

На правах рукописи



Жанатаев Алий Курманович

**ЗНАЧИМОСТЬ ОЦЕНКИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ, ДОКЛИНИЧЕСКИХ И КЛИНИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЯХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»

Научный консультант:

Дурнев Андрей Дмитриевич – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», руководитель отдела лекарственной токсикологии

Официальные оппоненты:

Спасов Александр Алексеевич – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки Российской Федерации, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой фармакологии и биоинформатики

Ингель Фаина Исааковна – доктор биологических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, ведущий научный сотрудник отдела профилактической токсикологии и медико-биологических исследований

Сюбаев Рашид Даутович – доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный эксперт Управления №3 по доклиническим исследованиям безопасности лекарственных средств Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «16» июня 2026 года в 12.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.183.02 на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» Министерства образования и науки Российской Федерации (125315, Москва, Балтийская ул. д.8).

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 125315, Москва, Балтийская ул. д.8, ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» по адресу: 125315, Москва, Балтийская ул. д.8 и на сайте www.academpharm.ru.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.183.02
кандидат биологических наук



Васильева Екатерина Валерьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Мутационная теория наследственной изменчивости и учение об индуцированном мутагенезе определили вещества и факторы, способные индуцировать мутации, как важнейший этиопатогенетический фактор, угрожающий здоровью людей настоящего и последующих поколений (Бочков Н.П., 2003; Hayashi M., 2022). По мере совершенствования методических приемов оценки целостности генома и накопления новых фундаментальных знаний стало очевидно, что опасность для жизни и здоровья человека представляют не только мутации, но также повреждения ДНК, ранее рассматриваемые исключительно как первичные предмутационные события, не имеющие самостоятельной медицинской значимости (Дурнев А.Д., Жанатаев А.К. и др., 2013; Siametis A., Garinis G.A., 2025). Сегодня весь пул повреждений генома – генные, хромосомные, геномные мутации и повреждения ДНК – объединяются общим термином генотоксичность, а агенты, обладающие генотоксичностью, рассматриваются как представляющие безусловную опасность, и их распространение в среде подлежит строгому контролю.

Выявление и предупреждение применения генотоксикантов в системе общепринятого доклинического и клинического скрининга безопасности лекарственных средств рассматривается как мера наиболее конструктивного предупреждения генотоксических воздействий (Абилев С.К., Глазер В.М., 2013; Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Еремина Н.В., 2022). В современной регуляторной практике сложилась и успешно функционирует гармонизированная система тестирования лекарственных средств на генотоксичность, позволяющая с высокой эффективностью выявлять генотоксиканты и потенциальные канцерогены. Основу ее методологии составляют сформированные в батареи валидированные тесты, регистрирующие различные категории генотоксических событий (Baldrick P., 2021; Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., 2022).

Расширение фундаментальных представлений о механизмах генотоксических эффектов и их патогенетической роли, новые вызовы, возникающие вследствие инновационного развития фармакологии, и выявление недостатков существующей методологии на основе опыта практического применения, определяют в совокупности необходимость ее постоянного совершенствования (Steiblen G., Benthem J.V., Johnson G., 2020; Luan Y., Нонга М., 2022; Енгальчева Г.Н., Сюбаев Р.Д., Дурнев А.Д., 2025).

Новые методические возможности по регистрации повреждений ДНК и наблюдения, выполненные на их основе, определили необходимость разработки и внедрения в практику доклинической оценки безопасности лекарственных средств методов оценки генотоксичности во «вторичных» органах/тканях, в дополнение к традиционно анализируемым тканям с высокой пролиферативной активностью (Sun S., Osterman M.D., Li M., 2019; Menz J., Götz M.E., Gündel U. и др., 2023).

Актуальность приобрела разработка методических подходов по оценке генотоксичности в половых клетках, поскольку регламентированные тесты в силу ряда значимых недостатков ограничены для рутинного применения в экспертной генотоксикологической оценке и не позволяют в полной мере оценить

генотоксические риски для будущих поколений (Yauk C.L., Aardema M.J., Benthem J. и др., 2015).

Сегодня наблюдается стремительный рост разработки и применения фармацевтических продуктов на основе наноматериалов. Уникальные физико-химические свойства наноматериалов определяют специфичность механизмов реализации их биологических и токсических эффектов, что, в свою очередь, требует адаптации разработанных изначально для химических соединений методологических подходов к оценке безопасности, включая генотоксичность (Thu H.E., Haider M., Khan S. и др., 2023; Andreoli C., Dusinska M., Bossa C. и др., 2025).

Еще немногочисленные исследования, демонстрирующие качественную сопряженность между результатами, полученными в экспериментах *in vivo*, и данными наблюдений по коррекции генотоксических эффектов у тех или иных групп людей, подтверждают возможность антигенотоксической защиты человека и указывают на перспективы разработки фармакологических средств коррекции генотоксических эффектов и предупреждения генотоксически обусловленных заболеваний (Słoczyńska K., Powroźnik B., Rekała E. и др., 2014; Дурнев А.Д., 2018). Работа в этом направлении требует системной оценки эффектов в разных органах и тканях, что методически возможно только на основе определения целостности ДНК и актуализирует адаптацию учета повреждений ДНК к задаче разработки средств фармакологической защиты генома.

Помимо экзогенно-индуцированной генотоксичности важной проблемой является эндогенная генотоксичность. Увеличение поврежденности ДНК выявлено при сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, цереброваскулярных, аутоиммунных, психиатрических заболеваниях, глазных болезнях, метаболическом синдроме, сахарном диабете, хронической обструктивной болезни легких (Milic M., Frustaci A., Del Bufalo A. и др., 2015; Ishida M., Sakai C., Ishida T., 2023). Роль возникающих повреждений ДНК в их патогенезе до конца не ясна, однако на сегодня уже очевидно, что они могут запускать процессы (сенесценцию, клеточную гибель, воспаление), приводящие к усугублению первичного патологического состояния, прогрессированию и хронизации заболевания. Выявление эндогенно-индуцированной генотоксичности и разработка средств для ее антигенотоксической коррекции требует высокочувствительных методических «инструментов».

Решение обозначенных и многих других задач стало возможным с разработкой метода оценки повреждений ДНК – метода ДНК-комет, обладающего такими преимуществами, как интегральная оценка повреждений ДНК на уровне отдельных клеток, возможность дифференцированного анализа различных типов повреждений ДНК, применимость к любым типам клеток *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* независимо от их пролиферативного статуса, минимальное количество необходимого для анализа материала (Azqueta A., Collins A.R., 2013; Cordelli E., Bignami M., Pacchierotti F., 2021). Метод сегодня рассматривается в качестве одного из базовых в стратегиях оценки безопасности лекарственных средств, наноматериалов, химикатов крупнотоннажного производства (Kirkland D., Uno Y., Luijten M., Beevers C. и др., 2019; Илюшина Н.А., 2021; Gutleb A.C., Murugadoss S., Stepińnik M. и др., 2025). Метод ДНК-комет находит широкое применение в целях оценки эндогенной генотоксичности и

генотоксикологического биомониторинга (Ladeira C., Møller P., Giovannelli L. и др., 2024).

Несмотря на положительный опыт применения метода ДНК-комет в фундаментальных и прикладных исследованиях, вопросы воспроизводимости и интерпретации получаемых данных, а также методические аспекты использования метода требуют уточнения и адаптации под актуальные задачи разработки лекарственных средств и средств защиты генома (Forchhammer L., Johansson C., Loft S. и др., 2010; Vasquez M.Z., Dewhurst N.E., 2024). Их решению на основе анализа собственного опыта исследования поврежденности ДНК в половых и соматических клетках разных тканей посвящена настоящая работа.

Степень разработанности темы. Анализ причин вариабельности результатов, получаемых методом ДНК-комет в приложении *in vitro* и *in vivo* исследований, активно изучается с момента его разработки и внедрения в практику (Azqueta A., Gutzkow K.B., Brunborg G. и др., 2011). На основе результатов масштабных межлабораторных исследований разработаны унифицированные протоколы проведения метода (Azqueta A., Muruzabal D., Boutet-Robinet E. и др., 2019; Møller P., Azqueta A., Boutet-Robinet E. и др., 2020). Вместе с тем анализ появляющихся экспериментальных исследований, выполненных с применением метода ДНК-комет, свидетельствует о сохраняющейся меж- и внутрилабораторной вариабельности данных.

В области разработки методических подходов для оценки генотоксичности в половых клетках достигнут определенный прогресс в отношении мужских половых клеток, прежде всего на основе разработки методических приемов по регистрации повреждений ДНК (Gajski G., Ravlić S., Godschalk R. и др., 2021). В то же время проблема оценки потенциальной генотоксичности в женских половых клетках, а также в эмбриональных клетках, на сегодня не имеет методических решений или предложений.

Оценка генотоксичности наноматериалов широко обсуждается в последнее десятилетие. На основе анализа накопленного пула экспериментальных данных предложена стратегия (дорожная карта) оценки генотоксичности наноматериалов, предусматривающая приоритетность *in vivo* исследований, базовым методом которой определен метод ДНК-комет (Doak S.H., Andreoli C., Burgum M.J. и др., 2023). Разработка соответствующих протоколов проведения таких исследований требует накопления фактологического материала в экспериментах с различными видами наноматериалов.

Исследования в области антигенотоксической защиты сосредоточены на фактологическом выявлении потенциальных к разработке средств, преимущественно проводимом в экспериментах *in vitro*. Исследования в экспериментах *in vivo* с развернутой оценкой органо- и тканеспецифичности эффектов единичны и фрагментарны (Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Еремина Н.В., 2022). Примеров исследований, посвященных применению в клинике средств с антигенотоксической активностью для коррекции эндогенно-индуцированной генотоксичности при различных заболеваниях и патологических состояниях, на сегодня не имеется.

Целью исследования явилась концептуальная разработка методологии оценки генотоксичности и антигенотоксичности лекарственных средств на основе практического опыта анализа поврежденности ДНК в экспериментальных, доклинических и клинических исследованиях.

Задачи исследования:

1. Выявить причины меж- и внутрилабораторной вариабельности данных в исследованиях с применением метода ДНК-комет.
2. Разработать методические приемы регистрации повреждений ДНК методом ДНК-комет в половых и эмбриональных клетках.
3. Охарактеризовать генотоксичность лекарственных средств-кандидатов и лекарственных средств с неоднозначными данными об их генотоксическом потенциале. Разработать методические рекомендации по проведению метода ДНК-комет.
4. Определить особенности проявления генотоксичности нанокристаллов кремния и катионных липосомальных наночастиц.
5. Оценить проявление эндогенно-индуцированной генотоксичности на биомоделях стрептозоцин-индуцированного диабета, алкогольной кардиомиопатии, перинатальной иммунной активации и возможность ее антигенотоксической коррекции при стрептозоцин-индуцированном диабете.
6. Исследовать органо- и тканеспецифичность антигенотоксических эффектов ряда соединений природного происхождения.
7. Апробировать метод ДНК-комет в клинике для мониторинга эндогенно-индуцированной генотоксичности в клетках крови у пациентов с тяжелой сочетанной травмой и невынашиванием беременности.
8. Исследовать эндогенно-индуцированную генотоксичность в клетках крови у пациентов с системной красной волчанкой и возможность ее антигенотоксической коррекции.
9. На основании полученных данных определить значимость оценки повреждений ДНК в генотоксикологических исследованиях лекарственных средств.

Научная новизна. Впервые показано, что меж- и внутрилабораторная вариабельность экспериментальных данных, получаемых методом ДНК-комет, связана с различиями в технических условиях проведения этапов щелочной денатурации и электрофореза.

Впервые показано, что индуцируемая *in vivo* поврежденность ДНК в ооцитах экспериментальных животных может быть выявлена у полученных от них одно- и двухклеточных эмбрионов.

Выявлены ранее неизвестные, регистрируемые на уровне первичных повреждений ДНК генотоксические эффекты морфина, характеризующиеся тканеспецифичностью и зависимостью от режима применения.

Показано, что нанокристаллы кремния и катионные липосомальные наночастицы обладают органо- и тканеспецифической генотоксичностью. Для

катионных липосомальных наночастиц установлена длительная персистенция генотоксических эффектов в почках после однократного введения.

На модели стрептозоцин-индуцированного диабета у мышей показано, что гипергликемическое состояние сопровождается повреждением ядерной и митохондриальной ДНК, а также цитотоксическими эффектами в органах. Экспериментально продемонстрирована возможность антигенотоксической коррекции поврежденности ДНК при стрептозоцин-индуцированном диабете.

Впервые на экспериментальной *in vivo* модели показано, что перинатальная иммунная активация сопровождается повреждением ядерной и митохондриальной ДНК в клетках плаценты и эмбрионов.

Для природных соединений бетаина, бетанина, апигенина, нарингенина и гесперетина впервые с использованием двух конечных точек – хромосомных aberrаций и повреждений ДНК – установлены выраженные, характеризующиеся органо- и тканеспецифичностью антигенотоксические эффекты. Впервые предложен и экспериментально продемонстрирован принцип таргетного антимуtagenеза – направленной защиты определенных органов и тканей организма.

Метод ДНК-комет впервые апробирован в клинике у пациентов с тяжелой сочетанной травмой и невынашиванием беременности для оценки и мониторинга эндогенно-индуцированной генотоксичности в клетках крови.

В клиническом исследовании у пациентов с системной красной волчанкой показано, что введение в стандартную терапию лекарственного средства с антигенотоксической активностью – фабомотизола, способствует снижению эндогенно-индуцированной поврежденности ДНК и увеличению устойчивости клеток крови к прооксидантному цито- и генотоксическому воздействию *ex vivo*. Впервые выявлено нарушение в клетках крови пациентов с системной красной волчанкой экспрессии гена репарации окисленного гуанина – *hOGG1*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Установлено, что унификация технических условий – температурного режима проведения этапов щелочной денатурации/электрофореза и напряженности электрического поля в ходе электрофореза – обеспечивает меж- и внутрилабораторную сходимость и воспроизводимость результатов, получаемых с применением метода ДНК-комет.

Предложены методические приемы регистрации повреждений ДНК методом ДНК-комет в половых и эмбриональных клетках экспериментальных животных. Для оценки генотоксического риска в половых клетках наиболее целесообразным определен подход, предусматривающий регистрацию повреждений ДНК в одно- и двухклеточных эмбрионах, полученных от экспонированных животных.

Выявление повреждающей ДНК активности у морфина определяет необходимость развернутого исследования генотоксической опасности опиатов методами регистрации повреждений ДНК. Результаты, полученные при исследовании парацетамола, свидетельствуют о его генотоксической безопасности.

Показано, что применение только цитогенетического теста *in vivo* в клетках костного мозга для доклинической оценки генотоксичности лекарственных средств на основе наноматериалов может приводить к получению ложноотрицательных

результатов. Это определяет приоритетность использования для этой цели метода ДНК-комет, позволяющего оценивать эффекты в различных органах/тканях. Обоснована целесообразность использования клеток цельной периферической крови в качестве тест-системы для исследования генотоксических свойств наноматериалов в экспериментах *in vitro*.

Выявленные эндогенные генотоксические эффекты при стрептозоцин-индуцированном диабете и перинатальной иммунной активации расширяют текущие представления о генотоксическом статусе указанных моделей и свидетельствуют в пользу предположения о существенной роли повреждений ДНК в патогенезе диабета. В свою очередь результаты этих исследований создают необходимую экспериментальную базу для целенаправленного поиска средств фармакологической и/или нутрициологической коррекции эндогенных генотоксических эффектов при сахарном диабете и указывают на очевидные перспективы таких исследований в отношении широкого круга заболеваний, сопровождающихся повышением уровней поврежденности ДНК.

Полученные на трансляционной модели алкогольной кардиомиопатии данные о специфике спонтанной поврежденности ДНК и клеточной гибели в ткани миокарда определяют перспективность углубленных исследований по изучению роли и механизмов клеточной гибели в функционировании миокарда с целью определения новых фармакологических мишеней для терапии заболевания.

Анализ профиля тканеспецифичности антигенотоксических эффектов бетанина и апигенина определяет перспективность их дальнейшей разработки в качестве лекарственных средств, предназначенных для направленной протекции от цито- и генотоксических воздействий на нецелевые органы/ткани при проведении противоопухолевой терапии.

Установлена высокая эффективность метода ДНК-комет для оценки и мониторинга эндогенно-индуцированной генотоксичности в клинических исследованиях. При этом наряду с оценкой поврежденности ДНК целесообразна *ex vivo* оценка устойчивости клеток крови к прооксидантному цито- и генотоксическому воздействию, что может служить косвенным индикатором состояния системы антиоксидантной защиты.

Для применения в регуляторной токсикологии разработаны и утверждены методические рекомендации «Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений» (2006), «Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*» (2010), «Методические рекомендации по оценке ДНК-повреждений методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток в фармакологических исследованиях» (2012), «Методические рекомендации по оценке мутагенных свойств лекарственных средств» (2012), «Методические рекомендации по оценке канцерогенности лекарственных средств и вспомогательных веществ в краткосрочных тестах» (2012), «Оценка генотоксичности *in vitro* и *in vivo* методом ДНК-комет» (2025) и методические указания «Оценка мутагенной активности пестицидов» (2016).

Предложена концепция, предполагающая интеграцию поврежденности ДНК с другими генотоксическими конечными точками в единую методологическую

платформу с обратной связью, обеспечивающую сквозную комплексную оценку генотоксического и антигенотоксического потенциала лекарственных средств на всех этапах их разработки.

Методология и методы исследования. Основу методологии исследования составил метод ДНК-комет в щелочной и нейтральной версиях исполнения. В ряде исследований применена модификация метода ДНК-комет с использованием ферментов репарации для селективной регистрации поврежденных оснований ДНК. Для детекции цитогенетических эффектов *in vivo* использован метод учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей. В работе применялся метод ПЦР с детекцией продуктов амплификации в полиакриламидном геле, в «режиме реального времени», в градиентном денатурирующем гель-электрофорезе. В экспериментальных исследованиях эндогенно-индуцированной генотоксичности использованы модели стрептозоцин-индуцированного диабета, алкогольной кардиомиопатии и перинатальной иммунной активации. Оценка апоптотической гибели клеток миокарда проводилась методом мечения терминальной трансферазой (TUNEL) на парафиновых срезах.

