









О.В. Верле 
А.Г. Сиреканян 
Н.В. Елисева 
Ю.В. Лифанова 
А.А. Спасов 
О.В. Островский 

Влияние нового каппа-агониста (фторфенилпроизводное имидазо[1,2-*a*]бензимидазола) на геном крыс

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, пл. Павших Борцов, д. 1, Волгоград, 400131, Российская Федерация

✉ Лифанова Юлия Викторовна; j_semenova_pharm@mail.ru

РЕЗЮМЕ

В качестве перспективной группы веществ для создания опиоидных анальгетиков с оригинальным механизмом действия без риска развития респираторной депрессии и наркотической зависимости рассматриваются каппа-селективные агонисты. В предыдущих исследованиях было выявлено соединение РУ-1205 (фторфенилпроизводное имидазо[1,2-*a*]бензимидазола) с установленным в экспериментах *in vitro* и *in vivo* каппа-рецепторным механизмом анальгетической активности.

Цель работы: оценка влияния дигидрохлорида 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазола на уровень повреждений ДНК у крыс при однократном подкожном введении.

Материалы и методы: исследование выполнено на половозрелых белых беспородных лабораторных крысах обоего пола. Повреждения ДНК учитывали методом ДНК-комет. Использовалась схема с однократным подкожным введением водного раствора субстанции РУ-1205 в трех дозах: 1, 10 и 100 мг/кг. В качестве положительного контроля использовали метилметансульфонат в дозе 40 мг/кг внутривенно, в качестве отрицательного контроля – 0,9% раствор NaCl (100 мкл на 100 г массы животного).

Результаты: при однократном подкожном введении крысам РУ-1205 дозозависимо не увеличивает показатель %ДНК в хвостах комет. Изменения не носят достоверного характера по сравнению с состоянием генома клеток соответствующих органов/тканей животных, получавших в эти же сроки физиологический раствор. %ДНК в хвостах комет в клетках различных органов/тканей в группах животных отрицательного контроля составляет 1,83–3,82% (медианное значение [25–75%]). Введение генотоксиканта метилметансульфоната в дозе 40 мг/кг приводит к увеличению количества поврежденной ДНК по сравнению с группой отрицательного контроля во всех исследуемых органах и тканях.

Выводы: в результате исследования генотоксических свойств дигидрохлорида 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазола установлено, что при однократном подкожном введении крысам в дозах 1, 10, 100 мг/кг РУ-1205 не оказывает повреждающего действия на геном клеток исследуемых органов.

Ключевые слова: повреждение ДНК; метод ДНК-комет; каппа-опиоидные агонисты; производные бензимидазола; анальгетики; доклинические исследования

Для цитирования: Верле О.В., Сиреканян А.Г., Елисева Н.В., Лифанова Ю.В., Спасов А.А., Островский О.В. Влияние нового каппа-агониста (фторфенилпроизводное имидазо[1,2-*a*]бензимидазола) на геном крыс. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(1):42–50. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-1-42-50>

O.V. Verle 
A.G. Sirekanyan 
N.V. Eliseeva 
Yu.V. Lifanova 
A.A. Spasov 
O.V. Ostrovskij 

Effects of a New Kappa Agonist (Fluorophenyl Derivative of Imidazo[1,2-*a*]benzimidazole) on the Rat Genome

Volgograd State Medical University,
1 Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd 400131, Russian Federation

✉ Yuliya V. Lifanova; j_semenova_pharm@mail.ru

ABSTRACT

Selective kappa-opioid receptor (KOR) agonists are considered a promising group of substances for developing opioid analgesics characterised with an original mechanism of action without the risk of respiratory depression and drug addiction. Previous studies identified a fluorophenyl derivative of imidazo[1,2-*a*]benzimidazole (RU-1205) with a KOR-based mechanism of analgesic action established in *in vitro* and *in vivo* experiments.

The aim of the study was to assess the effect of 9-(2-morpholinoethyl)-2-(4-fluorophenyl)imidazo[1,2-*a*]benzimidazole dihydrochloride on the level of DNA damage in rats after a single subcutaneous injection.

Materials and methods. The study was conducted in adult white outbred laboratory rats of both sexes. DNA damage was estimated using the comet assay. The study involved a single subcutaneous injection of an aqueous solution of RU-1205 in three doses: 1, 10, and 100 mg/kg. The authors used intraperitoneal methyl methanesulfonate (40 mg per kg of animal body weight) as a positive control and 0.9% NaCl (100 μ L per 100 g of animal body weight) as a negative control.

