):59–64. doi: 10.17650/1726-9784-2015-14-2-59-64
5. Abdel-Rahman O., Fouad M. Temozolomide-based combination for advanced neuroendocrine neoplasms: A systematic review of the literature. *Future Oncol.* 2015;8(11):1275–1290. doi: 10.2217/fon.14.302
6. Садчикова Е.В., Мокрушин В.С. Взаимодействие 3,8-дизамещенных имидазо[5,1-с][1,2,4]триазинов с нуклеофилами. *Химия гетероцикл. соед.* 2014;(7):1100–1106.
7. Садчикова Е.В. Синтез новых азоло[5,1-с][1,2,3,5]тетразин-4-онов – аналогов противоопухолевого препарата темозоломид. *Изв. РАН. Сер. хим.* 2016;(7):1867–1872.
8. Коненков В.И., Рачковская Л.Н., Летагин А.Ю., Боровская Т.Г., Шурлыгина А.В., Робинсон М.В., Королев М.А., Котлярова А.А., Попова Т.В., Рачковский Э.Э., Вычужанина А.В., Машанова В.А. Исследование ДНК-повреждающего действия нового нормотимического лекарственного средства на основе комплекса лития цитрата, полиметилсилоксана и оксида алюминия методом ДНК-комет *in vivo*. *Сиб. науч. мед. ж.* 2018;38(4):5–10. doi: 10.15372/SSMJ20180401
9. Тюкавин А.И., Сучков С.В. Опухолевый рост – современный взгляд на патогенез и фармакотерапию (лекция). *Формулы фармации.* 2021;3(2):86–96. doi: 10.17816/phf65284
10. Хумаири А.Х., Сперанский Д.Л., Садчикова Е.В. Синтез и цитотоксическая активность новых производных азолотриазина при изучении на клеточных культурах. *Хим.-фармац. ж.* 2022;56(6):17–22. doi: 10.1007/s11094-022-02704-0
11. Гайдай Е.А., Дорофеева А.А., Крышень К.Л., Гайдай Д.С. Методические аспекты проведения ДНК-комет-теста в условиях *in vivo* в доклинических исследованиях. *Лаб. живот. для науч. исслед.* 2020;(3):16–24. doi: 10.29296/2618723X-2020-03-03
12. Andreani N.A., Renzi S., Piovani G., Marsan P.A., Bomba L., Villa R., Ferrari M., Dotti S. Potential neoplastic evolution of Vero cells: *in vivo* and *in vitro* characterization. *Cytotechnology.* 2017;69(5):741–750. doi: 10.1007/s10616-017-0082-7
13. Хумаири А.Х., Островский О.В., Зыкова Е.В., Сперанский Д.Л., Алексеева Д.Л., Садчикова Е.В. Цитотоксическая активность производных азолотриазина при изучении в культуре клеток рака молочной железы человека MCF. *Вестн. ВолгГМУ.* 2022; 19(1):133–141. doi: 10.19163/1994-9480-2022-19-1-133-141
14. Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*: Методические рекомендации МР 4.2.0014-10. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011, 16 с.
15. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2013, 944 с.
16. Саватеев К.В., Уломский Е.Н., Буторин И.И., Чарушин В.Н., Русинов В.Л., Чупахин О.Н. Азолазины – антагонисты A2α-рецептора. Структура и свойства. *Успехи химии.* 2018;87(7):636–669. doi: 10.1070/RCR4792
17. Garza-Morales R., Gonzalez-Ramos R., Chiba A., Montes de Oca-Luna R., McNally L.R., McMasters K.M., Gomez-Gutierrez J.G. Temozolomide enhances triple-negative breast cancer virotherapy *in vitro*. *Cancers (Basel).* 2018;10(5): e144. doi: 10.3390/cancers10050144
18. Хумаири А.Х., Сперанский Д.Л., Рыбалкина О.Ю., Садчикова Е.В., Булдаков М.А., Фролова А.А., Чердынцева Н.В., Удут В.В. Генотоксические эффекты новых производных азолазинов с противоопухоловой активностью в культуре клеток MCF-7. *Хим.-фармац. ж.* 2023;57(6):24–29. doi: 10.30906/0023-1134-2023-57-6-24-29
19. Свириновский А.И. Резистентность опухолевых клеток к терапевтическим воздействиям

как медико-биологическая проблема. *Мед. новости*. 2011;9:30–38.