Положения, выносимые на защиту:

1. Различия в технических условиях проведения этапов щелочной денатурации и электрофореза – причина меж- и внутрилабораторной варибельности экспериментальных данных, получаемых методом ДНК-комет.
2. Методические приемы регистрации повреждений ДНК методом ДНК-комет в половых и эмбриональных клетках экспериментальных животных.
3. Данные о генотоксической активности морфина и парацетамола.
4. Методологические особенности регистрации генотоксических эффектов наноматериалов *in vivo* и *in vitro*.
5. Особенности эндогенно-индуцированной генотоксичности при экспериментальном стрептозоцин-индуцированном диабете, алкогольной кардиомиопатии и перинатальной иммунной активации.
6. Антигенотоксическая активность ряда природных соединений и характеристики ее проявления в зависимости от дозы, режима обработки и исследованной ткани.
7. Применимость метода ДНК-комет для оценки и мониторинга эндогенно-индуцированной генотоксичности в клетках крови пациентов с тяжелой сочетанной травмой и с невынашиванием беременности.
8. Эндогенно-индуцированная генотоксичность в клетках крови пациентов с системной красной волчанкой и ее коррекция лекарственным средством с антигенотоксической активностью – фабомотизолом.
9. Повреждение ДНК как универсальный трансляционный биомаркер генотоксичности в экспериментальных, доклинических и клинических исследованиях лекарственных средств.

Степень достоверности результатов. Исследования *in vivo* выполнены с использованием релевантных для проведения соответствующих видов исследований

экспериментальных животных. Количество животных в группах было достаточным для статистической обработки и достоверного выявления наблюдаемых эффектов. Размеры выборок в клинических исследованиях были адекватны для достижения достаточной статистической мощности и выявления значимых эффектов. Эксперименты *in vitro* и *ex vivo* проведены не менее чем в трех повторностях. Для статистической обработки данных использованы общепринятые методы, выбор которых определялся типом анализируемых переменных, проверкой статистических допущений и дизайном исследования.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на российских и международных конференциях в виде устных и стендовых докладов: на VI (Ростов, 2010), VII (Санкт-Петербург, 2015), IX (Москва, 2021) и XI (Санкт-Петербург, 2025) Съезде Российского общества медицинских генетиков; на VII (Санкт-Петербург, 2019), VIII (Санкт-Петербург, 2021), X (Санкт-Петербург, 2023) и XII (Санкт-Петербург, 2025) Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные вопросы доклинических и клинических исследований лекарственных средств, биомедицинских клеточных продуктов и клинических испытаний медицинских изделий»; на 8-ой (Перуджа, Италия, 2009), 9-ой (Измир, Турция, 2011), 10-ой (Порто, Португалия, 2013), 12-ой (Памплона, Испания, 2017), 13-ой (Пушино, 2019) и 14-ой (Маастрихт, Нидерланды, 2020) Международной школе по методу ДНК-комет «International Comet Assay Workshop»; на IV (Казань, 2012), V (Ярославль, 2018) и VII (Москва, 2023) Съезде фармакологов России; на II Всероссийской научной конференции «Современная лекарственная токсикология: фундаментальные и прикладные аспекты» (Томск, 2017); на 5-ой (Москва, 2010) и 6-ой (Москва, 2015) Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам»; на Первой Всероссийской научной конференции «Токсикология и радиобиология XXI века» (Санкт-Петербург, 2017); на VII (Санкт-Петербург, 2019) и VIII (Саратов, 2024) Съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров; на 16-ом (Копенгаген, Дания, 2010) и 18-ом (Киото, Япония, 2018) Всемирном конгрессе фармакологов «World Congress of Basic and Clinical Pharmacology».

Личный вклад автора. Диссертационная работа является результатом исследований автора с 2001 по 2026 гг. Автору принадлежит ведущая роль во всех этапах исследования: от обоснования его направлений и сбора данных до анализа, систематизации и апробации результатов. Он лично участвовал в публикации результатов исследований в научных журналах и представлял их на российских и международных конференциях, формулируя основные теоретические выводы. В совместных экспериментальных работах вклад автора был ключевым. Диссертация написана самостоятельно.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 50 печатных работ, в том числе: 26 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, из которых 21 статья в журналах, индексируемых в Web of

Science или Scopus, 20 статей в журналах, индексируемых РИНЦ. Опубликовано 6 методических рекомендаций, 1 методические указания, 1 монография и получен 1 патент на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 312 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов экспериментов и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, который включает 374 публикации, из них 43 отечественных и 331 иностранных источник.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Экспериментальные животные. Эксперименты выполнены на самцах и самках половозрелых мышей F₁ CBA×C57Bl/6 массой 20–22 г в возрасте 6–7 недель; на самцах половозрелых мышей BALB/c массой 20–22 г в возрасте 6–7 недель; самцах и самках аутбредных крыс Wistar в возрасте 8–10 недель массой 200–230 г. Поставщиком лабораторных животных являлись филиалы «Столбовая» и «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России.

Животных содержали в условиях вивария ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» при 12-часовом световом цикле, свободном доступе к воде и пище. Условия содержания животных и работы с ними соответствовали требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета ЕС о защите животных, используемых в научных целях и рекомендации №33 Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 года «Руководство по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований». Исследования были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

Исследуемые вещества. В исследовании использованы следующие вещества: бетаин (Sigma-Aldrich, США); аспартам (Ajinomoto, Япония); лекарственный препарат «Афобазол» (Отисифарм, Россия); метформин (Тева, Израиль); апигенин, нарингенин, гесперетин, бетанин (Macklin, КНР); соединение PLX01107 (BioBlocks, США); парацетамол (ОАО «Татхимфармпрепараты», Россия); морфина гидрохлорид (субстанция, Минмедбиопром объединение «Чимкентбиофарм», Казахстан). Эксперименты с использованием морфина проведены при участии сотрудников лаборатории лекарственной токсикологии согласно имеющейся в учреждении лицензии на хранение, отпуск, приобретение и использование наркотических средств и психотропных веществ, внесенных в список II перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации в научных и учебных целях (регистрационный номер Лицензии Л017-01137-77/00146453 от 06.06.2017).

Методы исследования. *Метод ДНК-комет.* Общая процедура проведения метода ДНК-комет включала получение гель-слайдов с подложкой из агарозы, внесение исследуемых клеток в агарозный гель и нанесение на гель-слайды, лизис, щелочную денатурацию (щелочная версия метода), электрофорез, фиксацию/нейтрализацию, окрашивание и микроскопический анализ. В экспериментах с рециркуляцией электрофорезного раствора использовали перистальтический насос ВЗ-V PER (Etatron D.S., Италия) с устойчивым к щелочным растворам шлангом из сантопрена. Определение фактической напряженности электрического поля в камерах проводили измерением разности потенциалов в электрофорезном растворе на высоте ~1 мм над слайдами с использованием цифрового мультиметра MAS838 (Mastech, КНР) с позолоченными щупами. Измерение температуры электрофорезного раствора во время электрофореза проводили с помощью цифрового пирометра DT-8860B (CEM, КНР) и высокоразрешающего термографа с ИК-камерой охлаждаемого типа с матрицей фокальной плоскости (CEDIP, Франция). Для селективной детекции суммарно поврежденных пуринов и 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина применяли модификацию метода ДНК-комет (enzyme-modified comet assay) с использованием соответственно фермента формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы (Fpg) и 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека (hOGG1).

Получение ооцитов и одно- и двухклеточных эмбрионов мышей. Индукцию суперовуляции проводили методом гормональной стимуляции последовательным введением комбинированного гормонального препарата PG600 и хорионического гонадотропина Хорулона (MSD Animal Health, Голландия). PG600 вводили внутривенно однократно в дозе 5 МЕ/мышь. Для индукции овуляции Хорулон вводили внутривенно однократно в дозе 5 МЕ/мышь через 48 часов после введения PG600. Ооциты выделяли через 17 часов после введения Хорулона. Для получения эмбрионов самок после введения Хорулона подсаживали к самцам на ночь из расчета 1:1. Оплодотворение определяли утром по наличию копуляционной пробки, после чего самок отсаживали в отдельные клетки. Одно- и двухклеточные эмбрионы получали соответственно на 21 и 44 час после введения Хорулона.

Оценку поврежденности митохондриальной ДНК проводили методом ПЦР в режиме реального времени (Gureev A.P., Shaforostova E.A., Starkov A.A. и др., 2017).

Для цитогенетического анализа препараты клеток костного мозга мышей готовили стандартным суховоздушным методом. При анализе препаратов учитывали клетки с ахроматическими пробелами (гепами), хроматидными и хромосомными фрагментами, обменами различного типа.

Модели стрептозоцин-индуцированного диабета. Диабет моделировали у самцов мышей внутривенным введением стрептозоцина в двух режимах: однократно в дозе 200 мг/кг с эвтаназией животных на 10 и 21 день или 5-кратно в дозе 40 мг/кг с эвтаназией животных на 14 и 28 день после последнего введения стрептозоцина (Furman B.L., 2015).

Модель алкогольной кардиомиопатии. Использовали разработанную в «НИИ фармакологии имени В.В.Закусова» трансляционную модель, включающую принудительную алкоголизацию самцов крыс в течение 24 недель 10% раствором

этанола с последующим развитием в течение 28 дней абстиненции у активно потреблявших этанол животных (Крыжановский С.А., Колик Л.Г., Цорин И.Б. и др., 2017). Эхокардиографически верифицировали развитие кардиомиопатии, воспроизводящей основные клинико-диагностические признаки заболевания. Оценку апоптоза на парафиновых срезах миокарда проводили методом мечения терминальной трансферазой (TUNEL).

Перинатальную иммунную активацию у крыс моделировали однократным введением на 16 день или двукратным введением на 16 и 17 дни беременности липополисахарида в различных дозах на различные сроки.

Клинические исследования. *Исследования у пациентов с тяжелой травмой* проводились на базе НИИ общей реаниматологии им. В.А.Неговского ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии с согласия этического комитета учреждения. В первой серии исследований клиническая выборка пациентов включала 19 человек (13 мужчин и 6 женщин), перенесших тяжелую механическую травму без черепно-мозговой травмы. Во второй серии исследований выборка пациентов состояла из 95 пациентов (67 мужчин и 28 женщин) с тремя видами травм: тяжелая скелетная травма, черепно-мозговая травма и сочетанная травма (тяжелая скелетная и черепно-мозговая травмы). Группа сравнения включала 22 здоровых добровольца. В обеих сериях исследований забор крови у здоровых доноров производился однократно из локтевой вены, у пациентов – из подключичной вены при поступлении в реанимационное отделение (день 0), на 3, 5, 7 и 15 сутки.

Исследования у пациентов с неразвивающейся беременностью проводились на базе гинекологических отделений государственных бюджетных учреждений здравоохранения города Москва «Городская клиническая больница №1 им. Н.И.Пирогова Департамента здравоохранения города Москва» и «Городская клиническая больница №24 Департамента здравоохранения Москвы» с согласия этических комитетов учреждений. Выборка пациентов состояла из 69 беременных женщин, объединенных в 3 группы: группа I – с диагнозом «начавшийся выкидыш; ретрохориальная гематома» (20 пациентов); группа II – с неразвивающейся беременностью (25 пациентов); группа III – с физиологически протекающей беременностью и с отсутствием репродуктивных потерь в анамнезе (24 пациента). Группу сравнения составили 25 здоровых небеременных женщин с отсутствием репродуктивных потерь в анамнезе. Образцы венозной крови у пациентов групп I и III отбирали на 10–11, 12–13 и 14–15 недели гестации, у пациентов группы II – на 10–11 неделе.

Исследования у пациентов с системной красной волчанкой проводились на базе ФГБУН «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А.Насоновой» с согласия этического комитета учреждения. В исследовании по оценке экспрессии гена *hOGG1* выборка составила 18 пациентов (все женщины) со средней продолжительностью заболевания 10 лет (от 2 до 30 лет). Анализ экспрессии гена *hOGG1* проводили методом ПЦР с обратной транскрипцией. Для определения возможных изменений в первичной последовательности экзонов гена *hOGG1* использовали анализ в градиентном денатурирующем гель-электрофорезе (DGGE анализ).

Исследование по оценке поврежденности ДНК клеток крови у пациентов и влияния на нее приема фабомотизола включало две группы: I группа – пациенты, дополнительно к основному лечению получавшие фабомотизол (таблетки «Афобазол» в дозе 30–60 мг/сут) в течение 1 месяца (30 пациентов); II группа – пациенты, дополнительно к основному лечению получавшие плацебо в течение 1 месяца (30 пациентов). На момент включения в исследование пациенты обеих групп были сравнимы по полу, возрасту, длительности и степени активности заболевания. Группы сравнения составили 14 здоровых добровольцев (11 женщин, 3 мужчин). Образцы венозной крови у здоровых доноров отбирали однократно, у пациентов – до и после соответствующей терапии.

Статистическая обработка данных. В методе ДНК-комет в исследованиях *in vivo* в качестве статистической единицы использовали медианное значение показателя %ДНК в хвосте для одного органа/ткани от одного животного. В исследованиях *in vitro* и *ex vivo* в качестве статистической единицы использовали медианное значение показателя %ДНК в хвосте для одной повторности одной экспериментальной точки или образца крови от одного донора. Результаты представляли в виде среднего и стандартного отклонения. Полученные в *in vivo* исследованиях данные подвергали однофакторному дисперсионному анализу (one-way ANOVA) с последующим *post-hoc* анализом с использованием критерия Даннета для множественных сравнений. Если распределение в группах отличалось от нормального (критерий Шапиро-Уилка) и/или выявлялись отличия в дисперсиях (критерий Барлетта) проводили логарифмическое преобразование показателей с последующим анализом с использованием критерия Даннета. Оценку статистической значимости различий между двумя группами проводили с использованием одностороннего U-критерия Манна-Уитни (*in vitro* и *in vivo* исследования) или Краскела-Уоллиса (*in vitro* исследования), для зависимых выборок – критерия Вилкоксона. Статистическую обработку данных цитогенетического анализа проводили с использованием ϕ – критерия (углового преобразования) Фишера путем сравнения долей аберрантных метафаз между группами. Статистическую обработку данных по уровням атипичных ДНК-комет и при оценке апоптоза в клетках миокарда крыс проводили с использованием критерия χ^2 . Результаты представляли в виде среднего и его ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выявление причин меж- и внутрилабораторной вариабельности данных в исследованиях с применением метода ДНК-комет

Для метода ДНК-комет проблемой остается значительная вариабельность данных, как внутри- и между сериями экспериментов, так и межлабораторная. Было предположено, что ключевую роль в вариабельности играют технические особенности проведения этапа электрофореза. Для подтверждения этой гипотезы проведено две серии экспериментов. В первой серии экспериментов проведена сравнительная оценка расчетной и фактической напряженности электрического поля (E) в пяти различных электрофоретических камерах и вклада выявляемых различий в вариабельность показателей спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК. Использовали пять

электрофоретических камер – SE-2, Sub-Cell 192, MultiSUB Screen 32, CSL-COM40 и COMPAС-50. Гель-слайды располагали на 12 участках площадки камер, согласно схеме, представленной на рисунке 1.

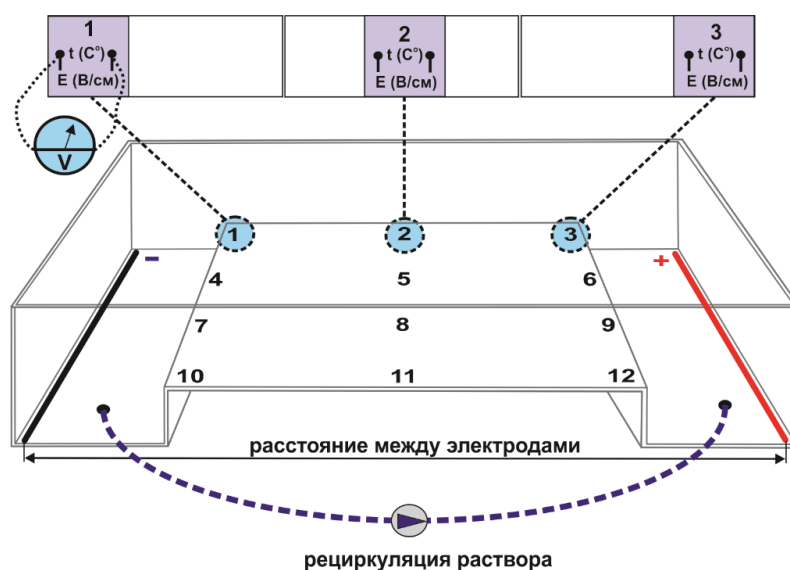


Рисунок 1 – Расположение гель-слайдов с клетками на площадке камер и участки (1–12) измерения локальной напряженности электрического поля и температуры электрофорезного раствора для камер CSL-COM40, Sub-Cell 192 и MultiSUB Screen 32

Площадка в камере SE-2 заполнялась 8 гель-слайдами. В камере Sub-Cell 192 возможна установка платформы, увеличивающей площадь площадки, поэтому измерения были проведены в двух вариантах.

Для достижения расчетной E в 1 В/см подаваемое на камеры напряжение (В) равнялось расстоянию (см) между электродами камеры. Фактическую напряженность электрического поля измеряли как разность потенциалов на 10-сантиметровом участке в середине площадки в начале (0–1 мин) и конце электрофореза (19–20 мин).

Только для камеры CSL-COM40 фактическое значение E совпало с расчетным (таблица 1). В остальных случаях значения E оказались выше или ниже фактической. Анализ микропрепаратов ДНК-комет выявил высокую вариабельность в показателях как спонтанной, так и индуцированной поврежденности ДНК. Эмпирически для каждой камеры было подобрано подаваемое напряжение, при котором E составляет 1 В/см. Унификация E в камерах позволила получить сходные уровни спонтанных и индуцированных повреждений ДНК.

Анализ данных по отдельным камерам выявил значительный разброс показателей поврежденности ДНК между идентичными гель-слайдами в условиях одного электрофореза. Было выдвинуто предположение, что наблюдаемая вариабельность обусловлена неоднородностью напряженности поля и/или температуры по площадке камер.

Таблица 1 – Значения спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК в клетках почек мышей при электрофорезе с расчетной и фактической напряженностью электрического поля 1 В/см

Камера	При расчете подаваемого напряжения по РМЭ				При E=1 В/см		
	РМЭ	E факт. (В/см)	%ДНК в хвосте (m±SD)		U (В)	%ДНК в хвосте (m±SD)	
			контроль	ММС 30 мг/кг		контроль	ММС 30 мг/кг
SE-2	27	1,1	1,9±0,9	13,1±1,7	26	1,6±0,8	12,2±1,5
CSL-COM40	25	1,0	3,4±2,8	13,3±3,7			
Sub-Cell 192	32	2,0	9,0±1,7	20,7±1,9	24	1,7±0,7	9,9±0,9
Sub-Cell 192 (с платформой)	32	1,2	2,2±0,3	15,5±2,9	30	1,5±0,4	12,8±2,2
MultiSUB Screen 32	46	1,4	4,9±1,9	16,7±3,2	38	1,8±0,5	11,8±1,6
COMPAC-50	21	0,6	0,9±0,3	4,6±0,6	28	1,5±0,8	12,9±2,1

Примечание – РМЭ – расстояние между электродами; E – напряженность электрического поля; U (В) – подаваемое на электроды напряжение; ММС – метилметансульфонат.