Results. A single subcutaneous injection of RU-1205 to rats did not produce a significant dose-dependent increase in % tail DNA when compared with the state of the corresponding organ/tissue cell genome in negative control animals after normal saline administration at the same time points. In the negative control groups, % tail DNA in cells of various organs/tissues ranged from 1.83% to 3.82% (median values [25–75%]). On the contrary, the administration of 40 mg/kg of genotoxic methyl methanesulfonate led to an increase in damaged DNA in all studied organs and tissues when compared with negative control animals.

Conclusions. The study of 9-(2-morpholinoethyl)-2-(4-fluorophenyl)imidazo[1,2-*a*]benzimidazole dihydrochloride genotoxicity demonstrated that a single subcutaneous injection of 1, 10, or 100 mg/kg of RU-1205 to rats did not damage the cell genome of the studied organs.

Key words: DNA damage; comet assay; kappa-opioid receptor agonists; benzimidazole derivatives; analgesics; preclinical studies

For citation: Verle O.V., Sirekanyan A.G., Eliseeva N.V., Lifanova Yu.V., Spasov A.A., Ostrovskij O.V. Effects of a new kappa agonist (fluorophenyl derivative of imidazo[1,2-*a*]benzimidazole) on the rat genome. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(1):42–50. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-1-42-50>

Введение

Этиологическая и патогенетическая роль индуцированного мутагенеза для организма человека не вызывает сомнений. Генотоксические поражения рассматриваются не только как причина наследственной и онкологической патологий, но и как общий фактор, играющий существенную роль в этиопатологии большого спектра заболеваний: от сердечно-сосудистых и нейродегенеративных до проблем бесплодия и старения. Наиболее конструктивным способом защиты организма человека от последствий мутагенеза, вызванного действием различных

химических веществ, представляется предупреждение контакта человека с потенциальными генотоксикантами. Это определяет необходимость тщательного контроля за распространением потенциальных генотоксикантов, в том числе среди лекарственных средств как группы соединений, направленно и регулярно используемых человеком [1].

Одной из наиболее актуальных в современной медицине продолжает оставаться проблема медикаментозного обезболивания и разработки новых эффективных анальгетиков с минимальным риском побочных эффектов. Перспективной

группой веществ для создания опиоидных анальгетиков с оригинальным механизмом действия без риска развития респираторной депрессии и наркотической зависимости являются каппа-селективные агонисты [2]. В предыдущих исследованиях *in vitro* и *in vivo* было выявлено соединение РУ-1205 (фторфенилпроизводное имидазо[1,2-*a*]бензимидазола) с экспериментально установленным каппа-рецепторным механизмом анальгетической активности [3–5].

Производные бензимидазола характеризуются широким спектром фармакологической активности. Так, например, некоторые производные бензимидазолов могут быть активны в отношении топоизомеразы I, ингибируя ее с последующей остановкой репликации ДНК [6]. Поэтому, несмотря на выявленный механизм анальгетической активности соединения РУ-1205, оценка генотоксичности является неотъемлемым элементом в системе доклинических исследований безопасности этого препарата.

Из имеющихся на сегодняшний день в арсенале генотоксикологии методов исследования наиболее перспективным представляется метод гель-электрофореза единичных клеток, или метод ДНК-комет *in vivo*¹. Метод основан на регистрации различной подвижности в постоянном электрическом поле поврежденной ДНК и (или) фрагментов ДНК индивидуальных лизированных клеток, заключенных в агарозный гель. ДНК мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, визуально напоминающий «хвост кометы», параметры которого зависят от степени поврежденности ДНК² [1, 7]. К преимуществам кометного анализа относятся его применимость к различным тканям и (или) особым типам клеток, его высокая чувствительность к обнаружению повреждения ДНК, достаточность небольшого количества клеток в образце, общая простота выполнения теста, короткое время, необходимое для завершения исследования, и его относительно низкая стоимость.

Цель работы – оценка влияния дигидрохлорида 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазола на уровень поврежденный ДНК у крыс при однократном подкожном введении.

Материалы и методы

Объектом исследования являлось соединение РУ-1205 (дигидрохлорид 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазол) в виде субстанции, синтезированной в Научно-исследовательском институте физической и органической химии Южного федерального университета.

Исследование *in vivo* выполнено на 45 половозрелых белых беспородных лабораторных крысах обоего пола массой 210–240 г, полученных из питомника ФГУП ПЛЖ «Рапполово» РАН (Ленинградская обл., д. Рапполово). Животные до начала эксперимента подверглись адаптационному карантину в течение 14 сут в виварии кафедры фармакологии и биоинформатики ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Животных содержали группами по 5 особей при регулируемом совмещенном световом режиме (12/12 ч) и температуре 20–22 °С. За 12 ч до эксперимента животных лишали еды при свободном доступе к воде³.

