

ОЦЕНКА ТОКСИКОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗИМИДАЗОЛА ДЛЯ ЛИНЕЙНЫХ МЫШЕЙ C57/BL6

Комарова Е.Ф.^{1,2}, Вереникина Е.В.¹, Шевченко Н.А.¹, Гончарова А.С.¹, Аллилуева Е.В.¹, Галина А.В.¹, Гурова С.В.¹, Курбанова Л.З.¹, Романова М.В.¹, Ходакова Д.В.¹, Морковник А.С.³, Жуковская О.Н.³, Шевченко А.Н.¹, Григорян Э.С.², Арапова Ю.Ю.²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: katitako@gmail.com;

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения, Ростов-на-Дону;

³Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, e-mail: asmorkovnik@sfnu.ru

Оценивали острую токсичность химической субстанции дигидробрида 2- (3,4-дигидроксифенил) -9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а] бензимидазола (РУ-185) при однократном введении на линии мышей C57/Bl6 с целью подбора доз для дальнейшего исследования противоопухолевой эффективности. Определяли полулетальную дозу при однократном внутривентральном и интравентральном введении мышам обоего пола. Животные были разделены на экспериментальные и контрольные группы. Раствор РУ-185 вводили самкам на предварительном этапе в дозах 5,0, 50,0, 30,0 и 2000,0 мг/кг с интервалом 72 ч. На основном этапе эксперимента субстанцию вводили по 250,0, 500,0, 1000 и 2000,0 мг/кг мышам обоего пола. В ходе основного этапа эксперимента при обоих способах введения оценивали сроки и количество летальных случаев, а также влияние субстанции на поведенческий и функциональный статус животных. Проводили оценку массы тела у мышей обоего пола на 1–4-е сутки ежедневно, а затем на 7-е и 14-е сутки эксперимента. Расчет величин летальных доз (LD50, LD16, LD84 и LD100) производили с помощью метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности. При оценке острой токсичности РУ-185 на мышах линии C57/Bl6 определено значение LD50 при внутривентральном введении, которое составило 1807,9±226,1 мг/кг, при интравентральном введении – 1803,4±218,9 мг/кг. Полученные результаты исследования позволяют определить дозы для внутривентрального и интравентрального введения РУ-185 для линейных мышей C57/Bl6, которые используются в качестве моделей для оценки противоопухолевой активности субстанции.

Ключевые слова: производное бензимидазола, острая токсичность, мыши линии C57/Bl6, внутривентральное введение, интравентральное введение.

EVALUATION OF TOXICOMETRIC PARAMETERS OF BENZIMIDAZOLE DERIVATIVE FOR LINEAR MICE C57/BL6

Komarova E.F.^{1,2}, Verenikina E.V.¹, Shevchenko N.A.¹, Goncharova A.S.¹, Allilueva E.V.¹, Galina A.V.¹, Gurova S.V.¹, Kurbanova L.Z.¹, Romanova M.V.¹, Khodakova D.V.¹, Morkovnik A.S.³, Zhukovskaya O.N.³, Shevchenko A.N.¹, Grigoryan E.S.², Arapova Yu.Yu.²

¹National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: katitako@gmail.com;

²Rostov State Medical University, Rostov-on-Don;

³Southern Federal University, Rostov-on-Don, e-mail: asmorkovnik@sfnu.ru

The acute toxicity of the chemical substance dihydrobromide 2- (3,4-dihydroxyphenyl)-9-diethylaminoethylimidazo[1,2-a] benzimidazole (RU-185) was evaluated with a single injection of C57/Bl6 mice in order to select doses for further investigation of antitumor efficacy. The half-year dose was determined with a single intragastric and intraperitoneal administration to mice of both sexes. The animals were divided into experimental and control groups. RU-185 solution was administered to females at a preliminary stage in doses of 5.0, 50.0, 30.0 and 2000.0 mg/kg at intervals of 72 hours. At the main stage of the experiment, the substance was administered in 250.0, 500.0, 1000, and 2000.0 mg/kg to mice of both sexes. During the main stage of the experiment, with both methods of administration, the timing and number of fatal cases were evaluated, as well as the effect of the substance on the behavioral and functional status of animals. Body weight was assessed in mice of both sexes on the 1st-4th day daily, and then on the 7th and 14th days of the experiment. The values of lethal doses (LD50, LD16, LD84 and LD100) were calculated using the least squares method for probit analysis of mortality curves. When assessing the acute toxicity of RU-185 in mice of the C57/Bl6 line, the LD50 value was determined with intragastric administration, which was 1807.9±226.1 mg/kg and with intraperitoneal administration -

1803.4±218.9 mg/kg. The obtained results of the study allow us to determine the doses for intragastric and intraperitoneal administration of RU-185 for linear mice C57/Bl6, which are used as models for assessing the antitumor activity of the substance.