20. Ramis G., Thomàs-Moyà E., de Mattos S.F., Rodríguez J., Villalonga P. EGFR inhibition in glioma cells modulates rho signaling to inhibit cell motility and invasion and cooperates with temozolomide to reduce cell growth. *PLoS One*. 2012;7(6):e38770. doi: 10.1371/journal.pone.0038770

21. Tatar Z., Thivat E., Planchat E., Gimberques P., Gadea E., Abrial C., Durando X. Temozolomide and unusual indications: Review of literature. *Cancer Treat. Rev*. 2013;39(2):125–135. doi: 10.1016/j.ctrv.2012.06.002

References

1. Guidelines for the chemotherapy of neoplastic diseases. Eds. N.I. Perevodchikova, V.A. Gorbunova. Moscow: Practical medicine, 2005. 704 p. [In Russian].

2. Chu E, de Vita V. Jr. Cancer chemotherapy. Moscow: Practice, 2009. 455 p. [In Russian].

3. Juarez-Moreno K., Gonzalez E.B., Girón-Vazquez N., Chávez-Santoscoy R.A., Mota-Morales J.D., Perez-Mozqueda L.L., Garcia-Garcia M.R., Pestryakov A., Bogdanchikova N. Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines. *Hum. Exp. Toxicol*. 2017;36(9):931–948. doi: 10.1177/0960327116675206

4. Sinaiko V.V., Artemova N.A., Yurkshtovich T.L., Bychkovsky P.M., Frolenkov K.A. Comparative efficacy of temobel and temodal drugs in multimodality treatment of high-grade (III–IV). *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2015;14(2):59–64. [In Russian]. doi: 10.17650/1726-9784-2015-14-2-59-64

5. Abdel-Rahman O., Fouad M. Temozolomide-based combination for advanced neuroendocrine neoplasms: A systematic review of the literature. *Future Oncol*. 2015;8(11):1275–1290. doi: 10.2217/fon.14.302

6. Sadchikova E.V., Mokrushin V.S. Interaction of 3,8-disubstituted imidazo[5,1-c][1,2,4]triazines with nucleophiles. *Khimiya geterotsiklicheskiikh soedineniy = Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2014;50(7):1014–1020. doi: 10.1007/s10593-014-1557-5

7. Sadchikova E.V. Synthesis of new azolo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-4-ones – analogs of antitumor agent temozolomide. *Russ. Chem. Bull*. 2016; 65(7): 1867–1872. doi: 10.1007/s11172-016-1522-9

8. Konenkov V.I., Rachkovskaya L.N., Letyagin A.Yu., Borovskaya T.G., Shurlygina A.V., Robinson M.V., Korolev M.A., Kotlyarova A.A., Popova T.V., Rachkovsky E.E., Vychuzhanina A.V., Mashanova V.A. Study of the DNA-damage by new normothymic medicinal on the basis of the complex of lithium citrate, polymethylsilyloxane and aluminum oxide by DNA comet assay *in vivo*. *Sibirskiy nauchnyy medicinskiy zhurnal =*

Siberian Scientific Medical Journal. 2018;38(4):5–10. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20180401

9. Tyukavin A.I., Suchkov S.V. Tumor growth – a modern view of pathogenesis and pharmacotherapy (lecture). *Formuly farmatsii = Pharmacy Formulas*. 2021;3(2):86–96. [In Russian]. doi: 10.17816/phf65284

10. Al-Humairi A.H., Speransky D.L., Sadchikova E.V. Synthesis and cytotoxic activity on cell cultures of new azolotriazines. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022;56(6):742–747 [In Russian]. doi: 10.1007/s11094-022-02704-0

11. Gaidai E.A., Dorofeeva A.A., Kryshen K.L., Gaidai D.S. Methodological aspects of DNA comet assay *in vivo* in preclinical research. *Laboratornyye zhivotnyye dlya nauchnykh issledovaniy = Laboratory Animals for Science*. 2020;(3):16–24. [In Russian]. doi: 10.29296/2618723X-2020-03-03

12. Andreani N.A., Renzi S., Piovani G., Marsan P.A., Bomba L., Villa R., Ferrari M., Dotti S. Potential neoplastic evolution of Vero cells: *in vivo* and *in vitro* characterization. *Cytotechnology*. 2017;69(5):741–750. doi: 10.1007/s10616-017-0082-7

13. Al-Humairi A.H., Ostrovsky O.V., Zykova E.V., Speransky D.L., Alekseeva D.L., Sadchikova E.V. Cytotoxic activity of azolotriazine derivatives in the study of MCF human breast cancer cells. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Journal of the Volgograd State Medical University*. 2022;19(1):133–141. [In Russian]. doi: 10.19163/1994-9480-2022-19-1-133-141

14. Evaluation of genotoxic properties by *in vitro* DNA comet method. Methodological recommendations MR 4.2.0014-10. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2011, 16 p. [In Russian].

15. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Moscow: Grif i K, 2013, 944 p.

16. Savateev K.V., Ulomsky E.N., Butorin I.I., Charushin V.N., Rusinov V.L., Chupakhin O.N. Azoloazines as A2α-receptor antagonists. Structure and properties. *Uspekhi khimii = Russian Chemical Reviews*. 2018; 87(7):636–669. [In Russian]. doi: 10.1070/RCR4792

17. Garza-Morales R., Gonzalez-Ramos R., Chiba A., Montes de Oca-Luna R., McNally L.R., McMasters K.M., Gomez-Gutierrez J.G. Temozolomide enhances triple-negative breast cancer virotherapy *in vitro*. *Cancers (Basel)*. 2018;10(5): e144. doi: 10.3390/cancers10050144

18. Al-Humairi A.H., Speransky D.L., Rybalkina O.Yu., Sadchikova E.V., Buldakov M.A., Frolova A.A., Cherdyntseva N.V., Udut V.V. Genotoxic effects of new azoloazine derivatives with antitumor activity in mcf-7 tumor cell culture. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2023;57(6):24–29. [In Russian]. doi: 10.30906/0023-1134-2023-57-6-24-29

19. Svirnovsky A.I. Resistance of tumor cells to therapeutic effects as a biomedical problem. *Meditsinskie novosti = Medical News*. 2011;9:30–38. [In Russian].
20. Ramis G., Thomàs-Moyà E., de Mattos S.F., Rodríguez J., Villalonga P. EGFR inhibition in glioma cells modulates rho signaling to inhibit cell motility and invasion and cooperates with temozolomide to reduce cell growth. *PLoS One*. 2012;7(6):e38770. doi: 10.1371/journal.pone.0038770
21. Tatar Z., Thivat E., Planchat E., Gimberques P., Gadea E., Abrial C., Durando X. Temozolomide and unusual indications: Review of literature. *Cancer Treat. Rev*. 2013;39(2):125–135. doi: 10.1016/j.ctrv.2012.06.002

Сведения об авторах:

Хумаири Ахмед Хамид, PhD фармакология, клиническая фармакология, и онкология, лучевая терапия,

ORCID: 0000-0001-7545-8567, e-mail: ahmed.h.mneahil@gmail.com

Сперанский Дмитрий Леонидович, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0002-4362-1603, e-mail: d_speransky@mail.ru

Минакова Мария Юрьевна, д.м.н., ORCID: 0000-0002-3385-3662, e-mail: nii@pharmso.ru

Чердынцева Надежда Викторовна, д.б.н., проф., член-корр. РАН, ORCID: 0000-0003-1526-9013,

e-mail: nvch@tnimc.ru

Удут Владимир Васильевич, д.м.н., проф., член-корр. РАН, ORCID: 0000-0002-3829-7132, e-mail: udutv@mail.ru

Information about the authors:

Ahmed H. Al-Humairi, PhD in Pharmacology, Clinical Pharmacology, and Oncology, Radiation Therapy,

ORCID: 0000-0001-7545-8567, e-mail: ahmed.h.mneahil@gmail.com

Dmitry L. Speransky, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-4362-1603, e-mail: d_speransky@mail.ru

Maria Yu. Minakova, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-3385-3662, e-mail: nii@pharmso.ru

Nadezhda V. Cherdyntseva, doctor of biology sciences, professor, corresponding member of RAS,

ORCID: 0000-0003-1526-9013, e-mail: nvch@tnimc.ru

Vladimir V. Udut, doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAS, ORCID: 0000-0002-3829-7132,

e-mail: udutv@mail.ru

Поступила в редакцию 02.06.2023

После доработки 04.09.2023

После повторной доработки 03.11.2023

Принята к публикации 03.11.2023

Received 02.06.2023

Revision received 04.09.2023

Second revision received 03.11.2023

Accepted 03.11.2023