Измерения разности потенциалов на 1-сантиметровом отрезке над геле-слайдами (рисунок 1) выявили выраженную вариабельность E по площадке камер, снижающуюся к концу электрофореза (таблица 2). Температура электрофорезного буфера также варьировалась с крайними значениями на участках возле электродных резервуаров. Анализ микропрепаратов ДНК-комет показал высокую вариабельность показателя поврежденности ДНК между идентичными слайдами интактных и обработанных метилметансульфонатом клеток костного мозга мышей. Проведение рециркуляции электрофорезного раствора снизило неравномерность E и температуры раствора по площадке камер и, соответственно, вариабельность оцениваемой спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК.

Установление факта неоднородности температуры электрофоретического раствора позволило предположить ее влияние на оцениваемый показатель. Для проверки данного предположения проведена вторая серия экспериментов совместно с ведущим научным сотрудником лаборатории радиационной молекулярной биологии института экспериментальной и теоретической биофизики РАН Сиротой Н.П.

Межлабораторные сравнительные эксперименты показали, что различия в температурных условиях проведения щелочной денатурации и электрофореза могут приводить к межлабораторной вариабельности результатов (таблица 3). В лаборатории №1 этапы щелочной денатурации и электрофореза проводились в камере при комнатной температуре, тогда как в лаборатории №2 оба этапа проводили в холодильнике.

Таблица 2 – Вариабельность (CV, %) напряженности электрического поля (E) и спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК

Камера	Без рециркуляции раствора				С рециркуляцией раствора			
	E _{нач}	E _{окон}	%ДНК в хвосте		E _{нач}	E _{окон}	%ДНК в хвосте	
			контроль	ММС 30 мг/кг			контроль	ММС 30 мг/кг
CSL-COM40	22,6	10,2			6,1	3,8		
Sub-Cell 192	9,4	8,6	41,9	8,6	2,9	2,4	14,3	4,6
MultiSUB Screen 32	17,1	13,3	36,1	16,2	10,8	8,3	25,4	14,6

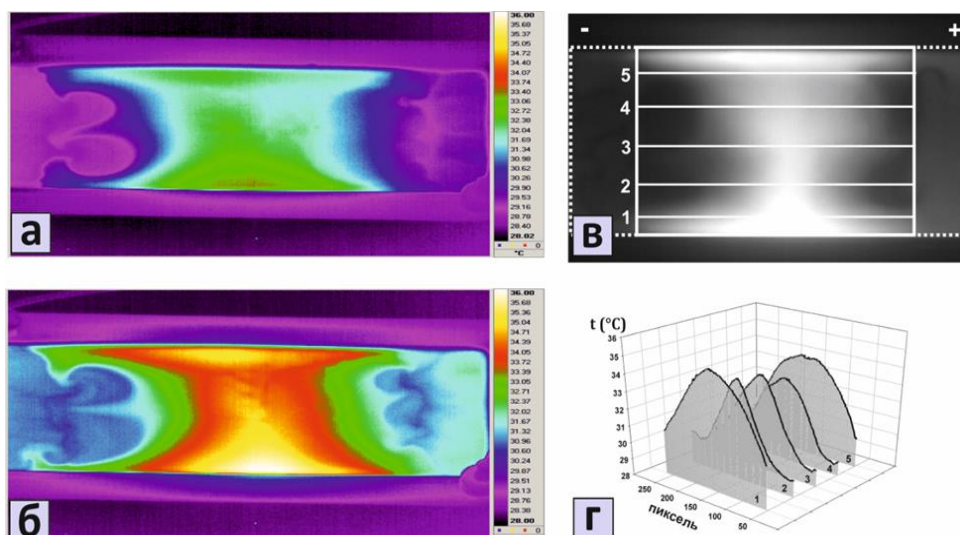
Примечание – E_{нач} (0–1 минута) и E_{окон} (19–20 минута) электрофореза; ММС – метилметансульфонат.

Таблица 3 – Результаты сравнительной межлабораторной оценки поврежденности ДНК, индуцируемой в клетках костного мозга мышей метилметансульфонатом *in vivo* и рентгеновским излучением *in vitro*

Эксперимент	Лаборатория №1	Лаборатория №2
	ЩД (4–6°C → 12–14°C) ЭФ (14–15°C → 19–20°C)	ЩД (4–6°C) ЭФ (4–6°C → 12–14°C)
%ДНК в хвосте		
Контроль	5,3±1,9*	9,3±1,3
ММС 10 мкМ	11,0±0,5	9,4±1,0
ММС 25 мкМ	21,7±0,5**	8,1±0,9
ММС 50 мкМ	35,6±3,4**	15,4±1,1
Контроль	9,3±4,8**	3,7±0,8
X-ray 3 Гр	34,0±4,4**	18,4±1,1
X-ray 5 Гр	42,7±4,4**	21,4±1,2
X-ray 8 Гр	49,3±9,3**	26,0±1,6

Примечание – * – p<0,05 и ** – p<0,001 по сравнению с результатами лаборатории №2 (критерий Краскела-Уоллиса); ММС – метилметансульфонат; ЩД и ЭФ – этапы щелочной денатурации и электрофореза соответственно (приведено изменение температуры электрофорезного раствора в ходе проведения этапа).

Эксперимент *in vitro* показал, что показатель %ДНК в хвосте зависит от температуры щелочной денатурации. Значения, полученные в диапазоне температур 8–20°C, статистически не отличались друг от друга, тогда как значимое увеличение показателя наблюдалось при 25°C. Измерение температуры при электрофорезе по всей поверхности электрофоретического раствора с помощью инфракрасного термографа показало, что температура значимо повышается и в процессе электрофореза – к окончанию электрофореза температура неоднородна по камере с максимумом в ее срединной части (рисунок 2).



Термограммы на 10 (а) и 20 (б) минуты электрофореза. Пунктирные и сплошные линии (в) обозначают границы электрофоретической камеры и платформы для гель-слайдов, соответственно (10 минута электрофореза). Профили температуры на платформе (г) представлены для пяти

различных областей, соответствующих линиям 1–5 на изображении (в).

Рисунок 2 – Результаты инфракрасного сканирования поверхности электрофорезного раствора

Разработка методических приемов регистрации повреждений ДНК методом ДНК-комет в половых и эмбриональных клетках

Проведение метода ДНК-комет на ооцитах и одно- и двухклеточных эмбрионах мышей. Одной из задач исследования являлась отработка получения гель-слайдов ДНК-комет ооцитов и эмбрионов. Стандартная процедура получения гель-слайдов предусматривает два слоя агарозы – нижний слой (подложка) и второй слой с клетками. Использование стандартного подхода приводило к потере до 90% ооцитов и до 54–60% эмбрионов. Нанесение второго слоя агарозы кончиком наконечника пипетки и использование третьего слоя агарозы поверх второго позволило снизить количественные потери до приемлемых 7–10%. Исходя из этого, для дальнейших экспериментов был отобран вариант с 3 слоями агарозы.

Ооциты и ранние эмбрионы мышей имеют зону пеллюцида – специализированную внеклеточную гликопротеиновую оболочку, выполняющую барьерные функции. Удаление зоны пеллюцида ооцитов приводило к полной диффузии их хроматина в геле и получению микропрепаратов ДНК-комет, не пригодных для анализа (рисунок 3, А). Сохранение зоны пеллюцида ограничивало полную диффузию хроматина в агарозный гель, приводя к формированию периклеточной полости в агарозном геле, позволяющей дифференцировать «хвост» ДНК-комет (рисунок 3, Б и В).

В случае с одно- и двухклеточными эмбрионами удаление зоны пеллюцида не приводило к диффузии хроматина в гель, и дальнейшие исследования проводили как с удаленной, так и сохраненной зоной пеллюцида (рисунок 4).

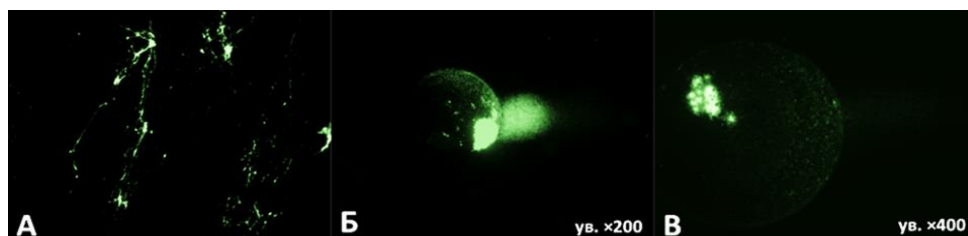


Рисунок 3 – Цифровое изображение с микропрепарата ДНК-комет ооцитов с удаленной (А) и сохраненной (Б и В) зоной пеллюцида

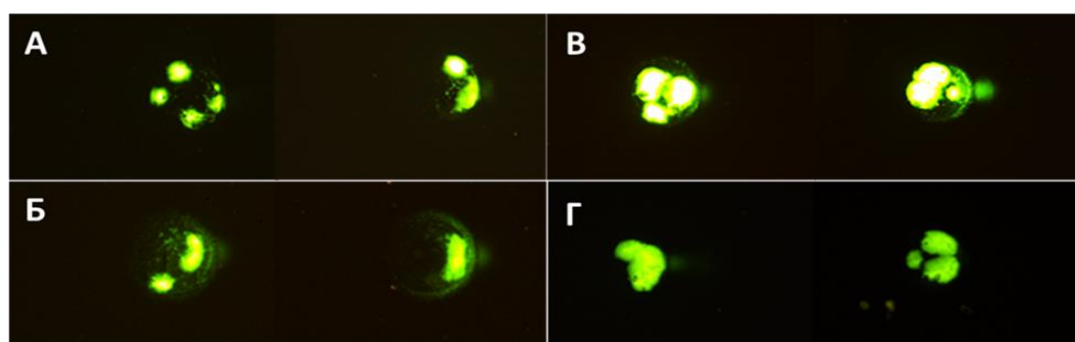


Рисунок 4 – Цифровое изображение с микропрепарата ДНК-комет одноклеточных эмбрионов мыши с сохраненной (А) и удаленной (Б) зоной пеллюцида, и двухклеточных эмбрионов с сохраненной (В) и удаленной (Г) зоной пеллюцида

В экспериментах *in vitro* с использованием в качестве индуктора повреждений ДНК диоксидина (таблица 4) и митомицина С (таблица 5) наблюдались выраженные различия в спонтанных показателях длины хвоста ДНК-комет при удалении или сохранении зоны пеллюцида. В результате при сохранении зоны пеллюцида в эксперименте с диоксидином выявлены статистически значимые эффекты, тогда как в случае с митомицином С эффектов не выявлено. Таким образом, удаление зоны пеллюцида является необходимым условием для высокой чувствительности метода, что в случае ооцитов технически не применимо и, таким образом, ограничивает приложение к ним метода ДНК-комет.

В экспериментах *in vivo* экспозиция самок мышей перед спариванием генотоксикантом метилметансульфонатом (10 мг/кг) не оказывала влияния на поврежденность ДНК в полученных от них одноклеточных эмбрионах, тогда как в дозе 20 и 30 мг/кг выявлено статистически значимое увеличение показателя (таблица 6).

Таблица 4 – Влияние диоксидина (1 мг/мл, 90 мин экспозиции) на уровень повреждений ДНК в одноклеточных эмбрионах *in vitro*

Условия эксперимента	Анализировано эмбрионов	Длина хвоста ДНК-комет (медиана [Q25%; Q75%], мкм)	<i>P</i> *
<i>с сохраненной зоной пеллюцида</i>			
Контроль	109	14,16 [0; 22,54]	
Диоксидин	124	31,21 [16,55; 43,42]	<0,01
<i>с удаленной зоной пеллюцида</i>			
Контроль	121	0,29 [0; 10,98]	
Диоксидин	120	24,57 [16,76; 31,94]	<0,001

Примечание – * – по сравнению с контролем (U-критерий Краскела-Уоллиса).

Таблица 5 – Влияние митомицина С (0,25 мг/мл, 90 мин экспозиции) на уровень повреждений ДНК в двухклеточных эмбрионах *in vitro*

Условия эксперимента	Анализировано эмбрионов	Длина хвоста ДНК-комет (медиана [Q25%; Q75%], мкм)	<i>P</i> *
<i>с сохраненной зоной пеллюцида</i>			
Контроль	115	13,87 [0; 22,38]	
Митомицин С	114	13,29 [9,97; 18,64]	0,48
<i>с удаленной зоной пеллюцида</i>			
Контроль	124	0,29 [0; 11,56]	
Митомицин С	123	12,72 [0; 18,64]	<0,001

Примечание – * – по сравнению с контролем (U-критерий Краскела-Уоллиса).

Этопозид в дозах 10 и 20 мг/кг также увеличивал уровень повреждений ДНК эмбрионов. Повышение показателя длины хвоста ДНК-комет в эмбрионах, полученных от животных, обработанных циклофосфамидом в дозе 40 мг/кг, не достигало статистической значимости.

Таблица 6 – Поврежденность ДНК одноклеточных эмбрионов, полученных от самок мышей, экспонированных этопозидом (ЭТ), метилметансульфонатом (ММС) и циклофосфамидом (ЦФ)

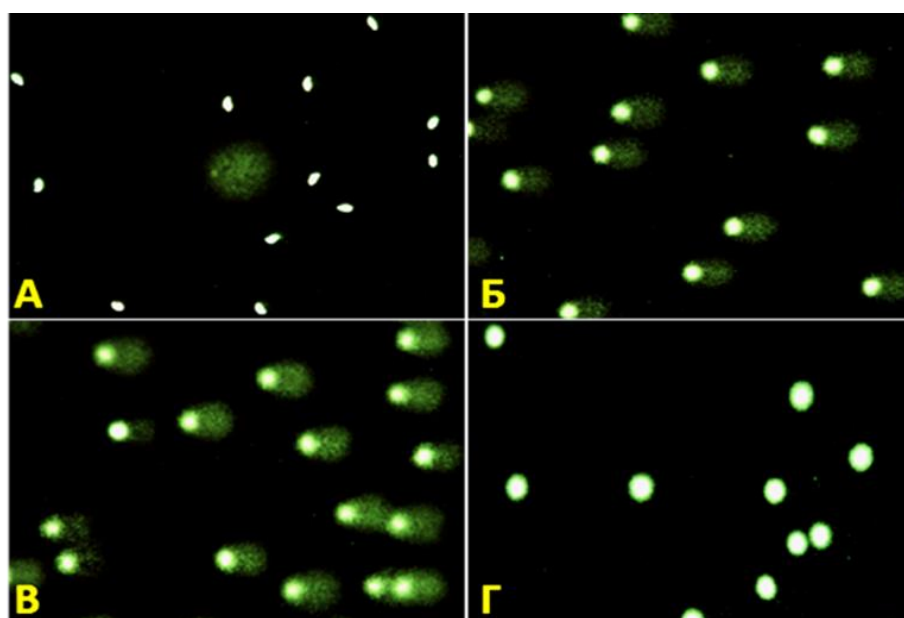
Группа	Анализировано эмбрионов	Длина хвоста ДНК-комет (медиана [Q25%; Q75%], мкм)	<i>P</i> *
Контроль	124	0,9 [0; 11,5]	
ММС 10 мг/кг	120	0,6 [0; 7,8]	0,37
ММС 20 мг/кг	122	6,5 [0,9; 14,7]	<0,01
ММС 30 мг/кг	120	33,1 [0,6; 47,5]	<0,001
ЭТ 10 мг/кг	121	13,0 [0; 22,8]	<0,001
ЭТ 20 мг/кг	121	40,8 [21,7; 53,5]	<0,001
ЦФ 40 мг/кг	125	6,1 [0; 10,4]	0,91

Примечание – * – по сравнению с контролем (U-критерий Манна-Уитни).

Проведение метода ДНК-комет на сперматозоидах мышей. В сперматозоидах эукариот гистоновые белки замещены протаминовыми, обеспечивающими сверхкомпактизацию и высокую степень стабилизации хроматина. Для депротенинизации хроматина сперматозоидов в состав лизирующего буфера включают агенты, ферментативно расщепляющие белки (протеиназа К) или разрушающие образуемые между цистеинами протаминов ковалентные S-S связи (дитиотреитол, ДТТ). При стандартных условиях с щелочной денатурацией и электрофорезом при pH>13 средний показатель поврежденности %ДНК в хвосте оказался сходным для всех вариантов деконденсации хроматина и варьировался в пределах 32–36% (таблица 7). Во всех случаях наблюдалось относительно гомогенное распределение ДНК-комет по степени поврежденности ДНК – от 25 до 44% ДНК в хвосте (рисунок 5).

Таблица 7 – Показатели поврежденности ДНК сперматозоидов интактных мышей при различных условиях деконденсации хроматина и электрофореза

Условия деконденсации	Значение рН при электрофорезе	%ДНК в хвосте (min-max)
Только ДТТ	>13	35,7 (30–37)
ДТТ → дииодсалицилат лития	>13	36,2 (28–39)
ДТТ → протеиназа К	>13	34,5 (25–42)
ДТТ → гепарин	>13	35,8 (26–41)
ДТТ → дииодсалицилат лития	12,6	32,5 (31–34)
	12,1	3,4 (2–5)
	7,5	2,2 (2–4)



А – без деконденсации хроматина (в середине кадра – ДНК-комета соматической клетки); Б – электрофорез при рН > 13; В – электрофорез при рН 12,6; Г – электрофорез при рН 12,1.

Рисунок 5 – Цифровые изображения с микропрепаратов ДНК-комет сперматозоидов мыши

Показатель %ДНК в хвосте при проведении щелочной денатурации и электрофореза при рН 12,6 не отличались значимо от таковых для рН > 13, тогда как при рН 12,1 и в условиях нейтрального электрофореза (рН 7,5) средние значения %ДНК в хвосте выражено снижались.

Поскольку переход щелочно-лабильных сайтов ДНК в одностранные разрывы происходит при значениях рН $\geq 12,6$, полученные данные позволяют утверждать, что ДНК сперматозоидов содержит в норме изначально высокий уровень щелочно-лабильных сайтов. Это обуславливает низкую чувствительность метода ДНК-комет для оценки генотоксических эффектов в сперматозоидах, в особенности при невысоких уровнях воздействий.

Оценка генотоксичности лекарственных средств-кандидатов и отдельных лекарственных средств методом ДНК-комет

В рамках экспертной доклинической оценки безопасности лекарственных средств методом ДНК-комет изучена генотоксическая активность 34 лекарственных средств-кандидатов, из них 16 средств-кандидатов, разработанных в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий». Генотоксическая активность выявлена для 3 средств-кандидатов. В одном случае результаты исследований с согласия спонсора (заказчика) опубликованы в виде научной статьи.

Оценка генотоксичности производного карбазола. Компанией Cleveland Biolabs Inc. был синтезирован ряд производных карбазола с противогрибковой активностью, среди которых высокий потенциал *in vitro* продемонстрировало соединение из подкласса ксеномицинов – PLX01107 (рисунок 6). В тесте Эймса на штаммах *S. typhimurium* и *E. coli* соединение не продемонстрировало мутагенной активности. В цитогенетическом тесте *in vivo* соединение при однократном введении на срок 24 часа дозозависимо индуцировало хромосомные aberrации в костном мозге мышей (рисунок 6).