Keywords: benzimidazole derivative, acute toxicity, C57/Bl6 mice, intragastric administration, intraperitoneal administration.

Среди многочисленных исследований в области диагностики и лечения онкологических заболеваний важным аспектом является поиск мишеней и фармакологических таргетных агентов для воздействия на эти мишени [1]. Процесс разработки лекарственного препарата обуславливает необходимость подтверждения безопасности и эффективности нового соединения. В данном аспекте привлекательными для исследования являются соединения бензимидазола, которые сходны по структуре с нуклеиновыми кислотами, в связи с чем обладают широким спектром фармакологической активности, в частности противоопухолевой [2]. В исследованиях установлена также их значительная безопасность [3].

Противоопухолевую активность производных бензимидазола связывают с их действием на различные киназы, участвующие в клеточном метаболизме, направленным действием в отношении ДНК-топоизомераз и апоптотических белков, а также ферментов окислительного стресса и т.д. Злокачественная трансформация клеток в данном аспекте связана со способностью дериватов бензимидазола ингибировать активность киназ контрольной точки деления клетки – check point kinase 2 [4], циклинзависимых киназ [5], онкогенных киназ MEK1 и PI3K [6], ингибировать поли(ADP-рибоза)полимеразы (PARP) -1 и -2 [7-8], ДНК-топоизомеразы [9]. Кроме того, мишенью противоопухолевого действия производных бензимидазола является белок клеточного деления тубулин [10]. За счет механизма активации компонентов процесса апоптоза производные бензимидазола проявляют выраженную антипролиферативную активность [11,12].

В исследованиях показано, что производные бензимидазола относятся к группе соединений, обладающих антиоксидантной и антирадикальной активностью, в связи с чем они также могут проявлять противоопухолевое действие [13]. Показано, что действие синтетических субстанций на основе бензимидазола может быть направлено на ферменты, участвующие в антиоксидантной защите [14]. Однако некоторые авторы указывают на проопухолевую активность антиоксидантов, а также их потенции в отношении опухолевой прогрессии [15].

Оценка противоопухолевой эффективности лекарственных средств проводится на рекомендованных сингенных опухолевых моделях, воспроизведенных на линейных мышах [16], для чего необходимо определение показателей токсичности новых субстанций у таких животных с дальнейшим расчетом доз для исследования специфической активности.

Целью исследования явилось определение острой токсичности дигидробромида 2- (3,4-дигидроксифенил) -9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а] бензимидазола (далее – РУ-185) при однократном введении мышам линии С57/В16.

Материал и методы исследования

Исследование было проведено на 110 мышах линии С57/В16 обоего пола весом 18–20 г согласно протоколу биоэтической комиссии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России (№ 19 от 22.09.2015) в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики ГОСТ 33044-2014 [17] и правилами Европейской Конвенции ETS 123 [18].

Проводили оценку острой токсичности фармакологической субстанции дигидробромида 2- (3,4-дигидроксифенил) -9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а] бензимидазола, характеристики которой были подтверждены методами ЯМР-и ИК-спектроскопии, рентгеноструктурного анализа. Исследуемое вещество растворяли в физиологическом растворе и осуществляли введение внутривенно (с помощью назогастрального зонда) и внутрибрюшинно.

В соответствии с межгосударственным стандартом [19] изучение острой токсичности РУ-185 выполнялось в два этапа (табл. 1). Все мыши были разделены на 2 группы для каждого способа введения: экспериментальные, которым вводили исследуемое вещество, и контрольные, которым вводили изотонический раствор хлористого натрия, в объемах по 0,5 мл. На предварительном этапе исследуемое вещество вводили последовательно, начальная доза составляла 5,0 мг/кг. Последующие дозы согласно рекомендациям вводили через 72 часа. За каждым животным наблюдали первые 2 суток, а затем ежедневно последующие 7 дней. Оценивали общее состояние мышей и показатели летальности. Эвтаназию выживших животных проводили дислокацией шейных позвонков на 7-е сутки.