Животные случайным образом были разделены на 9 групп – 2 группы отрицательного контроля, получавшие растворитель 0,9% раствор NaCl в объеме 100 мкл на 100 г массы животного отдельно для группы самок и самцов, 1 группа положительного контроля, получавшая модельный генотоксикант – мутаген прямого действия – метилметансульфонат в дозе 40 мг/кг внутривентриально за 4 ч до эвтаназии, и 6 экспериментальных (по 3 группы самок и самцов), получавших РУ-1205 в различной дозировке. Ввиду отсутствия на момент исследования данных о наличии/отсутствии существенных межполовых различий в токсических эффектах исследуемого соединения эксперименты проводили на животных обоего пола, опираясь при этом на методические рекомендации⁴. В данном тесте использовалась схема с однократным подкожным введением водного раствора субстанции РУ-1205 в трех дозах, установленных в ранее проведенных исследованиях: 1 мг/кг (терапевтически эффективная доза), 10 мг/кг (промежуточная доза, превышающая терапевтическую в 10 раз) и 100 мг/кг (условно токсическая, превышающая терапевтическую дозу в 100 раз)

¹ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012. Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*: методические рекомендации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2010.
² Дурнев АД. Применение метода щелочного геля-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений. М.; 2006.
³ Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union. 2010. L 276/33-79. <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>
⁴ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

[3–5]. Введение раствора соединения проводили за 22 ч до эвтаназии животных, учитывая данные по фармакокинетике РУ-1205 и полагаясь на руководство OECD Test. No 489⁵. По данным литературы [8], достоверных различий относительно генотоксичности метилметансульфоната в группах крыс-самцов и крыс-самок не наблюдается, поэтому раздельных групп по половому признаку для групп положительного контроля предусмотрено не было.

На основании данных о фармакодинамике, фармакокинетике РУ-1205 и методическим рекомендациям⁶ [3–5] для исследования были выбраны следующие органы и ткани:

- печень, являющаяся основным органом биотрансформации ксенобиотиков и обладающая высокой чувствительностью к действию мутагенов и канцерогенов (на основании ранее проведенных исследований РУ-1205 и расчета абсолютных величин тканевой доступности было отмечено значительное содержание соединения в тканях печени и его активный метаболизм);
- головной мозг – как орган потенциального действия соединения – анальгетика центрального действия (РУ-1205 проникает через гематоэнцефалический барьер и определяется в течение 4 ч в тканях мозга);
- костный мозг – как активно пролиферирующая ткань, высокочувствительная к действию мутагенов, канцерогенов;
- клетки крови, осуществляющие транспорт ксенобиотиков.

Эвтаназию животных осуществляли методом цервикальной дислокации. Исследования методом ДНК-комет проводили в соответствии с методикой, описанной в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств⁷, протоколе 14.2 [9, 10], рекомендациях работ [11–14]. Эксперимент включал в себя следующие этапы: выделение единичных клеток из тканей животных, приготовление гель-слайдов, лизис клеток с последующей инкубацией в щелочном растворе, электрофорез, обработка образцов микропрепаратов, окрашивание микропрепаратов и микроскопический анализ.

По окончании электрофореза микропрепараты фиксировали в 70% растворе этилового спирта (время фиксации 10 мин). После фиксации

микропрепараты окрашивали в темноте флуоресцирующим красителем SYBR Green I в соответствии с вышеперечисленными протоколами.

Анализ проводили на флуоресцентном микроскопе с последующей фиксацией изображений цифровым фотоаппаратом SMART Camera NX300 (Samsung). Анализ параметров ДНК-комет – с помощью программы Comet Score (TriTek Corp.)⁸. Случайным образом анализировали состояние ДНК в каждом микропрепарате не менее 100 клеток. В качестве показателя генотоксичности использовали статистически достоверное увеличение процентного содержания ДНК в хвостах комет (%ДНК в хвостах комет) с последующим расчетом индекса повреждения (ИП):

$$\text{ИП} = \frac{\% \text{ДНК в хвостах комет в опытной группе}}{\% \text{ДНК в хвостах комет в контрольной группе}}$$

При ИП > 2 тестируемый образец может обладать генотоксическими свойствами [7].