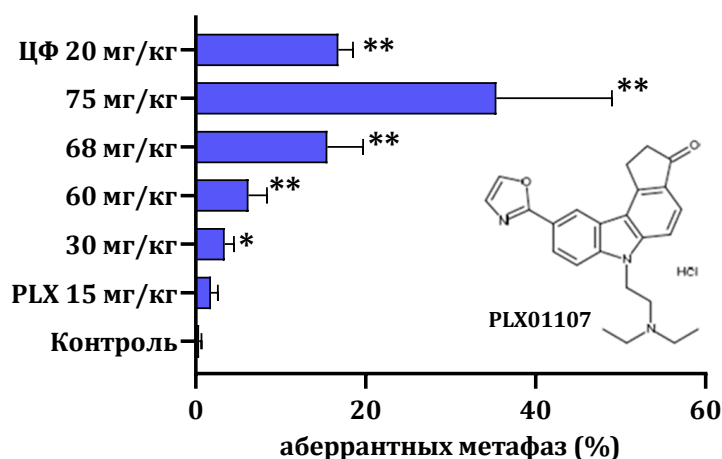
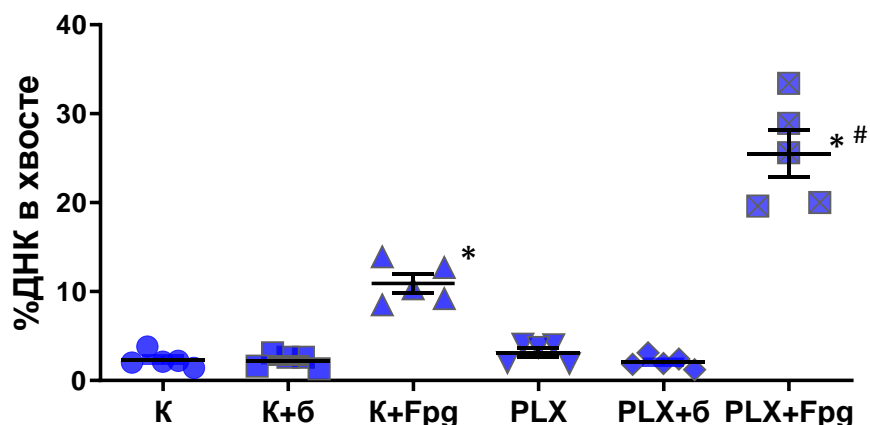


Рисунок 6 – Цитогенетические эффекты соединения PLX01107 (PLX) в клетках костного мозга мышей *in vivo*. ЦФ – циклофосфамид; * – $p < 0,05$ и ** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем (φ – критерий Фишера).

В эксперименте с 3-часовой экспозицией методом ДНК-комет не выявлено увеличения поврежденности ДНК в клетках печени, почек, костного мозга и селезенки, в условиях 24-часовой экспозиции генотоксический эффект зарегистрирован только в клетках печени. Для повышения чувствительности метода клетки костного мозга, полученные от животных, обработанных PLX01107 в дозе 30 мг/кг на срок 3 часа, исследовали в модификации метода с использованием формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы Fpg (рисунок 7).



K – клетки контрольных животных; *K+б* – те же клетки после обработки буфером для фермента; *K+Fpg* – те же клетки после обработки ферментом *Fpg*; *PLX* – клетки животных, получивших *PLX01107* в дозе 30 мг/кг на 3 часа; *PLX+б* – те же клетки после обработки буфером для фермента; *PLX+Fpg* – те же клетки после обработки ферментом *Fpg*. * – $p < 0,01$

по сравнению с группой *K+б*; # – $p < 0,001$ по сравнению с группой *PLX+б* (*U*-критерий Манна-Уитни).

Рисунок 7 – Специфическая детекция поврежденных пуриновых оснований в ДНК клеток костного мозга мышей

Полученные данные показали, что *PLX01107* специфично индуцирует повреждение пуриновых оснований ДНК, приводящее к возникновению формамидопиримидинов. Таким образом, модификация метода ДНК-комет с применением ферментов репарации ДНК значительно повышает чувствительность метода.

Оценка генотоксичности парацетамола методом ДНК-комет. Сведения о генотоксичности парацетамола противоречивы. В двух исследованиях для него показана способность индуцировать разрывы ДНК, однако в них не был оценен вклад цитотоксического действия на показатель генотоксичности. Установлено, что парацетамол, вводимый в дозах 30, 60 и 300 мг/кг на срок 3 часа и дозах 30 и 60 мг/кг на срок 24 часа, не индуцировал повреждения ДНК в клетках костного мозга, печени, почек, селезенки и головного мозга. При этом в дозе 300 мг/кг парацетамол увеличивал уровень атипичных ДНК-комет в клетках печени (14,4% против 1,2% в контроле), что расценивается как свидетельство его гепатотоксического, но не генотоксического действия (рисунок 8).

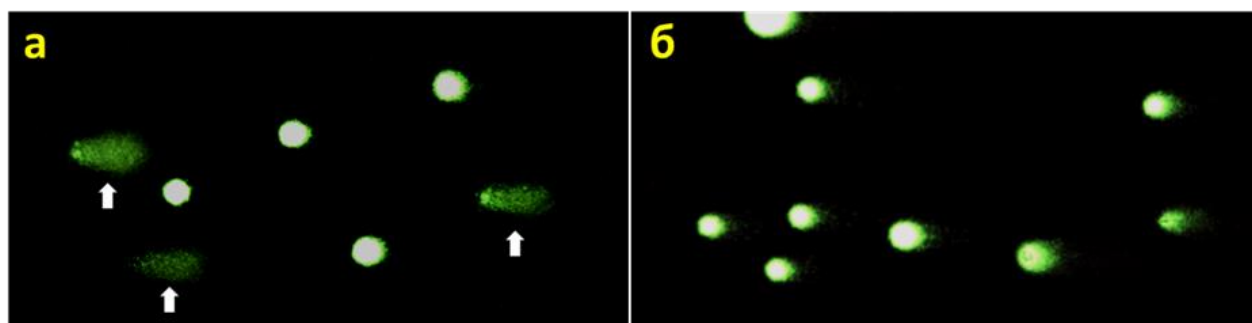


Рисунок 8 – Изображения ДНК-комет микропрепаратов печени мышей, обработанных парацетамолом (300 мг/кг) (а) и метилметансульфонатом (40 мг/кг) (б). Стрелками указаны атипичные ДНК-кометы.

Оценка генотоксичности морфина. Морфин находит сегодня широкое применение в клинике в качестве средства для купирования выраженного болевого синдрома при тяжелых заболеваниях, травмах и инфаркте миокарда, при подготовке к операции и в послеоперационном периоде. Сведения о генотоксичности морфина *in vivo*, как и других опиатов малочисленны и противоречивы. Для установления целесообразности масштабных исследований его генотоксичности проведено пилотное исследование с использованием двух *in vivo* тестов.

Установлено, что при однократном или многократном в течение 5 дней внутрибрюшинном введении в дозе 50 мг/кг морфин не индуцирует хромосомные aberrации в клетках костного мозга мышей. При однократном введении морфина зарегистрирован генотоксический эффект в клетках печени ($3,9 \pm 0,9\%$ ДНК в хвосте против $0,9 \pm 0,4\%$ в контроле), при 5-кратном введении – в клетках коры головного мозга ($3,7 \pm 0,8\%$ ДНК в хвосте против $1,5 \pm 0,5\%$ в контроле).

Оценка генотоксичности нанокристаллов кремния и катионных липосомальных наночастиц

Нанокристаллы кремния сегодня находят широкое применение в медицине в качестве основы контрастирующих средств для магнитно-резонансной томографии, носителей лекарственных средств с контролируемым высвобождением, в регенеративных технологиях и тканевой инженерии. Катионные липосомальные наночастицы рассматриваются как эффективные носители для адресной доставки терапевтических нуклеиновых кислот (ДНК, siРНК, мРНК и других).

Оценка генотоксичности нанокристаллов кремния. Исследования проведены совместно с сотрудниками кафедры физики низких температур и сверхпроводимости физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (рук. д.ф.-м.н., профессор Тимошенко В.Ю.). Однократное внутрибрюшинное введение мышам нанокристаллов кремния (нк-Si) в дозах 5 и 25 мг/кг на 24 часа, 7 и 14 дней, и в дозе 50 мг/кг на 24 часа не приводило к увеличению уровней aberrантных метафаз в клетках костного мозга мышей. В дозе 50 мг/кг нк-Si вызывали гибель 60–80% животных на 2–3 день экспозиции, что не позволило оценить их генотоксический потенциал в этой дозе при длительных сроках экспозиции. В условиях 3-часовой экспозиции нк-Si в дозах 5 и 50 мг/кг не индуцировали повреждения ДНК в клетках костного и головного мозга. Через 24 часа после введения нк-Si в дозе 5 мг/кг генотоксический эффект выявлен в клетках костного мозга, в дозе 50 мг/кг – в клетках костного и головного мозга. 7-дневная экспозиция нк-Si в дозе 5 мг/кг не приводила к увеличению поврежденности ДНК.

Оценка генотоксичности катионных липосомальных наночастиц. Исследования проведены совместно с сотрудниками лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (рук. к.б.н. Шиловский И.П.). Однократное или 5-кратное подкожное введение катионных липосомальных наночастиц (кЛН) в дозах 8, 20 и 40 мг/кг не вызывало хромосомных aberrаций и повреждений ДНК в клетках костного мозга мышей.

Увеличение поврежденности ДНК в 3,4 и 2,5 раза выявлено в клетках легких через 24 часа и на 3 день соответственно, после введения кЛН в дозе 40 мг/кг (рисунок

9, А). Повышение %ДНК в хвосте в печени (рисунок 9, Б) выявлено через 24 часа после введения кЛН в дозах 20 и 40 мг/кг (в 3,2 и 4 раза соответственно). В почках кЛН в дозах 20 и 40 мг/кг в 2,4–5,7 раз увеличивали поврежденность ДНК через 24 часа и на 3, 7 и 14 сутки после введения, и в 2,6 раза в дозе 8 мг/кг через 24 ч (рисунок 9, В). В селезенке кЛН не индуцировали повреждений ДНК (рисунок 9, Г).

Введение кЛН в дозе 40 мг/кг в течение 5 дней приводило к 3-кратному увеличению поврежденности ДНК в легких (рисунок 10). В печени наблюдалось увеличение показателя в 2,6 и 2,4 раза соответственно для доз кЛН 20 и 40 мг/кг, в почках в 2,1–3,2 раза для всех доз. В селезенке генотоксический эффект не выявлялся.

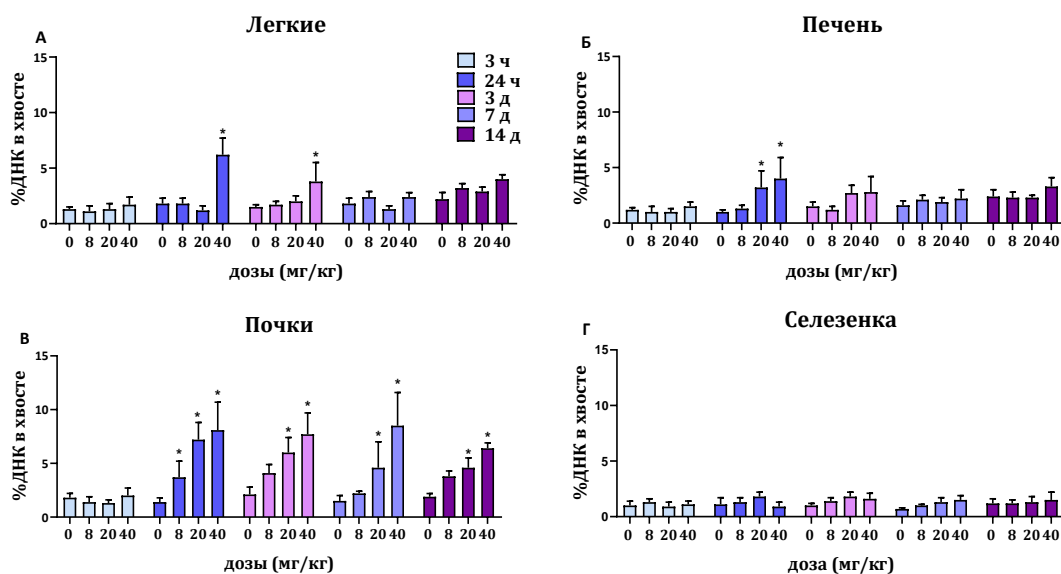


Рисунок 9 – Влияние однократного введения катионных липосомальных наночастиц на уровень повреждений ДНК в клетках легких (А), печени (Б), почек (В) и селезенки (Г) мышей. * – $p < 0,01$ по сравнению с контролем (критерий Даннета).

В клетках цельной периферической крови человека *in vitro* кЛН в концентрациях 2,5, 5 и 10 мкг/мл до 2,3 раз и в концентрациях 20 и 40 мкг/мл до 5,2 раз увеличивали поврежденность ДНК через 1 час после воздействия (рисунок 11). В наивысшей тестируемой концентрации 100 мкг/мл генотоксического эффекта не выявлено.

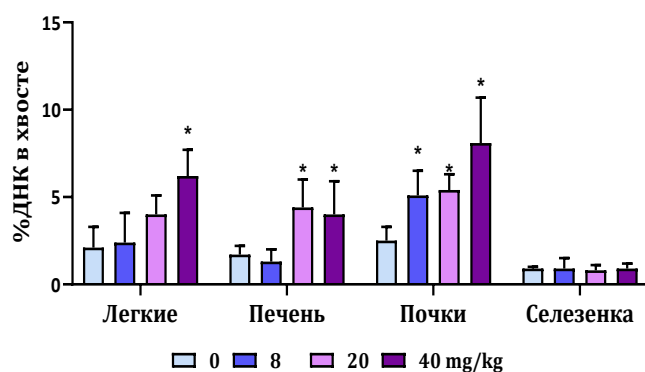


Рисунок 10 – Влияние 5-кратного введения катионных липосомальных наночастиц на уровень повреждений ДНК в органах мышей. * – $p < 0,01$ по сравнению с контролем (критерий Даннета).

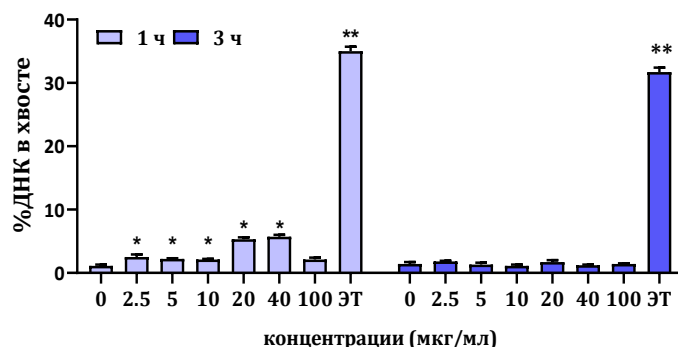


Рисунок 11 – Влияние катионных липосомальных наночастиц на уровень повреждений ДНК в клетках периферической крови человека *in vitro*. ЭТ – этопозид; * – $p < 0,01$ и ** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем (критерий Краскела-Уоллиса).

Оценка эндогенно-индуцированной генотоксичности

Поврежденность ДНК на моделях стрептозоцин-индуцированного диабета.

Однократное введение стрептозоцина в дозе 200 мг/кг индуцировало развитие у мышей гипергликемии (уровень глюкозы $21,9 \pm 5,8$ ммоль/л на 10 день и $29,1 \pm 6,5$ ммоль/л на 21 день против $8,5 \pm 1,1$ ммоль/л в контроле). Пятикратное введение стрептозоцина в дозе 40 мг/кг также индуцировало развитие гипергликемии (уровень глюкозы $19,8 \pm 4,0$ ммоль/л на 14 день и $16,8 \pm 5,5$ ммоль/л на 28 день против $8,5 \pm 1,1$ ммоль/л в контроле).

В модели с однократным введением стрептозоцина увеличение поврежденности ДНК выявлено на 10 день в клетках печени и почек, на 21 день – в клетках печени (рисунок 12). В модели с 5-кратным введением стрептозоцина увеличение поврежденности ДНК выявлено на 14 и 28 день в клетках печени и почек (рисунок 13).

Увеличение уровня атипичных ДНК-комет выявлено в печени и почках на 10 и 21 день при однократном введении стрептозоцина и на 14 и 28 день при 5-кратном введении, с максимальными значениями на 14 день – 44,3% в печени и 25,9% в почках.

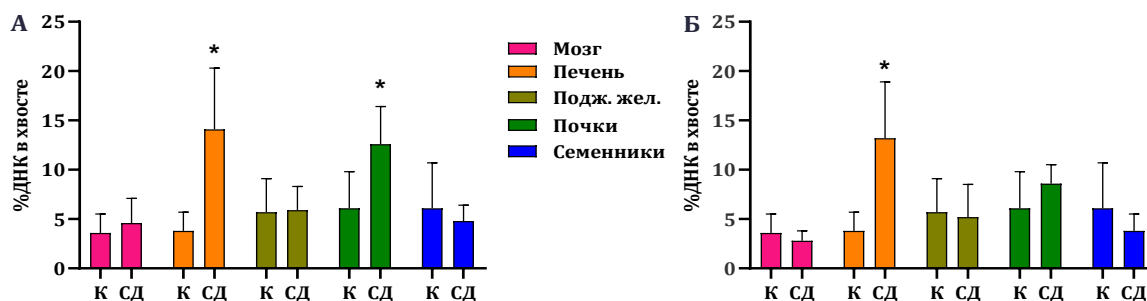


Рисунок 12 – Уровень повреждений ДНК в органах мышей на 10 (А) и 21 (Б) день после однократного введения стрептозоцина в дозе 200 мг/кг. К – контроль; СД – сахарный диабет; * – $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни).

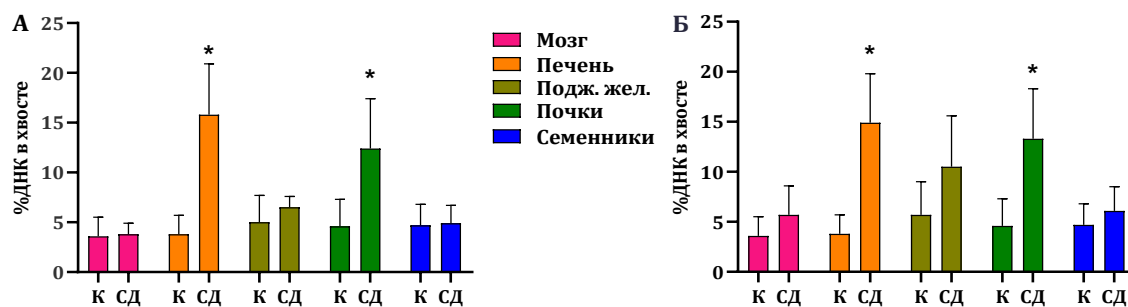


Рисунок 13 – Уровень повреждений ДНК в органах мышей на 14 (А) и 28 (Б) день после 5-кратного введения стрептозоцина в дозе 40 мг/кг. К – группа контроль; СД – группа сахарный диабет; * – $p < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни).