Таблица 1

Дизайн эксперимента: количество животных в группах и применяемые дозы.

Показатели		Группы животных									
		Экспериментальные				Контрольная	Экспериментальные				Контрольная
Этап исследования		Предварительный этап					Основной этап				
Количество животных*	♂	–	–	–	–	–	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	♀	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Разовые дозы, мг/кг		5,0	50,0	300,0	2000,0	0	250,0	500,0	1000,0	2000,0	0

Примечание: * – количество животных для внутрижелудочного / количество животных для внутрибрюшинного введения РУ-185

В соответствии с полученными результатами на предварительном этапе исследования для основного этапа были рассчитаны дозы РУ-185, которые вводили однократно (табл. 1). Животных наблюдали индивидуально каждые 30 минут в течение 24 часов, а затем ежедневно в течение 14 дней.

Расчет величин летальных доз производился с помощью метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности [20]. Оценку массы тела животных проводили на 1–4-е сутки ежедневно, а затем на 7-е и 14-е сутки эксперимента. Также на основном этапе эксперимента проводили исследование влияния вещества РУ-185 на функционально-поведенческий статус животных при обоих способах введения субстанции (табл. 2).

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью программы STATISTICA 12.0 (StatSoft Inc., США). Для оценки нормальности распределения использовали критерии Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова. Для оценки достоверности различий средних величин независимых выборок применяли критерий Манна–Уитни с установленным уровнем значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

На предварительном этапе исследования в обеих экспериментальных группах при введении субстанции в дозах 5,0 мг/кг, 50,0 мг/кг, 300,0 мг/кг не было зарегистрировано гибели животных, не наблюдались изменения внешнего вида, поведения и не отмечалось нарушений двигательной активности. После введения РУ-185 независимо от способа введения в дозе 2000,0 мг/кг у животных в течение первых 2 часов наблюдались признаки токсического отравления с последующей гибелью.

При анализе результатов основного этапа эксперимента в группах после внутрижелудочного введения РУ-185 в дозах 1000,0 мг/кг и 2000,0 мг/кг у животных наблюдались признаки токсического отравления, такие как: адинамия, снижение частоты груминга и реакций на болевые и тактильные стимулы, учащение частоты дыхания с последующим урежением (табл. 2). Также в этих группах отмечалось снижение груминга и спонтанной двигательной активности на 25% и 50% относительно контрольной группы при $p = 0,03$ и $p = 0,02$ соответственно (табл. 2). При прогрессировании токсического эффекта наблюдались тремор, подергивание конечностей и судороги, вегетотропные эффекты в виде снижения реакции зрачка, повышения уриаций. Аналогичная картина наблюдалась при внутрибрюшинном способе введения РУ-185, однако некоторые токсические признаки проявлялись и были более выражены уже при введении дозы 500 мг/кг – снижение реакции на прикосновение, боль, стук, настороженности.

Функционально-поведенческий статус мышей линий C57/Bl6 на основном этапе
исследования острой токсичности РУ-185

Тестируемые параметры, баллы	Дозы, мг/кг									
	Внутрижелудочно					Внутрибрюшинно				
	К	250	500	1000	2000	К	250	500	1000	2000
Поведенческие реакции										
Вокализация	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Настороженность	4	4	4	3	3	4	4	3	3	1
Активность	4	4	3	3	2	4	4	3	3	2
Стереотипия	0	0	0	4	6	0	0	0	4	6
Беспокойство	0	0	1	6	8	0	0	0	2	7
Агрессия	0	0	0	4	5	0	0	0	4	4
Груминг	4	4	3	3	2	4	4	3	3	2
Спонтанная двигательная активность	4	4	3	3	2	4	4	3	3	2
Нервно-мышечная возбудимость										
Реакция на прикосновение	4	4	4	3	3	4	4	3	3	2
Реакция на боль	4	4	4	3	2	4	4	3	3	2
Реакция на стук	4	4	4	3	3	4	4	3	3	2
Тремор	0	0	0	3	6	0	0	0	4	6
Подергивание	0	0	0	4	7	0	0	0	5	7
Судороги	0	0	0	4	7	0	0	0	4	7
Расстройство походки	0	0	0	3	6	0	0	0	4	6
Тонус конечностей	4	4	4	3	2	4	4	4	3	2
Вегетативные эффекты										
Положение мигательной перепонки	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Размер зрачка	4	4	4	3	3	4	4	4	3	3
Саливация	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
Уринация	0	0	0	5	7	0	0	0	5	7
Дефекация	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ректальная температура	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Цвет кожи	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Частота дыхания	0	0	0	5	7	0	0	0	4	8