В связи с выраженной асимметрией распределения клеток по величине «%ДНК в хвостах комет» данные по каждому стеклу предварительно представляли в логарифмическом масштабе, а после усреднения по 100 клеткам выполняли обратное преобразование [15, 16]. Статистическая обработка данных выполнена с помощью теста Краскела–Уоллиса (непараметрический вариант ANOVA) с последующими множественными сравнениями по Бонферрони–Данну (пакет программ Statistica).

Результаты и обсуждение

Для учета качественных результатов принято деление анализируемых клеток, мигрирующих под действием электрического поля, на клетки без повреждения и с разной степенью выраженности повреждения ДНК. Клетки без повреждения генетического материала под флуоресцентным микроскопом выглядят как ярко светящиеся точки (рис. 1d), клетки с поврежденной ДНК представляют собой образования, визуально напоминающие кометы (рис. 1e). В анализ не включали апоптотические клетки, выявленные на микропрепаратах в виде слабо флуоресцирующих ДНК-комет с широким диффузным «хвостом» и практически отсутствующей «головой».

⁵ OECD Test No. 489: *In vivo* mammalian alkaline comet assay. OECD Guideline for the testing of chemicals. OECD/OCDE; 2014.

⁶ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

⁷ Там же.

⁸ Comet Scoring Software. Version 2.0.0.38. TriTek Corp. <http://rexhooover.com/>

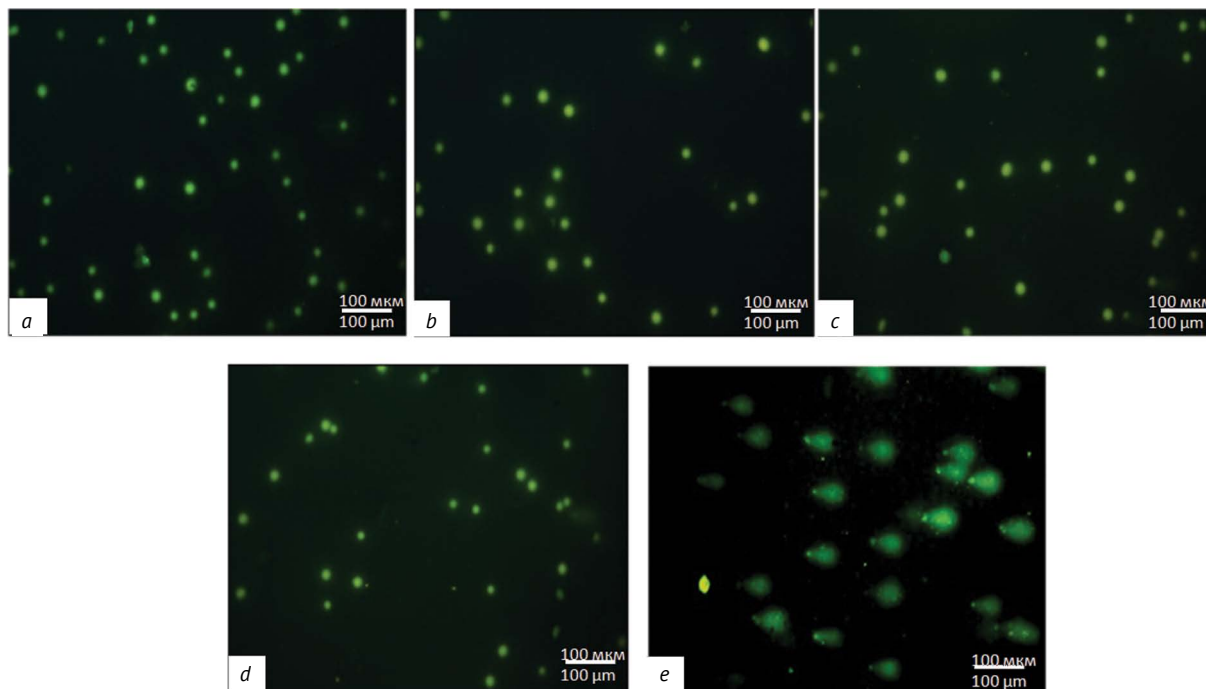


Рис. 1. Изображения ДНК-комет клеток печени крыс (окраска SYBR Green I), мигрирующих под действием электрического поля, при введении: а – РУ-1205, 1 мг/кг; б – РУ-1205, 10 мг/кг; в – РУ-1205, 100 мг/кг; д – физиологического раствора; е – метилметансульфоната, 40 мг/кг.