При оценке поврежденности мтДНК в модели диабета с однократным введением стрептозоцина на обоих сроках наблюдения для печени и почек выявлены выраженные межиндивидуальные различия с получением отрицательных значений оцениваемого показателя (рисунок 14, А). В клетках поджелудочной железы поврежденность мтДНК выявлена на обоих сроках наблюдения.

В модели диабета с многократным введением поврежденность мтДНК выявлена в клетках печени и почек на 14 сутки, поджелудочной железы – на 14 и 28 сутки (рисунок 14, Б). В остальных случаях, как и для модели с однократным введением, наблюдались межиндивидуальные различия с отрицательными значениями.

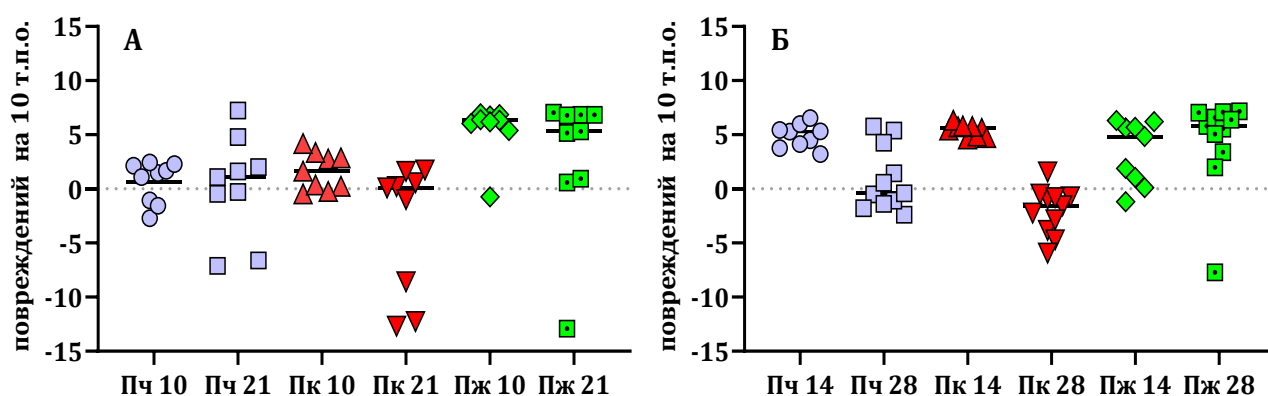


Рисунок 14 – Поврежденность мтДНК органов мышей с диабетом, индуцированным однократным в дозе 200 мг/кг (А) и многократным в дозе 40 мг/кг (Б) введением стрептозоцина. Пч – печень; Пк – почки; Пж – поджелудочная железа; представлены индивидуальные значения для животных; цифрами указаны сроки наблюдения (дни) после введения стрептозоцина.

Сроки, на которых наблюдалась наиболее выраженная поврежденность ДНК в органах (10 и 14 день, соответственно для модели с однократным и многократным введением стрептозоцина), были отобраны для экспериментов с антигенотоксической коррекцией.

Антигенотоксическая коррекция поврежденности ДНК при стрептозоцин-индуцированном диабете. В качестве средства коррекции поврежденности ДНК использовали комбинацию соединений с установленной в цитогенетическом тесте антигенотоксичностью – аспартама и бетаина. Водный раствор соединений предоставлялся как единственный источник питьевой воды после обработки животных стрептозоцином. Суточные дозы при этом составляли для аспартама 10–15 мг/кг, для бетаина 50–75 мг/кг. Метформин, как препарат сравнения, вводили ежедневно перорально в дозе 200 мг/кг.

В модели с однократным введением стрептозоцина (10 день) у животных с диабетом, получавших комбинацию «аспартам+бетаин», выявлено снижение уровня повреждений ДНК на 58,0% в клетках печени и на 53,8% в клетках почек (рисунок 15, А). В группе животных, получавших метформин, также выявлено снижение поврежденности ДНК в печени (44,2%) и почках (71,0%). В модели с многократным введением стрептозоцина (14 день) у мышей с диабетом, получавших комбинацию «аспартам+бетаин», выявлено снижение уровня повреждений ДНК на 52,2% в клетках печени и на 46,6% в клетках почек (рисунок 15, Б). В группе животных, получавших метформин, снижение поврежденности ДНК составило 30,8% в клетках печени и 38,3% в почках. На обоих моделях диабета не выявлено влияние комбинации «аспартам+бетаин» или метформина на уровень атипичных ДНК-комет.

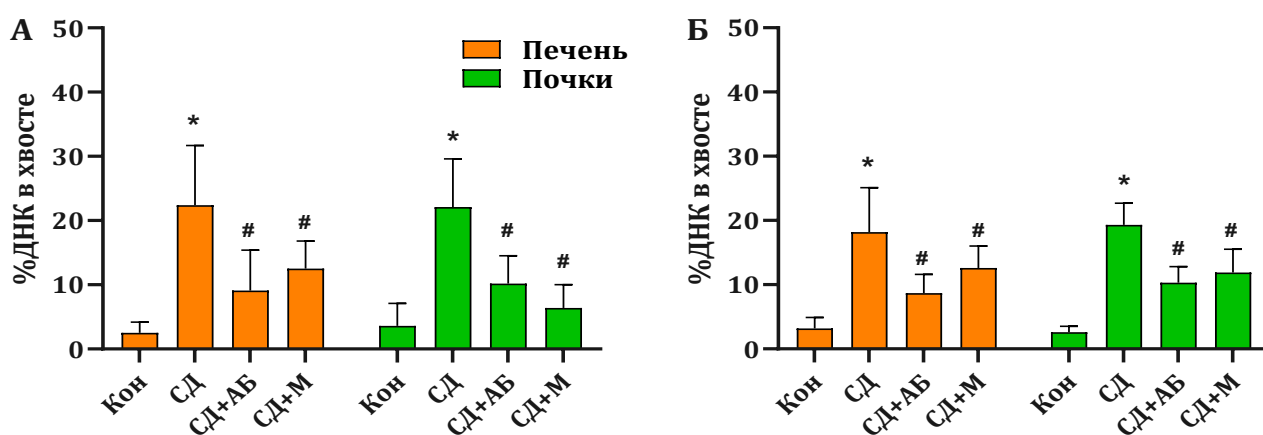


Рисунок 15 – Антигенотоксическая активность комбинации аспартам+бетаин на моделях диабета с однократным в дозе 200 мг/кг (А) и многократным в дозе 40 мг/кг (Б) введением стрептозоцина. Кон – группа контроля; СД – группа с сахарным диабетом; СД+АБ – группа с СД, получавшая комбинацию аспартам+бетаин; СД+М – группа с СД, получавшая метформин; * – $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля и # – $p < 0,01$ по сравнению с группой СД (U-критерий Манна-Уитни).

Эндогенная генотоксичность на модели алкогольной кардиомиопатии (АКМП). Эксперименты проведены совместно с сотрудниками лаборатории фармакологии кровообращения (рук. д.м.н. Крыжановский С.А.). Уровень повреждений ДНК в клетках миокарда крыс с АКМП не отличался статистически значимо от показателя для интактных животных (таблица 8). При проведении метода

ДНК-комет с нейтральным электрофорезом уровень повреждений ДНК в миокарде крыс с АКМП также не отличался от значения контроля.

Таблица 8 – Поврежденность ДНК клеток миокарда у крыс с алкогольной кардиомиопатией

Экспериментальная группа	%ДНК в хвосте	Атипичных ДНК-комет (%)
<u>Щелочной электрофорез</u>		
Интактный контроль	36,9±5,3	7,6
Интактный контроль (печень)	3,8±1,2	1,2
Крысы с АКМП	29,3±4,9 ($p_k=0,595$)*	2,7 ($p_k<0,001$)**
<u>Нейтральный электрофорез</u>		
Интактный контроль	12,0±3,9 [#]	8,0
Крысы с АКМП	9,7±2,0 ($p_k=0,570$)*	2,0 ($p_k<0,05$)**

Примечание – * – по сравнению с контролем (U-критерий Манна-Уитни); ** – по сравнению с контролем (критерий χ^2); # – $p<0,01$ по сравнению с щелочным электрофорезом (U-критерий Манна-Уитни).

При этом у интактных крыс значение поврежденности ДНК оказалось более чем в 3 раза ниже по сравнению с аналогичным показателем для щелочной версии метода (12,0±3,9 против 36,9±5,3% ДНК в хвосте), что свидетельствует о высоком спонтанном уровне щелочно-лабильных сайтов и/или односторонних разрывов ДНК в кардиомиоцитах. Выявлено снижение уровня атипичных ДНК-комет в группе крыс с АКМП по сравнению с контролем. При этом, доля кардиомиоцитов, находящихся на стадии апоптоза, не отличалась у животных интактного контроля и с АКМП.

Эндогенная генотоксичность на модели перинатальной иммунной активации. Двукратное введение липополисахарида (ЛПС) в дозе 0,1 мг/кг не оказывало влияния на уровень повреждений ДНК, тогда как в дозе 0,15 мг/кг через 6 часов после введения наблюдался цитотоксический эффект в клетках плаценты и туловища эмбрионов, заключающийся в высоком уровне (>85%) атипичных ДНК-комет (таблица 9). Введение ЛПС однократно в дозе 0,25 мг/кг приводило к гибели эмбрионов через 24 часа. При однократном введении ЛПС в дозе 0,2 мг/кг через 3 часа не выявлено увеличения повреждений ДНК в анализируемых тканях.

Поврежденность ДНК выявлена через 6 часов после введения ЛПС с наибольшей выраженностью в клетках головы эмбрионов. Через 24 часа уровень поврежденности ДНК, сходный с 6-часовой экспозицией, выявлен в клетках плаценты и туловища эмбрионов. Исследование на большей выборке животных (ЛПС 0,2 мг/кг, 6 часов) показали высокую вариабельность повреждений ДНК как между образцами плацент и эмбрионов у одного животного, так и между отдельными животными. Не установлено зависимости уровня поврежденности ДНК от положения эмбрионов в роге матки.

Таблица 9 – Поврежденность ДНК в клетках плаценты и эмбрионов крыс при различных дозах и режимах введения ЛПС

Ткань/ группа	Контроль (n=3)	ЛПС, мг/кг					
		0,1 мг/кг 2-кратно, 3 ч (n=2)	0,15 мг/кг, 2-кратно 6 ч (n=2)	0,2 мг/кг, 3 ч (n=3)	0,2 мг/кг, 6 ч (n=2)	0,2 мг/кг, 24 ч (n=2)	0,25 мг/кг 24 ч (n=3)
%ДНК в хвосте							
Плацента	1,8±0,6	2,2±0,3	ЦТ	1,8±0,6	4,5±0,8*	5,5±2,3*	ГЭ
Голова эмбриона	2,0±0,8	1,3±0,2		1,7±1,0	9,3±3,6*	2,3±0,1	
Туловище эмбриона	1,5±0,4	1,1±0,3		1,8±0,3	5,3±2,2*	4,8±2,1*	

Примечание – * – $p < 0,01$ по сравнению с контролем (U-критерий Манна-Уитни); ЦТ – цитотоксический эффект; ГЭ – гибель эмбрионов; n – количество животных в группе.

Образцы, полученные от крыс, обработанных ЛПС в дозе 0,2 мг/кг на срок 6 часов, также анализировали на поврежденность мтДНК (рисунок 16). Для тканей плаценты и туловища получены преимущественно отрицательные значения, для эмбриона – положительные. Выявлена положительная корреляция между показателем поврежденности ядерной ДНК (%ДНК в хвосте комет) и поврежденностью мтДНК в клетках туловища эмбриона ($r=0,65$; $p=0,023$).

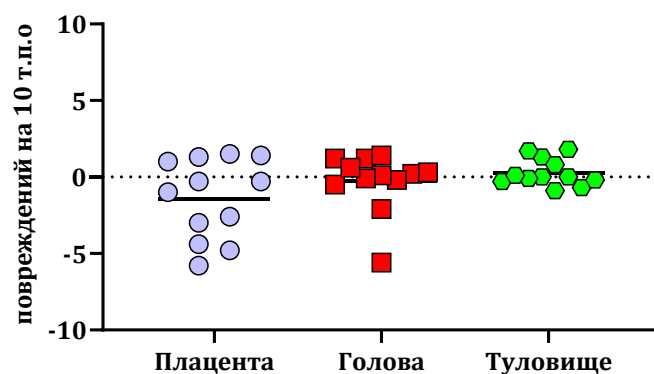


Рисунок 16 – Поврежденность мтДНК в клетках плаценты и эмбрионов крыс с перинатальной иммунной активацией. Представлены значения для одного эмбриона каудального и краниального расположения от каждого животного в группах.

Исследование органо- и тканеспецифичности антигенотоксических эффектов ряда соединений природного происхождения

Изучение антигенотоксичности бетаина. Бетаин, вводимый однократно внутрижелудочно в дозах 1, 10 и 100 мг/кг, проявил протекторную активность по отношению к цитогенетическим эффектам диоксида, снизив их на 52–100% (рисунок 17, А). Сходные результаты получены с модельным генотоксикантом

циклофосфамидом, за исключением дозы 10 мг/кг, в которой протекторный эффект оказался менее выраженным (рисунок 17, Б).

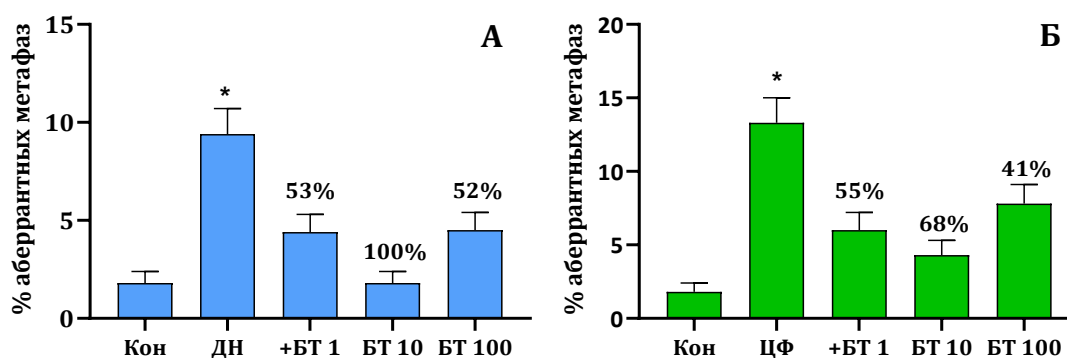


Рисунок 17 – Влияние бетаина (БТ) в дозах 1, 10 и 100 мг/кг на цитогенетические эффекты диоксида (ДН, 200 мг/кг) и циклофосфамида (ЦФ, 20 мг/кг) в клетках костного мозга мышей *in vivo*.

* – $p < 0,001$ по сравнению с контролем (Кон) (φ – критерий Фишера); в процентах указано снижение цитогенетического эффекта генотоксиканта.

Бетаин снижал повреждающую ДНК активность диоксида с наиболее выраженным антигенотоксическим эффектом в дозе 1 мг/кг в костном мозге и печени (рисунок 18). В экспериментах с метилметансульфонатом (30 мг/кг) бетаин продемонстрировал антигенотоксическую активность только в клетках костного мозга. Не выявлено протекторной активности бетаина в селезенке.

Снижение эффекта генотоксиканта (%)

костный мозг печень почки селезенка

Диоксидин

бетаин 1 мг/кг	63	74	54	н
бетаин 10 мг/кг	33	42	62	н

Метилметансульфонат

бетаин 1 мг/кг	35	н	н	н
бетаин 10 мг/кг	50	н	н	н

Рисунок 18 – Антигенотоксические эффекты бетаина в органах/тканях мышей *in vivo*. н – нет эффекта.

Изучение антигенотоксичности бетанина. Бетанин не проявлял повреждающей ДНК активности в органах/тканях и цитогенетической активности в клетках костного мозга мышей *in vivo*, что свидетельствует о собственной генетической безопасности соединения. В тесте на индукцию хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей бетанин, вводимый внутривенно однократно в дозах 25, 50 и 100 мг/кг, не оказывал влияния на цитогенетические эффекты диоксида (250 мг/кг) и метилметансульфоната (80 мг/кг). В тесте ДНК-комет

бетанин проявлял выраженную антигенотоксическую активность в клетках печени, желудка, 12-перстной и прямой кишки, на 35–70% снижая ДНК повреждающую активность диоксидина и метилметансульфоната (рисунок 19).

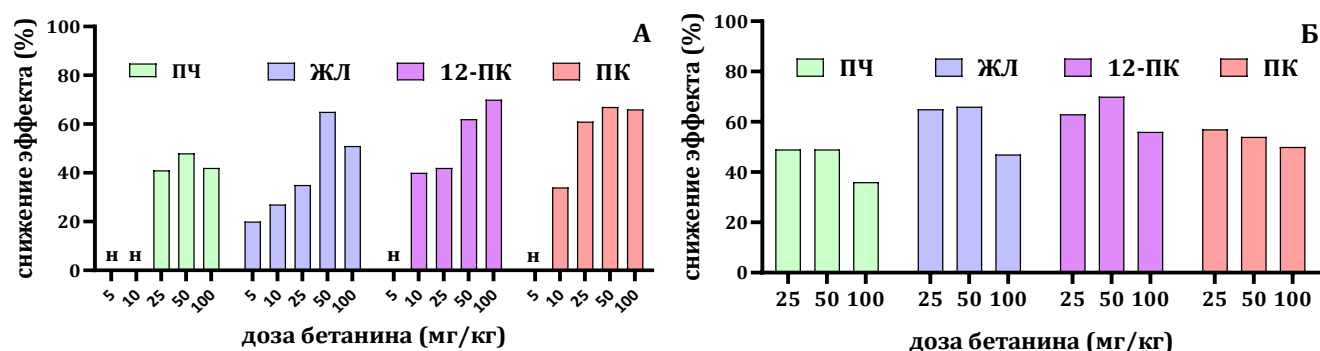


Рисунок 19 – Антигенотоксическая активность бетанина в органах мышей *in vivo* по отношению к эффектам диоксидина (А) и метилметансульфоната (Б). ПЧ – печень, ЖЛ – желудок, 12-ПК – 12-перстная кишка, ПК – прямая кишка; н – нет эффекта

Наибольшая протекторная активность выявлена в клетках 12-перстной и прямой кишки. В исследовании по определению наименьшей протекторной дозы бетанин в дозе 10 мг/кг снижал генотоксический эффект диоксидина в желудке, 12-перстной и прямой кишке, в дозе 5 мг/кг – только в желудке. Не выявлено антигенотоксической активности бетанина в клетках крови.