Примечание: К – контрольная группа; оценку функционально-поведенческого статуса проводят в шкалах от 0 до 8 баллов, где: в шкалах внешнего проявления поведения 4 балла соответствует нормальной оценке параметра, от 4–8 баллов – увеличение эффекта, от 4 до 0 – угнетение эффекта, а изменение параметра в 1 балл соответствует

изменению параметра в среднем на 25%; в шкалах токсического профиля: 8 – максимальное проявление признака, а 0 баллов – отсутствие признаков интоксикации.

Гибель животных наблюдалась в течение первых 4 дней, однако в последующие дни эксперимента падение животных не регистрировалось (табл. 3). Анализ статистики летальных эффектов в исследуемых группах позволил произвести расчет величин летальных доз, который показал, что при внутрижелудочном введении РУ-185 величина ЛД50 составила $1807,9 \pm 226,1$ мг/кг, при внутрибрюшинном введении – $1803,4 \pm 218,9$ мг/кг (табл. 3). Расчетные летальные дозы для внутрижелудочного введения: $LD_{16}=1093,01$ мг/кг, $LD_{84} = 2522,9$ мг/кг, $LD_{100}=2880,4$ мг/кг. Расчетные летальные дозы для внутрибрюшинного введения: $LD_{16}=1045,45$ мг/кг, $LD_{84} = 2504,8$ мг/кг, $LD_{100}=2800,2$ мг/кг.

Таблица 3

Статистика летальных эффектов при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении РУ-185 мышам линии C57/Bl6 на основном этапе исследования

Способ введения	Доза, мг/кг	Результаты исследования				Эффект в пробитах
		Самки		Самцы		
		Павшие животные	Всего животных	Павшие животные	Всего животных	
Внутрижелудочно	250,0	0	5	0	5	2,95
	500,0	0	5	0	5	2,95
	1000,0	2	5	1	5	4,48
	2000,0	2	5	2	5	4,75
	0 (контроль)	0	5	0	5	–
Внутрибрюшинно	250,0	0	5	0	5	2,95
	500,0	1	5	0	5	3,72
	1000,0	2	5	1	5	4,48
	2000,0	2	5	2	5	4,75
	0 (контроль)	0	5	0	5	–

Оценка динамики прироста массы тела выживших после введения животных установила, что после внутрижелудочного введения РУ-185 прирост массы тела у самцов и самок к окончанию эксперимента был статистически достоверно ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). После введения РУ-185 в дозе 1000 мг/кг и 2000 мг/кг в первые 3 суток у животных отмечалось снижение массы тела относительно исходных значений на $2,4 \pm 0,3$ г и $3,4 \pm 0,2$ г соответственно, а далее отмечался прирост к 14-м суткам эксперимента на $2,1 \pm 0,1$ г и $1,4 \pm 0,2$ г соответственно. Однако обнаружены статистически значимые межгрупповые различия для животных обоего пола в процентном приросте массы тела при введении доз 1000

мг/кг и 2000 мг/кг. Так, на 7-е сутки после введения доз РУ-185 1000 и 2000 мг/кг прирост массы в среднем был ниже относительно контроля в 4,2 и 5,3 раза соответственно, а на 14-е сутки – в 5,7 и 7,1 раза соответственно (для всех случаев при $p < 0,05$). После внутрижелудочного введения РУ-185 в дозе 500 мг/кг у самцов прирост массы тела был отмечен на 2-е сутки эксперимента на $11,1 \pm 2,0\%$, у самок – на 4-е сутки на $13,3 \pm 1,7\%$, а в дозе 250 мг/кг прирост массы тела наблюдался на 1-е сутки эксперимента у животных обоего пола, но к окончанию эксперимента был ниже в среднем в 1,5 раза для дозы 500 мг/кг и в 1,3 раза для дозы 250 мг/кг ниже, чем у животных контрольной группы (при $p < 0,05$ для всех случаев).

