

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ОРИГИНАЛЬНЫХ И ПЕРСПЕКТИВНЫХ
БИОМЕДИЦИНСКИХ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ»

На правах рукописи



Жанатаев Алий Курманович

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

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научный консультант
доктор медицинских наук, профессор, академик РАН
Дурнев Андрей Дмитриевич

Москва – 2026

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
1.1 Повреждения ДНК – основа возникновения мутаций.....	18
1.2 Медицинские последствия индуцированного мутагенеза	32
1.3 Генотоксичность: механизмы и фундаментальная значимость.....	42
1.4 Источники генотоксических воздействий	58
1.5 Оценка генотоксичности как элемент исследования безопасности лекарственных средств и других химических веществ	68
1.6 Методические подходы к регистрации повреждений ДНК	82
1.7 Антимутагенная защита организма: экспериментальные данные и опыт практического применения	91
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	99
2.1 Экспериментальные животные	99
2.2 Исследуемые вещества.....	99
2.3 Реактивы	100
2.4 Метод ДНК-комет.....	101
2.4.1 Общая процедура проведения метода ДНК-комет	101
2.4.2 Инструментальный анализ технических параметров электрофореза	103
2.4.3 Селективная детекция поврежденных оснований ДНК методом ДНК- комет.....	103
2.5 Получение гель-слайдов ДНК-комет ооцитов и одно- и двухклеточных эмбрионов мышей	104
2.6 Метод ДНК-комет в сперматозоидах мышей.....	107
2.7 Оценка поврежденности митохондриальной ДНК	108
2.8 Метод цитогенетического анализа в клетках костного мозга мышей <i>in vivo</i>	109
2.9 Модели стрептозоцин-индуцированного диабета	110
2.10 Модель алкогольной кардиомиопатии	110

2.11	Модель перинатальной иммунной активации	112
2.12	Клинические исследования	113
2.12.1	Исследования у пациентов с тяжелой травмой.....	113
2.12.2	Исследования у пациентов с неразвивающейся беременностью	114
2.12.3	Клинические исследования у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ)	115
2.13	Статистическая обработка данных	118
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ		119
3.1	Выявление причин меж- и внутрилабораторной вариабельности данных в исследованиях с применением метода ДНК-комет.....	119
3.2	Разработка методических приемов регистрации повреждений ДНК методом ДНК-комет в половых и эмбриональных клетках	143
3.3	Оценка генотоксичности лекарственных средств-кандидатов и отдельных лекарственных средств методом ДНК-комет.....	158
3.4	Оценка генотоксичности нанокристаллов кремния и катионных липосомальных наночастиц	169
3.5	Оценка эндогенно-индуцированной генотоксичности.....	178
3.5.1	Поврежденность ДНК на моделях стрептозоцин-индуцированного диабета и ее антигенотоксическая коррекция.....	179
3.5.2	Эндогенная генотоксичность на модели алкогольной кардиомиопатии	190
3.5.3	Эндогенная генотоксичность на модели перинатальной иммунной активации	192
3.6	Исследование органо- и тканеспецифичности антигенотоксических эффектов ряда соединений природного происхождения.....	200
3.6.1	Изучение антигенотоксичности бетаина	201
3.6.2	Изучение антигенотоксичности бетанина	204
3.6.3	Изучение антигенотоксичности апигенина, нарингенина и гесперетина.....	211

3.7	Оценка эндогенной генотоксичности у пациентов с тяжелой сочетанной травмой и при невынашивании беременности	222
3.7.1	Оценка эндогенной генотоксичности у пациентов с тяжелой сочетанной травмой.....	222
3.7.2	Оценка эндогенной генотоксичности при невынашивании беременности	229
3.8	Исследование эндогенной генотоксичности у пациентов с системной красной волчанкой и возможности ее антигенотоксической коррекции.....	233
3.8.1	Оценка экспрессии гена репарации <i>hOGG1</i> в клетках крови пациентов с СКВ	234
3.8.2	Эндогенная генотоксичность у пациентов с СКВ и ее антигенотоксическая коррекция.....	237
3.8.3	Анализ устойчивости клеток к повреждающему ДНК и цитотоксическому действию перекиси водорода у пациентов с СКВ	240
ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ		249
ВЫВОДЫ		257
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....		257
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....		261
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		268

ВВЕДЕНИЕ

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 [1–3]. 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 [4, 5]. 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, приводящих к преждевременному старению, онкологическим заболеваниям, репродуктивным нарушениям и наследственным патологиям [3, 6, 7].