Изучение антигенотоксичности апигенина, нарингенина и гесперетина.

Исследуемые соединения вводили внутривентрикулярно трехкратно, с интервалом 24 часа между введениями, последнее из них сочеталось с введением генотоксиканта. Апигенин в дозах 5, 25 и 50 мг/кг, нарингенин и гесперитин в дозах 25, 50 и 100 мг/кг проявили выраженные, характеризующиеся органо- и тканеспецифичностью антигенотоксические эффекты по отношению к эффектам темозоломида (рисунок 20).

Снижение эффекта темозоломида (%)

	костный мозг	печень	почки	головной мозг	прямая кишка
<u>Апигенин</u>					
5 мг/кг	н	н	н (57)*	н	100
25 мг/кг	66	65	50 (87)	н	н
50 мг/кг	52	31	н (45)	н	100
<u>Нарингенин</u>					
25 мг/кг	н	н	н	н	49
50 мг/кг	48	н	н	44	54
100 мг/кг	62	н	н	26	н
<u>Гесперетин</u>					
25 мг/кг	23	н	33	42	39
50 мг/кг	н	н	29	23	47
100 мг/кг	н	н	31	29	32

Рисунок 20 – Антигенотоксические эффекты апигенина, нарингенина и гесперетина по отношению к эффектам темозоломида (50 мг/кг) в органах мышей *in vivo*. * – снижение (в %) уровня атипичных ДНК-комет; н – нет эффекта.

Цитогенетический анализ в клетках костного мозга *in vivo* выявил антигенотоксическую активность по отношению к эффектам темозоломида у всех трех соединений во всех использованных дозах (рисунок 21).

	Снижение эффекта генотоксиканта (%)			
	темозоломид (50 мг/кг)	циклофосфамид (20 мг/кг)	диоксидин (250 мг/кг)	метилметан- сульфонат (80 мг/кг)
<u>Апигенин</u>				
5 мг/кг	52 (47)*	н	38	н
25 мг/кг	73 (51)	34	52	54
50 мг/кг	49 (51)			
<u>Нарингенин</u>				
25 мг/кг	55	43	н	
50 мг/кг	49	71	н	
100 мг/кг	75			
<u>Гесперетин</u>				
25 мг/кг	39			
50 мг/кг	52			
100 мг/кг	55			

Рисунок 21 – Антигенотоксические эффекты апигенина, нарингенина и гесперетина по отношению к эффектам генотоксикантов в костном мозге *in vivo*.

* – при однократном введении через 1 час после темозоломида; н – нет эффекта.

Апигенин при введении через 1 час после темозоломида также проявлял выраженное антигенотоксическое действие. Апигенин также снижал цитогенетические эффекты циклофосфама, метилметансульфоната и диоксида. Нарингенин проявил антигенотоксическую активность по отношению к генотоксическим эффектам циклофосфама, но не диоксида.

Оценка эндогенной генотоксичности у пациентов с тяжелой сочетанной травмой и при невынашивании беременности

Оценка эндогенной генотоксичности у пациентов с тяжелой сочетанной травмой. В первой серии исследований выборка пациентов с тяжелой травмой составила 19 человек. Группа сравнения включала 14 здоровых доноров. Средне-групповой показатель поврежденности ДНК клеток крови у здоровых доноров составил $6,1 \pm 2,2\%$ ДНК в хвосте (рисунок 22). У пациентов в день поступления в реанимационное отделение (0 сутки) показатель составил $10,5 \pm 1,9\%$, что статистически значимо выше по сравнению с группой контроля. На 3, 5 и 7 сутки наблюдалось дальнейшее увеличение поврежденности ДНК, значение которого на 5 сутки оказалось статистически значимо выше по сравнению с 0 сутками.

С 5 суток значительная часть пациентов выбыла из наблюдения ввиду летального исхода. Анализ 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина в ДНК клеток крови не выявил статистически значимых отличий между группой здоровых доноров и пациентами на всех сроках наблюдения.

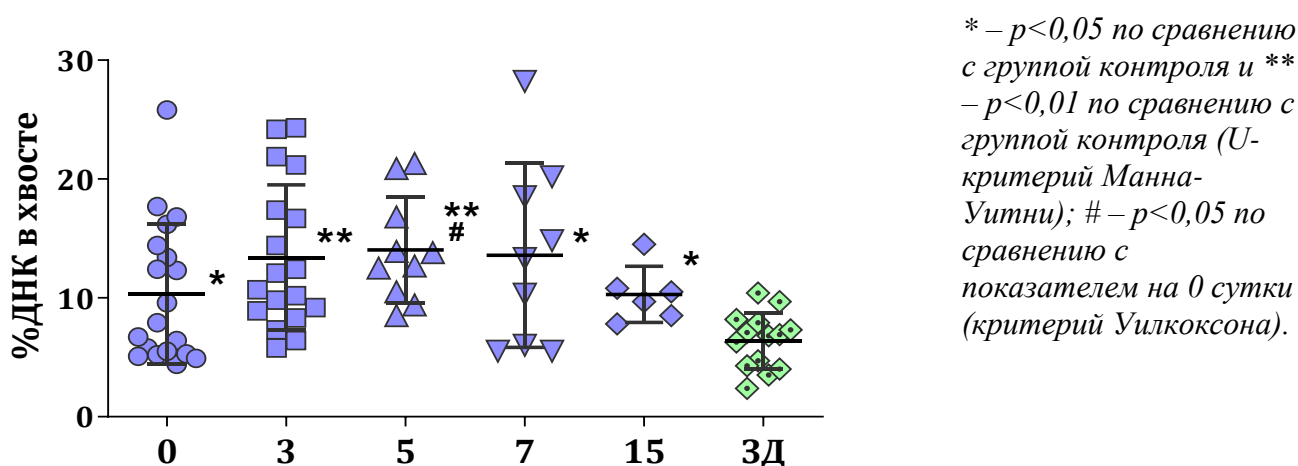


Рисунок 22 – Поврежденность ДНК клеток крови здоровых доноров (ЗД) и пациентов с тяжелой сочетанной травмой в день поступления в реанимационное отделение (0) и на 3, 5, 7 и 15 сутки наблюдения

На микропрепаратах ДНК-комет пациентов помимо атипичных ДНК-комет (рисунок 23, а), выявлены ранее не описанные ДНК-кометы большого размера с диффузно-распределенной ДНК, часто имеющие неправильную форму (рисунок 23, б). Такие ДНК-кометы классифицировали как «некротические».

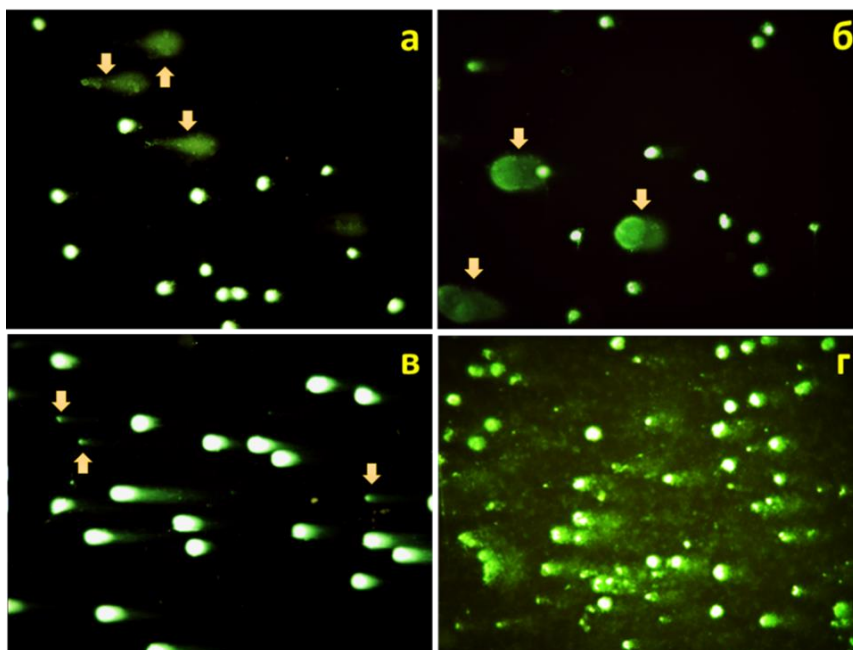


Рисунок 23 – Цифровые изображения с микропрепаратов ДНК-комет клеток пациентов с тяжелой сочетанной травмой. а – изображение с атипичными ДНК-кометами; б – с ДНК-кометами большого размера с диффузно-распределенной ДНК; в – с «малыми» ДНК-кометами (нейтральный электрофорез); г – с высоко-фрагментированной ДНК.

На микропрепаратах при нейтральном электрофорезе выявлены также ранее не описанные ДНК-кометы, имеющие типичную морфологию, но значительно меньших размеров (рисунок 23, в). У 8 пациентов на 3 или 5 сутки на микропрепаратах

наблюдалась высоко-фрагментированная ДНК, диффузно распределенная по гелю, и затрудняющая анализ и дифференцировку ДНК-комет (рисунок 23, г).

Средне-групповой показатель уровня атипичных ДНК-комет у здоровых доноров составил $0,9 \pm 0,4\%$ (рисунок 24). У пациентов в день поступления в реанимационное отделение (0 сутки) показатель составил $2,8 \pm 2,5\%$, что статистически значимо выше по сравнению с группой контроля. На последующие 3, 5 и 7 сутки наблюдалось дальнейшее увеличение уровней атипичных ДНК-комет, при этом значение на 3 сутки оказалось статистически значимо выше по сравнению с 0 сутками. На микропрепаратах клеток крови здоровых доноров не выявлено «некротических» ДНК-комет. Их содержание на микропрепаратах клеток крови пациентов в день поступления в реанимационное отделение (0 сутки) составило $4,9 \pm 5,9\%$ и далее возрастало, однако значимых различий между точками наблюдений вследствие высокой вариабельности показателя не выявлено.

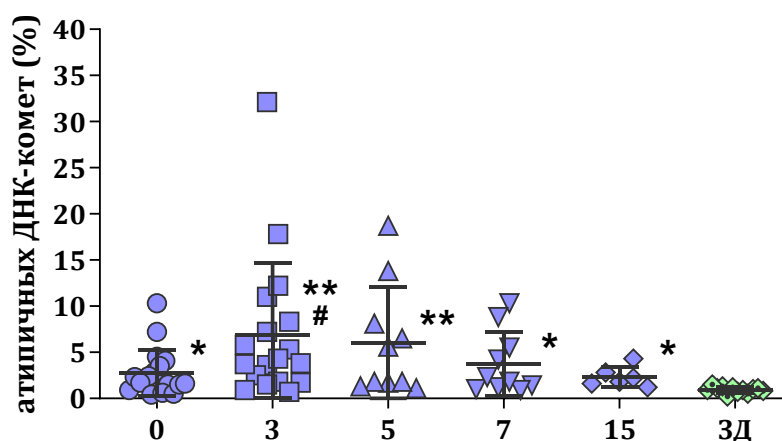


Рисунок 24 – Уровень атипичных ДНК-комет на микропрепаратах крови здоровых доноров (ЗД) и пациентов с тяжелой сочетанной травмой в день поступления в реанимационное отделение (0) и на 3, 5, 7 и 15 сутки наблюдения. * – $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля; ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля; # – $p < 0,05$ по сравнению с показателем на 0 сутки (критерий χ^2).

Во второй серии исследований клиническая выборка состояла из 95 пациентов. Средние показатели поврежденности ДНК и атипичных ДНК-комет для всей группы пострадавших на всех сроках наблюдения оказались статистически значимо выше по сравнению с показателем для здоровых доноров (рисунок 25). «Некротические» ДНК-кометы наблюдались на всех сроках исследования. Выявлены значимые различия между группами пациентов с ЧМТ, ТСТ и ЧМТ+ТСТ по различным показателям.

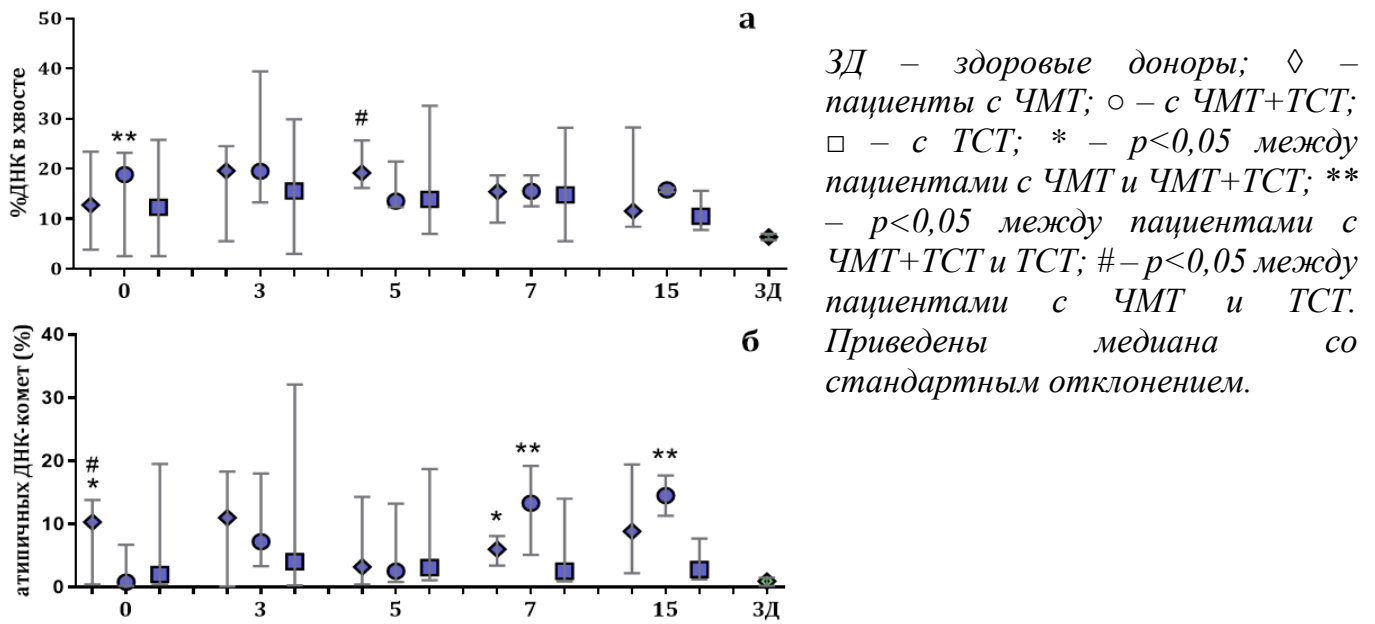


Рисунок 25 – Поврежденность ДНК (а) и уровень атипичных ДНК-комет (б) у пациентов на различных сроках наблюдения

В соавторстве с Муравьевой М.Ю. и Мягковой Е.А. у пациентов с тяжелой травмой были проведены расширенные исследования, включавшие в том числе комбинированную оценку динамики поврежденности ДНК. Полученные результаты изложены в диссертационных исследованиях соавторов.

Оценка эндогенной генотоксичности при невынашивании беременности.

Результаты исследований показали, что при физиологически протекающей беременности уровень поврежденности ДНК в клетках крови не превышает аналогичный показатель для здоровых небеременных доноров (рисунок 26).

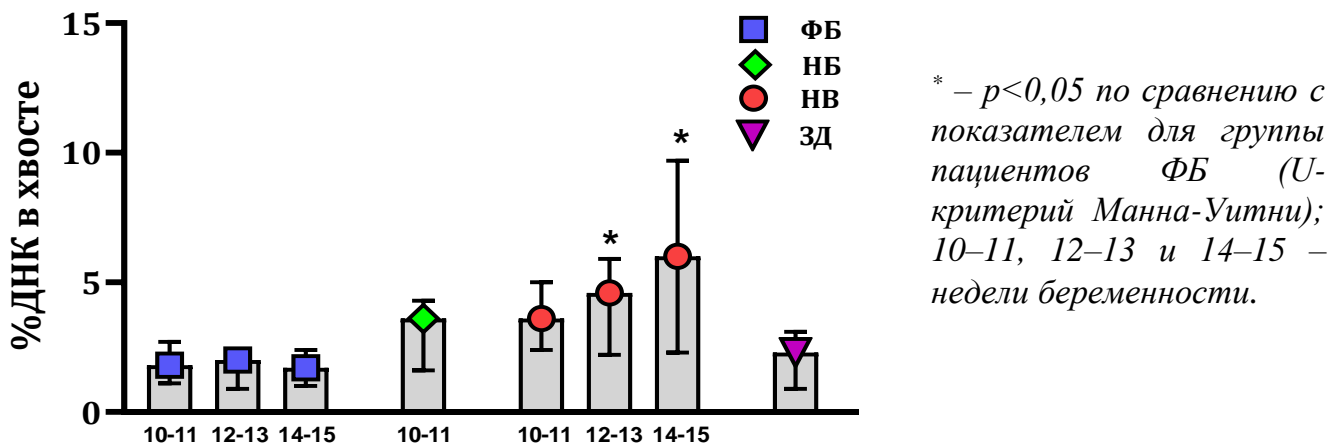


Рисунок 26 – Поврежденность клеток крови у лиц с физиологически протекающей беременностью (ФБ), пациентов с неразвивающейся беременностью (НБ), пациентов с начавшимся выкидышем (НВ) и здоровых небеременных доноров (ЗД)

У пациентов с начавшимся выкидышем на всех сроках наблюдения и у пациентов с неразвивающейся беременностью наблюдалось увеличение поврежденности ДНК, однако полученные показатели не отличались статистически значимо от показателя для здоровых доноров ввиду высокой вариабельности значений внутри групп пациентов. В то же время у пациентов с начавшимся выкидышем уровень повреждений ДНК оказался статистически значимо выше по сравнению с показателем для лиц с физиологически протекающей беременностью.

Устойчивость клеток к ДНК-повреждающему и цитотоксическому действию H_2O_2 может рассматриваться как показатель эффективности системы антиоксидантной защиты клеток. Полученные для лиц с физиологически протекающей беременностью значения H_2O_2 -индуцированных повреждений ДНК в клетках крови на всех сроках наблюдения не отличались от такового для здоровых доноров (рисунок 27).

У пациентов с неразвивающейся беременностью этот показатель оказался статистически значимо выше по сравнению как со здоровыми донорами, так и с лицами с физиологически протекающей беременностью. У группы пациентов с начавшимся на 12–13 неделе беременности выкидышем также наблюдалась повышенная чувствительность к повреждающему ДНК действию перекиси водорода. Для пациентов других групп, несмотря на тенденцию, статистически значимых различий не выявлено.