Fig. 1. Images of electric field-induced migration of comet DNA in rat liver cells (stained with SYBR Green I) after injection of a, RU-1205 (1 mg/kg); b, RU-1205 (10 mg/kg); c, RU-1205 (100 mg/kg); d, normal saline; or e, methyl methanesulfonate (40 mg/kg).

Распределение животных по значению параметра %ДНК в хвостах комет в клетках разных тканей и органов отличалось от нормального распределения (по критерию Шапиро–Уилка), поэтому в результатах приведены значения медианы – Ме, 25 и 75 перцентилей (Ме [25–75%]), а для визуализации результатов использовали графики типа «ящик-усы». Критерием наличия генотоксических свойств у РУ-1205 может являться статистически достоверное дозозависимое увеличение показателя поврежденности ДНК или статистически достоверный, воспроизводимый эффект по крайней мере для одной экспериментальной точки (исследуемой дозы РУ-1205).

Метилметансульфонат как вещество положительного контроля в дозе 40 мг/кг приводил к существенному увеличению %ДНК в хвосте комет по сравнению с контрольной группой животных (отрицательный контроль, физиологический раствор) во всех исследуемых органах/тканях (рис. 2). Индекс повреждения для всех видов органов и тканей превышал 2,0, что подтверждает повреждающее геном действие метилметансульфоната. Так, индекс повреждения для клеток печени составил 8,4, костного мозга – 5,2, крови – 2,7, головного мозга – 8,7. Во всех экспериментах наблюда-

лись высокие показатели коэффициента вариабельности (CV, %), минимальный составляет 21,4% (образцы крови), а максимальный 80,7% (образцы тканей печени), что говорит о сильной вариабельности внутри выборки.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о правильности выполнения аналитической части исследования: манипуляций, связанных с выделением единичных клеток, приготовлением микропрепаратов, проведением электрофореза, а также о возможности регистрации повреждений ДНК, в том числе и в результате воздействия на лабораторных животных РУ-1205.

Для животных из группы отрицательного контроля, получавших физиологический раствор, выявлено, что %ДНК в хвостах комет в клетках различных органов/тканей составил: в печени 2,14% [2,14–2,23%] и 1,96% [1,69–2,21%], в костном мозге 2,71% [2,52–3,05%] и 3,66% [2,62–4,06%], в клетках крови 3,10% [2,88–3,8%] и 3,82% [3,05–3,97%], в головном мозге 2,03% [7,77–2,04%] и 1,83% [1,48–1,89%] для самцов и самок соответственно (Ме [25–75%]) (рис. 2). Однократное подкожное введение РУ-1205 дозозависимо не увеличивало показатель %ДНК в хвостах комет (рис. 1а–с, рис. 2). Изменения

не носили достоверного характера по сравнению с состоянием генома клеток соответствующих органов/тканей у животных, получавших в эти же сроки физиологический раствор (отрицательный контроль).

Влияние производных бензимидазола на геном неоднократно описано в научной литературе [17, 18]. Более того, многие дериваты бензимидазолов способны ускорять апоптоз,

что также показано в целом ряде исследований (см., например, [18]). В случае с РУ-1205 в дозе 100 мг/кг, которая превышает среднюю эффективную дозу в 100 раз, эффектов обнаружено не было. Наоборот, в нескольких группах отмечено достоверное снижение %ДНК в хвостах комет (рис. 2), однако это не может рассматриваться как признак специфической токсичности (наличие генотоксических свойств). Об отсутствии