Аналогичная динамика массы тела обнаружена при исследовании прироста массы тела у животных после внутрибрюшинного введения РУ-185 и установлено, что у животных обоего пола в течение эксперимента прирост массы тела был статистически значимо ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Введение РУ-185 в дозе 2000 мг/кг у мышей обоего пола вызывало снижение массы тела в 1-е сутки относительно исходных цифр в среднем на $15,3 \pm 1,1\%$, однако к 14-м суткам эксперимента у выживших животных отмечался незначительный прирост массы. После введения РУ-185 в дозе 1000 мг/кг отмечались половые различия: у самцов прирост массы тела на $1,6 \pm 0,5$ г относительно исходных значений был отмечен к 3-м суткам эксперимента, у самок был зарегистрирован начиная с 4-х суток на $3,2 \pm 0,3$ г. После введения РУ-185 в дозах 250,0 мг/кг и 500,0 мг/кг у самцов и самок наблюдался прирост массы тела с 1-х суток эксперимента в среднем на $10,2 \pm 2,1\%$ и $7,1 \pm 1,2\%$ соответственно. К окончанию эксперимента прирост массы тела для всех применяемых доз был статистически значимо ниже, чем в контрольной группе: после внутрибрюшинного введения доз 250, 500, 1000 и 2000 мг/кг – в 2,4 раза, 4,1 раза, 5,5 и 6,8 раза соответственно (для всех случаев при $p < 0,05$).

Заключение

Оценка острой токсичности РУ-185 на мышах линии С57/В16 показала, что значение LD50 при внутрижелудочном введении составило $1807,9 \pm 226,1$ мг/кг, при внутрибрюшинном введении – $1803,4 \pm 218,9$ мг/кг. Полученные результаты исследования позволяют рассчитать дозы для внутрижелудочного и внутрибрюшинного введения РУ-185 для дальнейшей оценки его специфической противоопухолевой активности на линейных мышах С57/В16, которые используются в качестве моделей для исследования сингенных опухолей.

Список литературы

1. Кит О.И., Франциянц Е.М., Никипелова Е.А., Комарова Е.Ф., Козлова Л.С.,

Таварян И.С. Аверкин М.А., Черярина Н.Д. Изменения маркеров пролиферации, неоангиогенеза и системы активации плазминогена в ткани рака прямой кишки // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2015. № 2 (114). С. 40-45.

2. Кит О.И., Комарова Е.Ф., Вереникина Е.В., Максимов А.Ю., Морковник А.С., Жуковская О.Н., Гончарова А.С., Шевченко Н.А., Власов С.Н., Заикина Е.В., Курбанова Л.З., Ходакова Д.В., Пандова О.В. 1, 2, 3- Оценка противоопухолевой активности производного бензимидазола на моделях экспериментальных опухолей // Якутский медицинский журнал. 2022. №1. С. 23-27. DOI: 10.25789/УМЖ.2022.77.06.

3. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Мальцев Д.В., Мирошников М.В., Сиротенко В.С., Султанова К.Т., Гайдукова К.А., Скрипка М.О. Оценка острой токсичности нового производного бензимидазола с антитромбогенными свойствами // Toxicological Review. 2021. Т. 166. №. 1. С. 52-57. DOI: 10.36946/0869-7922-2021-1-52-57.

4. Silva-Santisteban M.C., Westwood I.M., Boxall K., Brown N., Peacock S., McAndrew C., Barrie E., Richards M., Mirza A., Oliver A.W., Burke R., Hoelder S., Jones K., Aherne G.W., Blagg J., Collins I., Garrett M.D., van Montfort R.L. Fragment-based screening maps inhibitor interactions in the ATP-binding site of checkpoint kinase 2. PLoS One. 2013. Vol. 8. №. 6. P. e65689. DOI: 10.1371/journal.pone.0065689.

5. Nassar I.F., El kady D.S., Awad H.M., El-Sayed W.A. Design, synthesis, and anticancer activity of new oxadiazolyl-linked and thiazolyl-linked benzimidazole arylidines, thioglycoside, and acyclic analogs. J. Heterocycl. Chem. 2019. Vol. 56. №. 3. P. 1086-1100. DOI: 10.1002/jhet.3496.