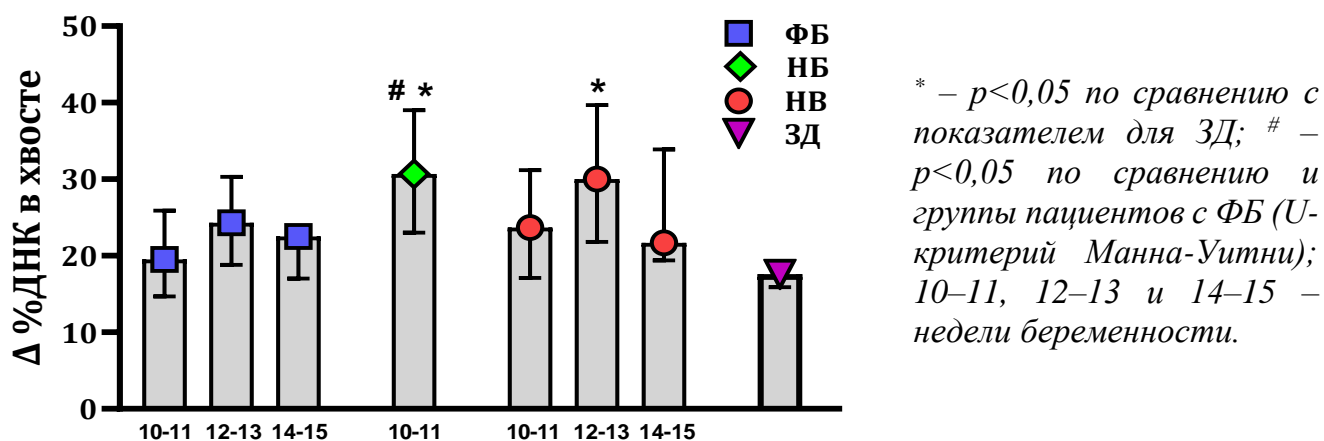


Рисунок 27 – *ex vivo* H_2O_2 -индуцируемая поврежденность ДНК клеток крови у лиц с физиологически протекающей беременностью (ФБ), пациентов с неразвивающейся беременностью (НБ), пациентов с начавшимся выкидышем (НВ) и здоровых небеременных доноров (ЗД)

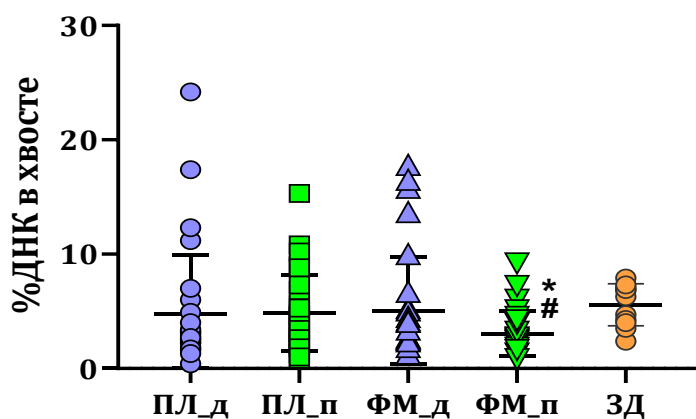
В соавторстве с Гончаровой В.С. проведен расширенный анализ показателей генотоксичности у пациентов с невынашиванием беременности, включающий оценку содержания 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина в ДНК клеток крови и в плазме крови, уровней внеклеточной ДНК, белков p53 и сyt C. Полученные результаты изложены в диссертационном исследовании соавтора.

Исследование эндогенной генотоксичности у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) и возможности ее антигенотоксической коррекции

Оценка экспрессии гена репарации *hOGG1* в клетках крови пациентов с СКВ.

У 9 из 18 исследованных пациентов выявлены нарушения экспрессии гена *hOGG1*. У 2 пациентов исследуемая мРНК не выявлялась, у 3 пациентов при 35 циклах амплификации получен слабый сигнал, достаточный для проведения DGGE-анализа. У четырех пациентов снижение экспрессии выявлено для экзонов 4–7, у 2 пациентов наблюдалось снижение относительного уровня мРНК для экзонов 4–7 при нормальном уровне мРНК для экзонов 1–4. Аналогичные нарушения были выявлены и для пациентов 13 и 15, однако в этих случаях амплификационный сигнал для экзонов 4–7 практически отсутствовал и выявлялся лишь при 35 циклах амплификации. DGGE-анализ ни у одного из пациентов не выявил изменений в первичной последовательности экзонов 1–4 и 4–7 мРНК гена *hOGG1*.

Эндогенная генотоксичность у пациентов с СКВ и ее антигенотоксическая коррекция. У пациентов с СКВ до назначения терапии средние показатели поврежденности ДНК составили $4,8 \pm 5,1$ и $5,1 \pm 4,7\%$ ДНК в хвосте соответственно пациентов, принимавших плацебо и фабомотизол. Между группами пациентов и здоровыми донорами статистически значимых различий не выявлено. По окончании терапии показатель поврежденности ДНК в группе пациентов с СКВ, принимавших плацебо, составил $4,9 \pm 3,3\%$ ДНК в хвосте (рисунок 28), что не отличалось от показателя до начала терапии ($4,8 \pm 5,1\%$ ДНК в хвосте). В группе пациентов с СКВ, принимавших фабомотизол, после терапии поврежденность ДНК статистически значимо снизилась до $3,1 \pm 2,0\%$ ДНК в хвосте, что оказалось также статистически значимо ниже показателя для пациентов, принимавших плацебо. В группе пациентов с назначением фабомотизола у 18 из 30 наблюдалось снижение повреждений ДНК, в том числе у пациентов, имеющих изначально высокий показатель, тогда как у 4 наблюдалось повышение. У 9 пациентов, принимавших плацебо, наблюдалось снижение, тогда как у 11 – увеличение поврежденности ДНК.



* – $p < 0,001$ по сравнению с показателем до терапии (критерий Уилкоксона); # – $p < 0,001$ по сравнению с показателем для группы пациентов после приема плацебо (U-критерий Манна-Уитни). ПЛ – группа пациентов, принимавших плацебо; ФМ – группа пациентов, принимавших фабомотизол.

Рисунок 28 – Поврежденность ДНК клеток крови пациентов с СКВ до терапии (ПЛ_д и ФМ_д), после терапии (ПЛ_п и ФМ_п) и здоровых доноров (ЗД).

У пациентов с СКВ на плацебо и с назначением фабомотизола до начала терапии средние показатели содержания 8-oxodG в ДНК клетках крови составили $3,2 \pm 1,2$ (от 1,1 до 5,3) и $3,2 \pm 1,3$ (от 1,2 до 6,3) о.е. против $1,6 \pm 0,4$ о.е. у здоровых доноров. В обеих группах пациентов показатели содержания 8-oxodG после терапии не отличались от таковых до начала терапии и оставались выше значения для здоровых доноров.

Анализ устойчивости клеток к ДНК-повреждающему и цитотоксическому действию перекиси водорода у пациентов с СКВ. У пациентов с СКВ до начала терапии обработка клеток крови H_2O_2 приводила к увеличению поврежденности ДНК до $10,1 \pm 7,2$ и до $12,9 \pm 5,7$ $\Delta\%$ ДНК в хвосте соответственно для пациентов с назначением плацебо и фабомотизола (рисунок 29, А). Между группами статистически значимых различий не выявлено. В обоих случаях показатели оказались статистически значимо выше показателя для здоровых доноров – $2,7 \pm 1,0$. По окончании терапии показатель в группе пациентов, принимавших плацебо, не отличался от такового до начала терапии ($9,9 \pm 6,8\%$ ДНК в хвосте), тогда как в группе с назначением фабомотизола статистически значимо снизился ($6,5 \pm 4,7$ $\Delta\%$ ДНК в хвосте). В группе пациентов на плацебо у 9 из 21 наблюдалось снижение устойчивости к повреждающему действию перекиси водорода, у 7 пациентов – увеличение. В группе с назначением фабомотизола снижение индуцируемых H_2O_2 повреждений ДНК наблюдалось у 9 из 11 пациентов, лишь у одного снижение устойчивости к действию перекиси водорода.

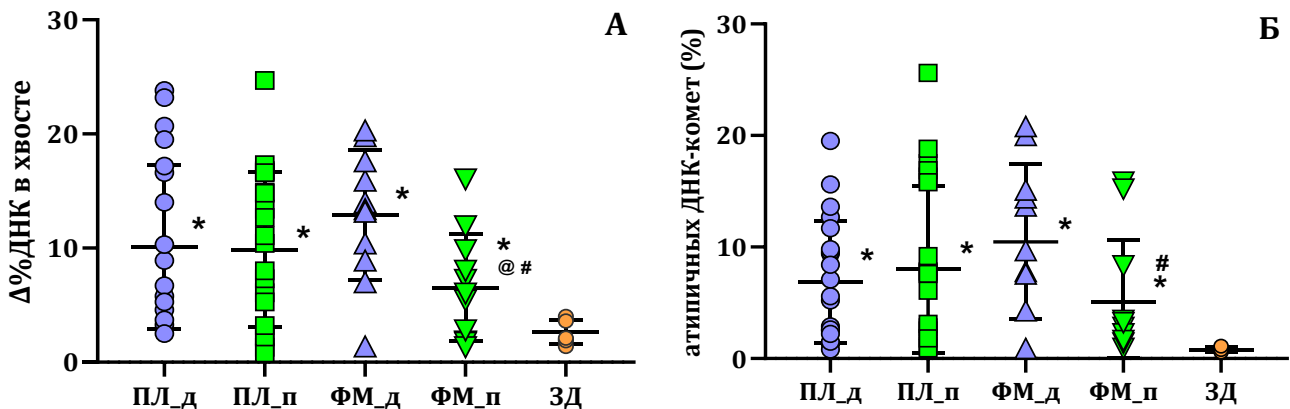


Рисунок 29 – Индуцируемые H_2O_2 *ex vivo* повреждения ДНК (А) и атипичные ДНК-кометы в клетках крови пациентов с СКВ (Б) до терапии (ПЛ_д и ФМ_д), после терапии (ПЛ_п и ФМ_п) и здоровых доноров (ЗД). * – $p < 0,001$ по сравнению с группой здоровых доноров (U-критерий Манна-Уитни); # – $p < 0,001$ по сравнению с показателем до терапии (критерий Уилкоксона); @ – $p = 0,01$ по сравнению с показателем для группы пациентов после приема плацебо (U-критерий Манна-Уитни). ПЛ – группа пациентов, принимавших плацебо; ФМ – группа пациентов, принимавших фабомотизол.

Уровень индуцируемых H_2O_2 атипичных ДНК-комет составил в среднем $6,9 \pm 5,5$ и $10,5 \pm 6,9\%$, соответственно для пациентов с назначением плацебо и фабомотизола (рисунок 29, Б). Между группами пациентов до назначения терапии статистически

значимых различий не выявлено. В обоих случаях показатели оказались статистически значимо выше показателя для здоровых доноров – $0,8 \pm 0,2\%$.

По окончании терапии средний показатель уровня атипичных ДНК-комет в группе пациентов на плацебо составил $8,0 \pm 7,6\%$, что не отличалось от аналогичного показателя до начала терапии. В группе пациентов с назначением фабомотизола после проведения терапии уровень индуцируемых H_2O_2 атипичных ДНК-комет статистически значимо снизился до $5,1 \pm 5,5\%$. В группе пациентов на плацебо у 10 из 21 наблюдалось снижение устойчивости к цитотоксическому действию H_2O_2 , у 7 пациентов – увеличение. В группе пациентов с назначением фабомотизола увеличение устойчивости к действию перекиси водорода наблюдалось у 7 из 11 пациентов, тогда как снижение лишь у одного.

Заключение

Проведенные исследования позволили сделать следующие обобщения.

Для снижения меж- и внутрилабораторной вариабельности данных, получаемых методом ДНК-комет, необходимо строго унифицировать температурные условия проведения этапов щелочной денатурации/электрофореза и параметры напряженности электрического поля в ходе электрофореза.

Применение метода ДНК-комет для оценки генотоксичности в ооцитах и сперматозоидах имеет методические ограничения. Для оценки индуцируемой в половых клетках генотоксичности наиболее целесообразным представляется подход, предусматривающий регистрацию повреждений ДНК в одно- и двухклеточных эмбрионах, полученных от экспонированных животных.

Выявление генотоксических эффектов у морфина указывает на необходимость развернутого исследования морфина и других опиатов на генотоксическую активность. Имеющиеся в литературе сведения о генотоксичности парацетамола не подтверждены в настоящем исследовании.

Полученные данные свидетельствуют в пользу стратегии, предусматривающей оценку генотоксичности лекарственных средств на основе наноматериалов в тестах на млекопитающих *in vivo* в нескольких тканях при различных сроках и режимах экспозиции. Для этих целей предпочтительно использование высокочувствительного метода ДНК-комет. Целесообразно исследование генотоксических свойств наноматериалов в экспериментах *in vitro* на цельной периферической крови.

Выявление эндогенной генотоксичности при стрептозоцин-индуцированном диабете и перинатальной иммунной активации обосновывают необходимость углубленных исследований в этой области и формируют экспериментальную базу для поиска средств фармакологической и/или нутрициологической коррекции генотоксических эффектов при указанных патологиях и патологических состояниях.

Впервые с применением метода ДНК-комет экспериментально продемонстрирован принцип таргетной антигенотоксической защиты. Полученные данные определяют перспективность разработки бетанина и апигенина в качестве лекарственных средств сопроводительной терапии для направленной протекции нецелевых органов/тканей при противоопухолевой терапии.

Проведенные исследования у пациентов с тяжелой сочетанной травмой, невынашиванием беременности и системной красной волчанкой продемонстрировали применимость метода ДНК-комет для оценки и мониторинга эндогенно-индуцированной генотоксичности в клинических исследованиях. Наряду с регистрацией поврежденности ДНК целесообразной определена оценка устойчивости клеток к *ex vivo* прооксидантному цито- и генотоксическому воздействию, что может служить косвенным индикатором состояния системы антиоксидантной защиты. Проведенное у пациентов с системной красной волчанкой исследование является первым примером успешной лекарственной антигенотоксической коррекции эндогенно-индуцированной генотоксичности в клинике у человека.

Совокупность результатов проведенных исследований позволяет рассматривать повреждение ДНК как универсальный трансляционный биомаркер генотоксичности в экспериментальных, доклинических и клинических исследованиях лекарственных средств. Это создает концептуальную основу для разработки методологической платформы, интегрирующей поврежденность ДНК с другими генотоксическими конечными точками в единую систему с обратной связью для комплексной сквозной оценки генотоксического и антигенотоксического потенциала лекарственных средств на всех этапах их разработки (рисунок 30).

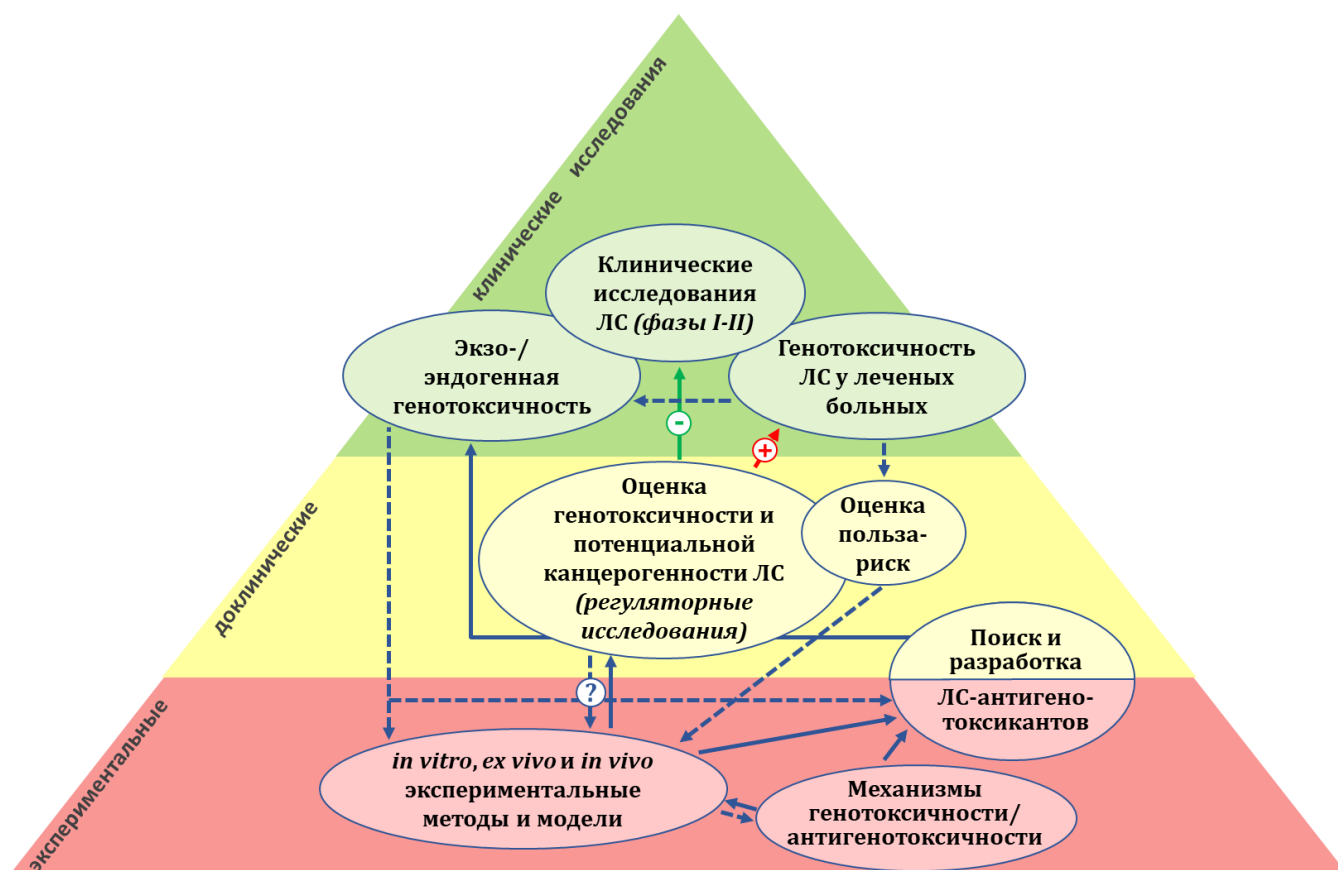


Рисунок 30 – Концепция методологической платформы для сквозной комплексной оценки генотоксического и антигенотоксического потенциала лекарственных средств (ЛС). Отрицательные (-), положительные (+) и неоднозначные (?) результаты тестов на генотоксическую активность.

Выводы

1. Основной вклад в вариабельность данных, получаемых методом ДНК-комет, вносят различия в температурных условиях проведения этапов щелочной денатурации/электрофореза и напряженности электрического поля в ходе электрофореза. Унификация указанных параметров обеспечивает меж- и внутрिलाбораторную сходимости и воспроизводимости результатов.