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 батарее валидированные тесты, регистрирующие различные категории генотоксических событий [8, 9].

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 [6, 8, 10, 11].

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 [12–14].

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 [15].

Использование наноматериалов стало неотъемлемой частью современного инновационного развития медицины и фармацевтики. 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. Однако, несмотря на достигнутый прогресс в этом направлении, проблема находится пока на стадии решения [16, 17].

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 [18–20]. Работа в этом направлении требует системной оценки эффектов в разных органах и тканях, что методически возможно только на основе определения целостности ДНК. Это 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 и психиатрических заболеваниях, глазных болезнях, метаболическом синдроме, сахарном диабете, хронической обструктивной болезни легких [21–24]. Роль возникающих повреждений ДНК в их патогенезе до конца не ясна, однако на сегодня уже очевидно, что они могут запускать процессы (сенесценцию, воспаление, клеточную гибель), 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 [25, 26].

Метод сегодня рассматривается в качестве одного из базовых в стратегиях оценки безопасности лекарственных средств, наноматериалов, химикатов крупнотоннажного производства [27–29]. Метод ДНК-комет находит широкое

применение в целях оценки эндогенной генотоксичности и генотоксикологического биомониторинга [30].

Несмотря на положительный опыт применения метода ДНК-комет в разных сферах фундаментальных и прикладных исследований, вопросы воспроизводимости и интерпретации получаемых данных, а также многие методические аспекты использования метода, требуют уточнения и адаптации под актуальные задачи разработки лекарственных средств и средств защиты генома [31–33]. Их решению на основе анализа собственного опыта исследования поврежденности ДНК в половых клетках и соматических клетках разных органов/тканей посвящена настоящая работа.

Степень разработанности темы исследования

Анализ причин variability результатов, получаемых методом ДНК-комет в приложении *in vitro* и *in vivo* исследований, активно исследуется с момента его разработки и внедрения в практику [34]. На основе результатов масштабных межлабораторных исследований разработаны унифицированные протоколы проведения метода [35, 36]. Вместе с тем анализ появляющихся экспериментальных исследований, выполненных с применением метода ДНК-комет, свидетельствует о сохраняющейся меж- и внутрилабораторной variability 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 [37]. 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 которого определен метод ДНК-комет [38]. 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 [3]. 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.

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

В рамках поставленной цели решались следующие **задачи**:

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 вариабельности 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); 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. Автор 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. В опубликованных научных работах и автореферате полностью отражены основные результаты диссертации, положения и выводы.

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 и списка литературы, который включает 374 публикации, в том числе 43 отечественных и 331 иностранный источник.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Повреждения ДНК – основа возникновения мутаций

Возникновение мутаций – естественный биологический процесс, приводящий к фиксированному изменению последовательности нуклеотидов в ДНК клеток. Он представляет собой фундаментальную особенность живых организмов и является эволюционно-сформированным механизмом обеспечения генетического разнообразия. При отсутствии явных внешних факторов, влияющих на частоту возникновения мутаций, средний уровень мутирования на локус или геном за поколение остается схожим у близкородственных таксономических групп.

С открытием структуры ДНК исследования в области мутагенеза получили молекулярную основу, что дало возможность начать изучение природы и молекулярных механизмов индукции мутаций, продолжающееся до сих пор. В ходе этой работы стало очевидно, что мутагенез представляет собой двухступенчатый биологический процесс, в основе которого лежит первичное повреждение химической структуры ДНК, приводящее к возникновению мутаций вследствие недостаточной или ошибочной репарации (рисунок 1.1).