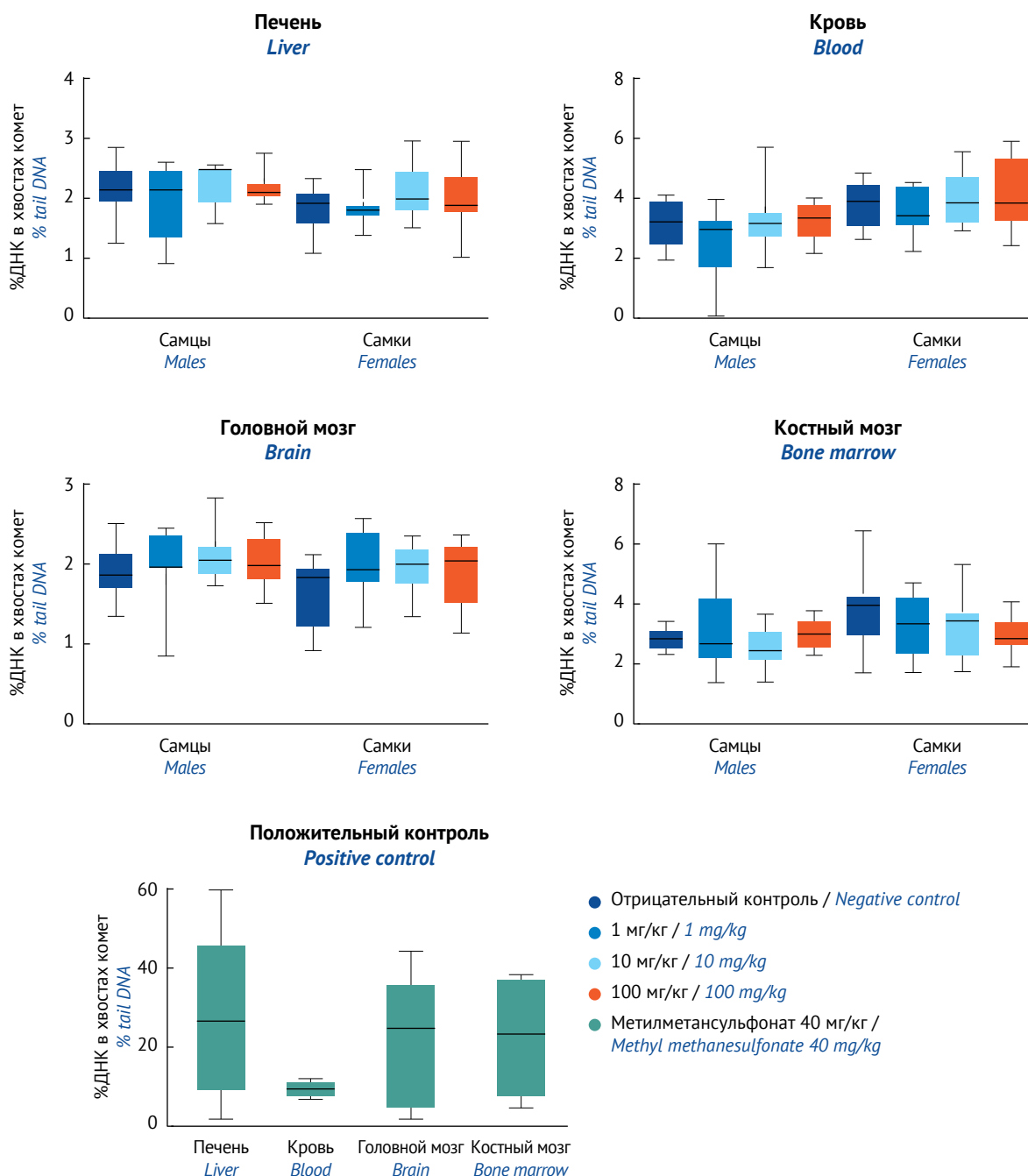


Рис. 2. Влияние РУ-1205 и метилметансульфоната на уровень поврежденных ДНК в клетках органов/тканей крыс.

Fig. 2. Influence of RU-1205 and methyl methanesulfonate on the level of DNA damage in rat tissue/organ cells.

Таблица 1. Распределение индекса повреждения ДНК для органов/тканей крыс при подкожном введении РУ-1205 в различных дозах

Table 1. DNA damage index distribution for rat organs/tissues after subcutaneous administration of RU-1205 in different doses

Исследуемые органы <i>Investigated organs</i>	Индекс повреждения ДНК <i>DNA damage index</i>					
	Самцы <i>Males</i>			Самки <i>Females</i>		
	1 мг/кг <i>1 mg/kg</i>	10 мг/кг <i>10 mg/kg</i>	100 мг/кг <i>100 mg/kg</i>	1 мг/кг <i>1 mg/kg</i>	10 мг/кг <i>10 mg/kg</i>	100 мг/кг <i>100 mg/kg</i>
Печень <i>Liver</i>	0,89	1,07	1,00	0,89	1,07	1,00
Костный мозг <i>Bone marrow</i>	1,04	0,87	1,07	0,84	0,75	0,77
Кровь <i>Blood</i>	0,72	1,01	0,98	0,87	1,02	0,92
Головной мозг <i>Brain</i>	1,05	1,08	1,06	1,16	1,12	1,15

генотоксических свойств также свидетельствует и низкий показатель индекса повреждения генома (табл. 1). Для всех органов и тканей данный показатель не превышал значение 2,0.