2. Предложены методические приемы регистрации повреждений ДНК методом ДНК-комет в ооцитах, сперматозоидах и одно- и двухклеточных эмбрионах мышей. Показано, что индуцируемые в ооцитах мышей повреждения ДНК выявляются у предимплантационных эмбрионов, полученных от экспонированных животных.

3. Морфин (50 мг/кг) индуцирует повреждения ДНК при однократном введении в клетках печени и при многократном введении в клетках коры головного мозга мышей. Парацетамол (30, 60 и 300 мг/кг) не индуцирует повреждения ДНК в органах/тканях мышей. На основе опыта применения метода ДНК-комет, в том числе для экспертной доклинической оценки безопасности 34 средств-кандидатов, разработана серия методических рекомендаций и методические указания по оценке генотоксичности *in vitro* и *in vivo* методом ДНК-комет в щелочной версии.

4. Нанокристаллы кремния (5, 25 и 50 мг/кг) при однократном и многократном введении индуцируют повреждения ДНК в клетках костного и головного мозга мышей. Катионные липосомальные наночастицы при однократном и многократном введении индуцируют повреждения ДНК в клетках легких (40 мг/кг), печени (20 и 40 мг/кг) и почек (8, 20 и 40 мг/кг), но не в клетках селезенки мышей. Повреждающие ДНК эффекты в почках регистрируются вплоть до 14 суток после однократного введения. В исследованных дозах и режимах наночастицы не индуцируют хромосомные аберрации в клетках костного мозга.

5. Индуцированный стрептозоцином сахарный диабет у мышей сопровождается увеличением поврежденности ядерной и митохондриальной ДНК в клетках печени и почек. Потребление мышами комбинации аспартама (35 мг/л) и бетаина (175 мг/л) приводит к снижению поврежденности ДНК в клетках печени и почек. Индуцируемая липополисахаридом (0,2 мг/кг) перинатальная иммунная активация у крыс сопровождается увеличением поврежденности ДНК в клетках плаценты и эмбрионов, наиболее выраженным в клетках головы эмбрионов. Не выявлено увеличения поврежденности ДНК в клетках миокарда у крыс с экспериментальной алкогольной кардиомиопатией.

6. Бетанин (1, 10 и 100 мг/кг) проявляет антигенотоксическую активность, регистрируемую учетом хромосомных аберраций в клетках костного мозга и повреждений ДНК в клетках костного мозга, печени и почек мышей. Бетанин (25, 50 и 100 мг/кг) проявляет антигенотоксическую активность в клетках желудочно-кишечного тракта и печени мышей, но не в клетках крови и костного мозга. Апигенин (5, 25 и 50 мг/кг), нарингенин и гесперетин (25, 50 и 100 мг/кг) тканеспецифично снижают индуцируемые темозоломидом повреждения ДНК. Для апигенина и нарингенина установлена способность снижать цитогенетические эффекты генотоксикантов с различными механизмами повреждающего действия.

7. Апробация метода ДНК-комет у пациентов с тяжелой сочетанной травмой и с невынашиванием беременности демонстрирует его высокую эффективность для

оценки и мониторинга эндогенно-индуцированной генотоксичности в клинических исследованиях.

8. Применение у пациентов с системной красной волчанкой фабомотизола в дозе 30–60 мг/сутки в течение 1 месяца в дополнение к стандартной терапии способствует снижению поврежденности ДНК в клетках крови и увеличению устойчивости клеток к *ex vivo* прооксидантному цито- и генотоксическому воздействию.

9. Совокупность результатов проведенных исследований позволяет рассматривать повреждение ДНК как универсальный трансляционный биомаркер генотоксичности в экспериментальных, доклинических и клинических исследованиях лекарственных средств.

Практические рекомендации

На основе опыта практического применения метода ДНК-комет разработаны и утверждены 6 методических рекомендаций и 1 методические указания по оценке генотоксичности методом ДНК-комет в экспериментальных, доклинических и клинических исследованиях.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в рецензируемых изданиях

1. **Жанатаев А.К.**, Лисицына Т.А., Дурнев А.Д. Нарушение экспрессии гена *hOGG1* у больных системной красной волчанкой // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 142, №8. – С. 196–199.
2. **Жанатаев А.К.**, Дурнев А.Д., Оганесянц Л.А. Метод гель-электрофореза изолированных клеток (метод «ДНК-комет») в пищевой генотоксикологии // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2007. – № 1. – С. 31–33.
3. Мороз В.В., Решетняк В.И., Муравьева М.Ю., **Жанатаев А.К.**, Марченков Ю.В., Дурнев А.Д. Обмен холестерина, ДНК-повреждения, апоптоз и некроз клеток в крови при тяжелой сочетанной травме // Общая реаниматология. – 2008. – № 1. – С. 5–11.
4. **Жанатаев А.К.**, Лисицына Т.А., Дурнев А.Д., Насонов Е.Л., Середенин С.Б. Влияние афобазола на ДНК-повреждения у больных системной красной волчанкой // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – № 10. – С. 404–407.
5. **Zhanataev A.K.**, Moroz V.V., Durnev A.D., Muravyeva M.Yu., Reshetnyak V.I. DNA damage and cell death assessment in patients with severe multiple trauma using comet assay: pilot study // *Medicina Danas*. – 2009. – v. 8, № 10–12. – P. 361–368.
6. Durnev A.D., **Zhanataev A.K.**, Voronina E.S., Oganesyantz L.A., Seredenin S.B. Modification of Chemical Mutagenesis // In: «Genotoxicity: Evaluation, Testing and Prediction – New York – Nova Biomedical – 2009. – P. 157–187.
7. **Zhanataev A.K.**, Moroz V.V., Durnev A.D., Muravyeva M.Yu., Reshetnyak V.I. DNA damage and cell death assessment in patients with severe multiple trauma using comet assay // *Health*. – 2010. – vol.2, №5. – P. 412–417.
8. Durnev A.D., Solomina A.S., Shreder E.D., Nemova E.P., Shreder O.V., Daugel'-Dauge N.O., **Zhanataev A.K.**, Veligura V.A., Osminkina L.A., Gongalsky M.B.,

Timoshenko V.Yu., Seredenin S.B. *In vivo* study of genotoxicity and teratogenicity of silica nanocrystals // *Int. J. Biomedical Nanoscience and Nanotechnology*. – 2010. – Vol. 1, No. 1. – P. 70–86.

9. Дурнев А.Д., Соломина А.С., Даугель-Дауге Н.О., **Жанатаев А.К.**, Шредер Е.Д., Немова Е.П., Шредер О.В., Велигура В.А., Осминкина Л.А., Тимошенко В.Ю., Середенин С.Б. Исследование генотоксичности и репродуктивной токсичности нанокристаллов кремния // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2010. – Т. 149 – № 4. – С. 429–433.

10. **Жанатаев А.К.**, Никитина В.А., Воронина Е.С., Дурнев А.Д. Методические аспекты оценки ДНК-повреждений методом ДНК-комет // *Прикладная токсикология*. – 2011. – № 2(4). – С. 28–37.

11. **Жанатаев А.К.**, Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Метод ДНК-комет в генотоксикологических исследованиях // *Гигиена и санитария*. – 2011. – № 5. – С. 86–90.

12. Дурнев А.Д., **Жанатаев А.К.**, Шредер О.В., Середенин В.С. Генотоксические поражения и болезни // *Молекулярная медицина*. – 2013. – № 3. – С. 3–19.

13. Мороз В.В., Мягкова Е.А., **Жанатаев А.К.**, Рябов Г.А., Остапченко Д.А., Дурнев А.Д., Решетняк В.И. Повреждения ДНК и процессы клеточной гибели лейкоцитов у пострадавших с тяжелой травмой // *Общая реаниматология*. – 2014. – т.10, № 4. – С. 11–36.

14. Sirota N.P., **Zhanataev A.K.**, Kuznetsova E.A., Kyizhyak E.P., Anisina E.A., Durnev A.D. Some causes of inter-laboratory variation in the results of comet assay // *Mutation Research*. – 2014. – v. 770. – P. 16–22.

15. Гончарова В.С., **Жанатаев А.К.**, Чайка З.В., Дурнев А.Д., Богдан Н.Г., Луценко Н.Н., Морозова К.В., Лунина С.Н., Доброхотова Ю.Э., Макаров О.В. Анализ показателей генотоксичности при невынашивании беременности // *Врач* – 2016. – № 3. – С. 21–24.

16. **Жанатаев А.К.**, Анисина Е.А., Чайка З.В., Мирошкина И.А., Дурнев А.Д. Феномен атипичных ДНК-комет // *Цитология*. – 2017. – т. 59, № 3. – С. 163–168.

17. **Zhanataev A.K.**, Eremina N.V., Chayka Z.V., Kazey V.I., Andrianova E.L., Purnal A.A., Rydkina E.B., Durnev A.D. Genotoxicity of two new carbazole derivatives with antifungal activity // *Mutation Research*. – 2017. – v.816–817. – P. 24–31.

18. Даугель-Дауге Н.О., **Жанатаев А.К.**, Дурнев А.Д. Оценка генотоксичности парацетамола и его комбинации с верапамилом *in vivo* // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2017. – т. 80, № 4. – С. 23–27.

19. Moroz V.V., Kuzovlev A.N., Voeva E.A., **Zhanataev A.K.**, Durnev A.D., Reshetnyak V.I. Personalized approach to early prediction of infectious complications in patients with severe trauma // *Intensive Care Medicine Experimental*. – 2018. – 6 (Suppl 1). – P. 32.

20. **Жанатаев А.К.**, Мирошкина И.А., Цорин И.Б., Чайка З.В., Крыжановский С.А., Дурнев А.Д. Поврежденность ДНК в клетках миокарда крыс с экспериментальной алкогольной кардиомиопатией: модифицирующие эффекты фабомотизола и триметазида // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018. – № 2. – С. 28–34.

21. **Zhanataev A.K.**, Anisina E.A., Kulakova A.V., Shilovskiy I.P., Lisitsyn A.A., Koloskova O.O., Khaitov M.R., Durnev A.D. Genotoxicity of cationic lipopeptide nanoparticles // *Toxicology Letters*. – 2020. – 328. – P. 1–6.
22. Pligina K.L., **Zhanataev A.K.**, Anisina E.A., Daugel-Dauge N.O., Durnev A.D. Comet assay on one- and two-cell mouse embryos // *Toxicology Letters*. – 2020. – v. 331. – P. 124–129.
23. Gajski G., Langie S., **Zhanataev A.** Recent applications of the comet assay: a report from the international comet assay workshop 2019 // *Toxicology Letters*. – 2020. – T. 333. – P. 1–3.
24. **Жанатаев А.К.**, Анисина Е.А., Плигина К.Л., Лисицын А.А., Дурнев А.Д. Технические аспекты проведения этапа электрофореза в методе ДНК-комет // *Экологическая генетика*. – 2020. – т. 18, № 2. – С. 203–214.
25. **Жанатаев А.К.**, Дурнев А.Д. Генотоксикология лекарственных средств: современное состояние и перспективы // *Медицинская генетика*. – 2020. – т. 19, №9. – С. 60–62.
26. Анисина Е.А., **Жанатаев А.К.**, Лисицын А.А., Шиловский И.Р., Колоскова О.О., Хаитов М.Р., Дурнев А.Д. Генотоксичность катионных липопептидных наночастиц // *Медицинская генетика*. – 2020. – т.19, №9. – С. 65–66.
27. Плигина К.Л., **Жанатаев А.К.**, Анисина Е.А., Даугель-Дауге Н.О., Дурнев А.Д. Оценка генотоксических эффектов в одно- и двухклеточных зародышах мышей *in vivo* и *in vitro* методом ДНК-комет // *Медицинская генетика*. – 2020. – т.19, №9. – С. 77–78.
28. Даугель-Дауге Н.О., **Жанатаев А.К.**, Колик Л.Г. Генотоксичность опиатов: исследование морфина на мышах // *Вопросы наркологии*. – 2021. – №6. – С. 67–76.
29. Еремина Н.В., **Жанатаев А.К.**, Дурнев А.Д. Индуцируемая клеточная гибель как возможный путь антимуtagenного воздействия // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2021. – т. 171, № 1. – С. 4–22.
30. Еремина Н.В., **Жанатаев А.К.**, Лисицын А.А., Дурнев А.Д. Генотоксические маркеры у больных сахарным диабетом (обзор литературы) // *Экологическая генетика*. – 2021. – том 19, № 2. – С. 143–168.
31. Еремина Н.В., **Жанатаев А.К.**, Лисицын А.А., Дурнев А.Д. Генотоксические свойства гипогликемических лекарств (систематический обзор) // *Экологическая генетика*. – 2021. – том 19, № 3. – С. 219–240.
32. Дурнев А.Д., **Жанатаев А.К.** Актуальные аспекты генетической токсикологии лекарственных средств // *Ведомости Научного Центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. – 2022. – т. 12, № 1. – С. 90–109.
33. Лисицын А.А., **Жанатаев А.К.**, Чайка З.В., Севостьянова Е.М., Артамонова М.П., Чернуха И.М., Оганесянц Л.А., Дурнев А.Д. Антигенотоксическая активность комбинации «аспартам-бетаин» и метформина у мышей с экспериментальным стрептозотоциновым диабетом // *Молекулярная медицина*. – 2022. – т. 20, № 5. – С. 59–64.
34. **Жанатаев А.К.**, Анисина Е.А., Кулакова А.В., Лисицын А.А., Плигина К.Л., Чайка З.В., Дурнев А.Д. Полиорганная оценка повреждений ядерной и митохондриальной ДНК в моделях стрептозотоцинового диабета у мышей BALB/c //

- Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – т. 174, № 9. – С. 337–342.
35. Дурнев А.Д., Еремина Н.В., **Жанатаев А.К.**, Колик Л.Г. Генотоксичность психотропных лекарств в экспериментальных и клинических исследованиях // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2022. – т.122, №10. – С. 7–16.
36. Еремина Н.В., **Жанатаев А.К.**, Дурнев А.Д. Генотоксические эффекты противэпилептических лекарственных препаратов. Обзор литературы // Экологическая генетика. – 2022. – т. 20, № 4. – С. 295–313.
37. Сорокина А.В., **Жанатаев А.К.**, Чайка З.В., Мирошкина И.А., Лисицын А.А., Дурнев А.Д. Проявление патогномичных признаков при моделировании сахарного диабета стрептозотоцином у мышей BALB/c // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2022. – № 4. – С. 43–49.
38. **Zhanataev A.K.**, Lisitsyn A.A., Anisina E.A., Kulakova A.V., Malikova A.D., Pligina K.L., Chaika Z.V., Chernukha I.M. Red Beetroot Extract is Safe to DNA and Protects Against Mutagens in Mice: A Potential Chemopreventive Agent // Iranian Journal of Toxicology. – 2024. – vol. 18, №3. – P. 138–143.
39. **Жанатаев А.К.**, Дурнев А.Д. Актуальные задачи генотоксикологического тестирования // Медицинская генетика. – 2025. – Т.24, №7. – P. 37–39.
40. **Жанатаев А.К.**, Анисина Е.А., Кулакова А.В., Дурнев А.Д. Антигенотоксическая активность апигенина, нарингенина и гесперетина *in vivo*: тканеспецифичность эффектов // Экологическая генетика. – 2025. – том 23, № 4. – С. 351–360.
41. **Жанатаев А.К.**, Анисина Е.А., Плигина К.Л., Соломина А.С., Дурнев А.Д. Поврежденность ДНК клеток плаценты и эмбрионов крыс с перинатальной иммунной активацией // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2026. – т. 181, № 1. – С. 103–108.

Методические рекомендации и указания

1. Дурнев А.Д., **Жанатаев А.К.**, Анисина Е.А., Сиднева Е.С., Никитина В.А., Оганесянц Л.А., Середенин С.Б., Бекиш В.Я., Чернуха И.М. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений. Методические рекомендации. – Москва: Издание официальное, 2006. – 28 с.
2. Дурнев А.Д., **Жанатаев А.К.**, Сирота Н.П., Тихонов В.П., Шевченко Т.В., Родина И.А., Плигина К.Л. Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*. Методические рекомендации. – Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 15 с.
3. Дурнев А.Д., Меркулов В.А., **Жанатаев А.К.**, Никитина В.А., Воронина Е.С., Середенин С.Б. Методические рекомендации по оценке ДНК-повреждений методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток в фармакологических исследованиях / Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая под ред. А.Н. Миронова // М.: Гриф и К. – 2012 – С. 115–128.

4. Дурнев А.Д., Гуськова Т.А., Ревазова Ю.А., Меркулов В.А., Верстакова О.Л., Журков В.С., Сычева Л.П., **Жанатаев А.К.**, Юрченко В.В. Методические рекомендации, по оценке мутагенных свойств лекарственных средств / Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая под ред. А.Н. Миронова // М.: Гриф и К. – 2012 – С. 94–114.
5. Белицкий Г.А., Дурнев А.Д., Ревазова Ю.А., Абилов С.К., Арзамасцев Е.В., Верстакова О.Л., Гуськова Т.А., Журков В.С., Сычева Л.П., **Жанатаев А.К.** Методические рекомендации по оценке канцерогенности лекарственных средств и вспомогательных веществ в краткосрочных тестах / Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая под ред. А.Н. Миронова // М.: Гриф и К. – 2012 – С. 129–163.
6. Оценка мутагенной активности пестицидов: Методические указания. –М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016. – 49 с.
7. Анисина Е.А., **Жанатаев А.К.**, Лисицын А.А., Маликова А.Д., Плигина К.Л., Чайка З.В., Дурнев А.Д., Дорофеев В.Л. Оценка генотоксичности *in vitro* и *in vivo* методом ДНК комет / Руководство по экспертизе лекарственных средств в 3-х томах. Том 3. Экспертиза и безопасность лекарственных средств // М.: «Типография Миттель Пресс», 2025, стр. 274–301.

Монографии

1. Дурнев А.Д., **Жанатаев А.К.**, Еремина Н.В. Генетическая токсикология. – Москва: ООО Типография Миттель Пресс, 2022. – 286 с.

Патенты

1. Патент № 2599845 Российская Федерация, МПК G01N 33/48 (2006.01), G01N 27/447 (2006.01). Способ прогнозирования инфекционных осложнений у пострадавших с тяжелой травмой, кровопотерей и гипоксией: № 2014141909/15: заявл. 17.10.2014; опубл. 20.10.2016 / Мороз В.В., Дурнев А.Д., Решетняк В.И., **Жанатаев А.К.**, Мягкова Е.А., Остапченко Д.А. – 8 с.

Список сокращений и условных обозначений: E – напряженность электрического поля; ДТТ – дитиотреитол; нк-Si – нанокристаллы кремния; кЛН – катионные липосомальные наночастицы; мтДНК – митохондриальная ДНК; АКМП – алкогольная кардиомиопатия; ЛПС – липополисахарид; ТСТ – тяжелая сочетанная травма; ЧМТ – черепно-мозговая травма; СКВ – системная красная волчанка.