6. Van Dort M.E., Hong H., Wang H., Nino C.A., Lombardi R.L., Blanks A.E., S. Galbán, Ross, B. D. Discovery of bifunctional oncogenic target inhibitors against allosteric mitogen-activated protein kinase (MEK1) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). Journal of medicinal chemistry. 2016. Vol. 59. № 6. P. 2512-2522. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01655.

7. Грицкевич А.А., Русаков И.Г., Байтман Т.П., Мишугин С.В. Новые подходы к лечению кастрационнорезистентного рака предстательной железы: ингибиторы PARP // Медицинский совет. 2021. № 4S. P. 44-50. DOI: 10.21518/2079-701X-2021-4S-44-50.

8. Atmaca H., Ilhan S., Batir M.B., Pulat Ç.Ç., Güner A., Bektaş H. Novel benzimidazole derivatives: Synthesis, in vitro cytotoxicity, apoptosis and cell cycle studies. Chemico-Biological Interactions. 2020. Vol. 20. № 14. P. 109163. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109163.

9. Galal S.A., Abdelsamie A.S., Shouman S.A., Attia Y.M., Ali H.I., Tabll A., El-Shenawy R., El Abd Y.S., Ali M.M., Mahmoud A.E., Abdel-Halim A.H., Fyiad A.A., Girgis A.S., El-Diwani H.I. Part I: Design, synthesis and biological evaluation of novel pyrazole-benzimidazole conjugates as checkpoint kinase 2 (Chk2) inhibitors with studying their activities alone and in combination with genotoxic drugs. European Journal of Medicinal Chemistry. 2017. Vol. 134. P. 392-405. DOI:

10.1016/j.ejmech.2017.03.090.

10. Wang Y.T., Shi T.Q., Zhu H.L., Liu C.H. Synthesis, biological evaluation and molecular docking of Benzimidazole grafted Benz sulfamide containing Pyrazole ring derivatives as novel tubulin polymerization inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 27. № 3. P. 502-515. DOI: 10.1016/j.bmc.2018.12.031.
11. Sabithakala T., Chittireddy V.R.R. DNA binding and in vitro anticancer activity of 2-((1H - benzimidazol-2-yl)methylamino)acetic acid and its copper(II) mixed-polypyridyl complexes: Synthesis and crystal structure. *Applied Organometallic Chemistry*. 2018. Vol. 32. № 12. P. e4550. DOI: 10.1002/aoc.4550.
12. Kumar P., Sharma P., Kumari S.S., Brahma U., Nekkanti S., Shankaraiah N., Kamal A. Benzimidazole based Derivatives as Anticancer agents: SAR Analysis for Various Targets // *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2017. Vol. 140. P. 128. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.09.006.
13. Спасов А.А., Косолапов В.А., Анисимова В.А., Жуковская О.Н. Противогипоксические свойства конденсированных производных бензимидазола с антиоксидантной активностью // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2019. Vol. 17. № 1. P. 31-36. DOI: 10.7816/RCF17131-36.
14. Jia J.J., Geng W.S., Wang Z.Q., Chen L., Zeng X.S. Role of thioredoxin-interacting protein in diseases and its therapeutic outlook. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2019. Vol. 84. № 3. P. 453. DOI: 10.1007/s00280-019-03869-4.
15. Le Gal K., Ibrahim M.X., Wiel C., Sayin V.I., Akula M.K., Karlsson C., Dalin M.G., Akyürek L.M., Lindahl P., Nilsson J., Bergo M.O. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Science translational medicine*. 2015. Vol. 7. №. 308. P. 308re8. DOI: 10.1126/scitranslmed.aad3740.
16. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. под редакцией А.Н. Миронова М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
17. ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартинформ, 2015. [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200115791> (дата обращения: 15.03.2023).
18. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Страсбург, 1986. [Электронный ресурс]. URL: <https://rm.coe.int/168007aba8> (дата обращения: 15.03.2023).
19. ГОСТ 32644-2014 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность - метод определения класса острой токсичности. М.: Стандартинформ, 2015. <https://docs.cntd.ru/document/1200115815> (дата обращения: 15.03.2023).
20. Прозоровский В.Б. Практическое пособие по ускоренному определению средних

эффективных доз и концентраций биологически активных веществ. Байкальск: Общество духовной и психической культуры, 1994. 46 с.