Заклучение

В результате исследования влияния дигидрохлорида 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-а]бензимидазола (РУ-1205) на параметры, определяемые в тесте ДНК-комет, установлено, что при однократном подкожном введении в дозах 1, 10, 100 мг/кг данное соединение не оказывало повреждающего дей-

ствия на геном клеток печени, крови, костного и головного мозга крыс, о чем свидетельствует отсутствие статистически достоверного дозозависимого увеличения показателя %ДНК в хвостах комет для всех экспериментальных точек и низкий уровень индекса повреждения в максимальной исследованной дозе 100 мг/кг, превышающей среднюю эффективную в 100 раз. Полученные данные позволяют судить о перспективах дальнейшей разработки данного соединения при создании инновационного анальгетика с безопасным фармакологическим профилем.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Жанатаев АК, Дурнев АД. Генотоксикология лекарственных средств: современное состояние и перспективы. *Медицинская генетика*. 2020;19(9):60–2. Zhanataev AK, Durnev AD. Genetic toxicology of pharmaceuticals: current state and perspectives. *Medical Genetics*. 2020;19(9):60–2 (In Russ.). <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2020.09.60-62>
2. Paton KF, Atigari DV, Kaska S, Prisinzano T, Kivell BM. Strategies for developing κ opioid receptor agonists for the treatment of pain with fewer side effects. *J Pharmacol Exp Ther*. 2020;375(2):332–48. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000134>
3. Спасов АА, Гречко ОЮ, Елисеева НВ, Анисимова ВА. Фторфенилпроизводные конденсированных бензимидазолов, селективные каппа-агонисты. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2010;73(5):83. Spasov AA, Grechko OYu, Eliseeva NV, Anisimova VA. Fluorophenyl derivatives of fused benzimidazoles, selective kappa agonists. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2010;73(5):83 (In Russ.).
4. Spasov AA, Smirnova LA, Grechko OYu, Eliseeva NV, Rashchenko AI, Zhukowskaia ON, et al. Distribution, excretion and metabolic pathways of a single parenteral administration of kappa opioid receptor agonist RU-1205. *Res Results Pharmacol*. 2021;7(2):59–65. <https://doi.org/10.3897/rpharmacology.7.67261>
5. Спасов АА, Смирнова ЛА, Гречко ОЮ, Елисеева НВ, Лифанова ЮВ, Ращенко АИ и др. Фармакокинетические свойства нового каппа-опиоидного анальгетика-соединения RU-1205 при однократном пероральном введении. *Фармация и фармакология*. 2021;9(2):149–60. Spasov AA, Smirnova LA, Grechko OYu, Eliseeva NV, Lifanova YuV, Rashchenko AI, et al. Pharmacokinetic properties of a new kappa-opioid analgesic RU-1205 compound at a single peroral administration. *Pharmacy and Pharmacology*. 2021;9(2):149–60 (In Russ.). <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2021-9-2-149-160>
6. Kim JS, Sun Q, Gatto B, Yu C, Liu A, Liu LF, et al. Structure-activity relationships of benzimidazoles and related heterocycles as topoisomerase I poisons. *Bioorg Med Chem*. 1996;4(4):621–30. [https://doi.org/10.1016/0968-0896\(96\)00047-8](https://doi.org/10.1016/0968-0896(96)00047-8)
7. Гайдай ЕА, Дорофеева АА, Крышень КЛ, Гайдай ДС. Методические аспекты проведения

- ДНК-комет-теста в условиях *in vivo* в доклинических исследованиях. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2020;(3):16–24.
- Gajdaj EA, Dorofeeva AA, Kryshen KL, Gajdaj DS. Methodological aspects of DNA-comet assay *in vivo* in pre-clinical research. *Laboratory Animals for Science*. 2020;(3):16–24 (In Russ.).
<https://doi.org/10.29296/2618723X-2020-03-03>
8. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 1999;71:1–1554.
PMID: 10507919
 9. Uno Y, Kojima H, Omori T, Corvi R, Honma M, Schechtman LM, et al. JaCVAM-organized international validation study of the *in vivo* rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens: I. Summary of pre-validation study results. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015;786–788:3–13.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.04.011>
 10. Uno Y, Kojima H, Omori T, Corvi R, Honma M, Schechtman LM, et al. JaCVAM-organized international validation study of the *in vivo* rodent alkaline comet assay for detection of genotoxic carcinogens: II. Summary of definitive validation study results. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015;786:45–76.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.04.010>
 11. Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup. *Mutat Res*. 2007;627(1):31–5.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.08.011>
 12. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):206–21.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(2000\)35:3%3C206::aid-em8%3E3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:3%3C206::aid-em8%3E3.0.co;2-j)
 13. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis*. 2003;18(1):45–51.
<https://doi.org/10.1093/mutage/18.1.45>
 14. Koppen G, De Prins S, Jacobs A, Nelen V, Schoeters G, Langie SA. The comet assay in human biomonitoring: cryopreservation of whole blood and comparison with isolated mononuclear cells. *Mutagenesis*. 2018;33(1):41–7.
<https://doi.org/10.1093/mutage/gex034>
 15. Bright J, Aylott M, Bate S, Geys H, Jarvis P, Saul J, et al. Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay. *Pharm Stat*. 2011;10(6):485–93.
<https://doi.org/10.1002/pst.530>
 16. Wiklund SJ, Agurell E. Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. *Mutagenesis*. 2003;18(2):167–75.
<https://doi.org/10.1093/mutage/18.2.167>
 17. Hegde M, Sharath Kumar KS, Thomas E, Ananda H, Raghavan SC, Rangappa KS. A novel benzimidazole derivative binds to the DNA minor groove and induces apoptosis in leukemic cells. *RSC Adv*. 2015;5(113):93194–208.
<https://doi.org/10.1039/c5ra16605e>
 18. Kamal A, Subba Rao AV, Lakshma Nayak VL, Subba Reddy NV, Swapna K, Ramakrishna G, et al. Synthesis and biological evaluation of imidazo[1,5-a]pyridine-benzimidazole hybrids as inhibitors of both tubulin polymerization and PI3K/Akt pathway. *Org Biomol Chem*. 2014;12(48):9864–80.
<https://doi.org/10.1039/c4ob01930j>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: О.В. Верле – проведение экспериментальной серии (микроскопия, оценка повреждающего действия исследуемого соединения), обработка полученных результатов, редактирование текста рукописи; А.Г. Сиреканян – проведение экспериментальной серии (выделение органов, проведение электрофореза), обработка полученных результатов; Н.В. Елисеева – обработка полученных результатов, редактирование текста рукописи; Ю.В. Лифанова – проведение экспериментальной серии (работа с животными, введение исследуемого препарата), написание текста рукописи; А.А. Спасов – концепция и дизайн исследования, утверждение окончательного варианта рукописи; О.В. Островский – дизайн эксперимента и руководство научно-исследовательской работой, редактирование текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Olga V. Verle conducted experiments (microscopy and evaluation of the test compound's damaging effect), processed the obtained results, and revised the manuscript. Anna G. Sirekanyan conducted experiments (isolation of organs, electrophoresis) and processed the obtained results. Natalya V. Eliseeva processed the obtained results and revised the manuscript. Yuliya V. Lifanova conducted experiments (handling of animals, administration of the study drug) and drafted the manuscript. Alexander A. Spasov conceptualised and designed the study, approved the final version of the manuscript for publication. Oleg V. Ostrovskij designed the experiments, supervised the research, and edited the manuscript.

Соответствие принципам этики. Исследование было одобрено региональным исследовательским этическим комитетом Волгоградской области (регистрационный номер IRB 00005839 IORG 0004900 (OHRP), протокол № 2077-2018 от 30.10.2018).

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Ethics approval. The study was approved by the Regional Research Ethics Committee of the Volgograd Region (IRB No. 00005839, IORG No. 0004900 (OHRP); minutes of meeting No. 2077-2018 of 30.10.2018).

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Верле Ольга Владимировна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0853-0148>
verle_olga@mail.ru

Сиреканян Анна Грагатовна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3794-9079>
annart888@yandex.ru

Елисеева Наталья Владимировна, канд. мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2243-5326>
nvkirillova@rambler.ru

Лифанова Юлия Викторовна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9663-5067>
j_semenova_pharm@mail.ru

Спасов Александр Алексеевич, академик РАН, д-р мед. наук, профессор.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7185-4826>
aspasov@mail.ru

Островский Олег Владимирович, д-р мед. наук, профессор.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9827-9545>
ol.ostr@gmail.com

Olga V. Verle.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0853-0148>
verle_olga@mail.ru

Anna G. Sirekanyan.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3794-9079>
annart888@yandex.ru

Natalya V. Eliseeva, Cand. Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2243-5326>
nvkirillova@rambler.ru

Yuliya V. Lifanova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9663-5067>
j_semenova_pharm@mail.ru

Alexander A. Spasov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7185-4826>
aspasov@mail.ru

Oleg V. Ostrovskij, Dr. Sci. (Med.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9827-9545>
ol.ostr@gmail.com

Поступила 06.12.2022

После доработки 12.01.2023

Принята к публикации 07.03.2023

Received 6 December 2022

Revised 12 January 2023

Accepted 7 March 2023