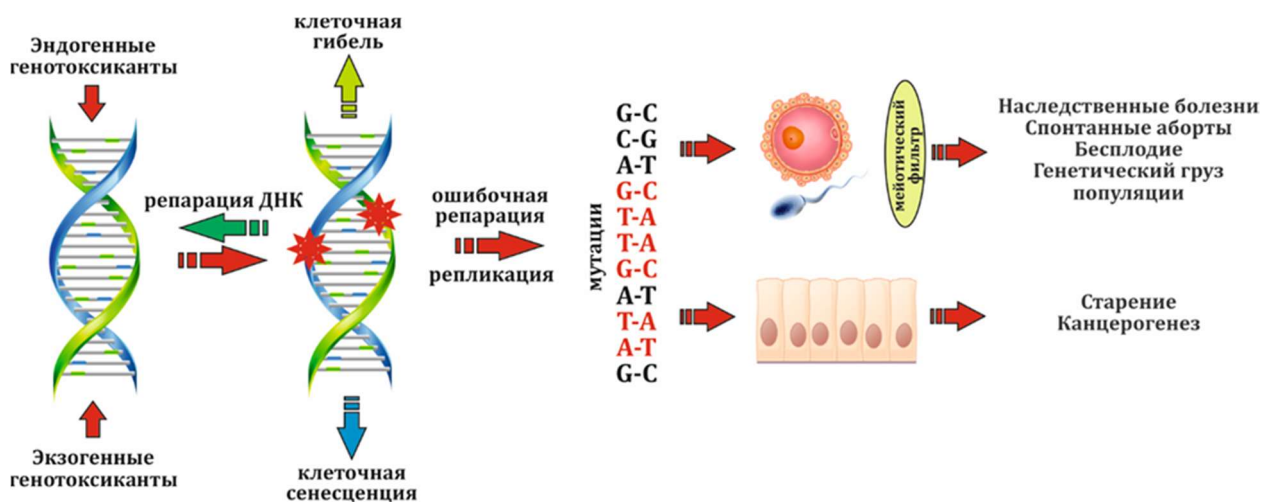


Рисунок 1.1 – Общие представления о механизмах мутагенеза и его медицинские последствия

Термин мутация был введен Хуго Де Фризом (1901 г.) для определения внезапного, скачкообразного и наследуемого изменения признака (фенотипа). Сегодня этот термин приобрел множество оттенков. В зависимости от контекста и направлений исследований, мутации стали подразделять:

- по характеру изменения фенотипа (летальные, морфологические, физиологические, биохимические, поведенческие);
- по влиянию на приспособляемость организма (положительные, нейтральные, вредные);
- по источнику возникновения (спонтанные, радиационно- или химически-индуцированные);
- по локализации в клетке (в ядерной или митохондриальной ДНК);
- по возможности наследования (генеративные и соматические);
- по проявлению в гетерозиготе (доминантные, рецессивные);
- по направленности (прямые и обратные);
- по месту локализации в гене (интронные, экзонные) и т.д.

В генетической токсикологии мутации принято подразделять на генные, хромосомные и геномные, т.е. в зависимости от уровня организации генетического материала. Принципиально, что генные и стабильные хромосомные aberrации имеют сходный молекулярный формат и представлены делециями, дупликациями, инверсиями, инсерциями и транслокациями групп нуклеотидных пар. Разница только в протяженности затрагиваемой нуклеотидной последовательности, что определяет принципиально разное «поведение» мутантных локусов или участков хромосом в мейозе.

Генные мутации могут возникать в результате стохастических ошибок, вносимых репликационными ДНК-полимеразами δ и ϵ [39]. Нарушения в работе митотического аппарата – ошибки когезии сестринских хроматид, взаимодействий кинетохор-микротрубочки и динамики микротрубочек, а также дисфункциональность теломер и дефекты митотических чек-поинтов могут приводить к геномным мутациям [40]. Вместе с тем в основе возникновения

подавляющего большинства мутаций в клетках лежит повреждение молекулы ДНК.

Под влиянием факторов окружающей среды и естественных метаболических процессов в клетках происходит повреждение ДНК со скоростью от 1000 до 1000000 событий на клетку ежедневно. Основная часть повреждений ДНК представлена модификациями азотистых оснований, включающими окислительное повреждение, метилирование, алкилирование, дезаминирование, депуринизацию/депиримидинизацию с образованием апуриновых/апиримидиновых сайтов (АП-сайтов), образование фотопродуктов и ДНК-аддуктов. Нарушения структуры молекулы ДНК включают меж- и внутринитевые сшивки, сшивки ДНК-белок, одно- и двунитевые разрывы (рисунок 1.2) [41].

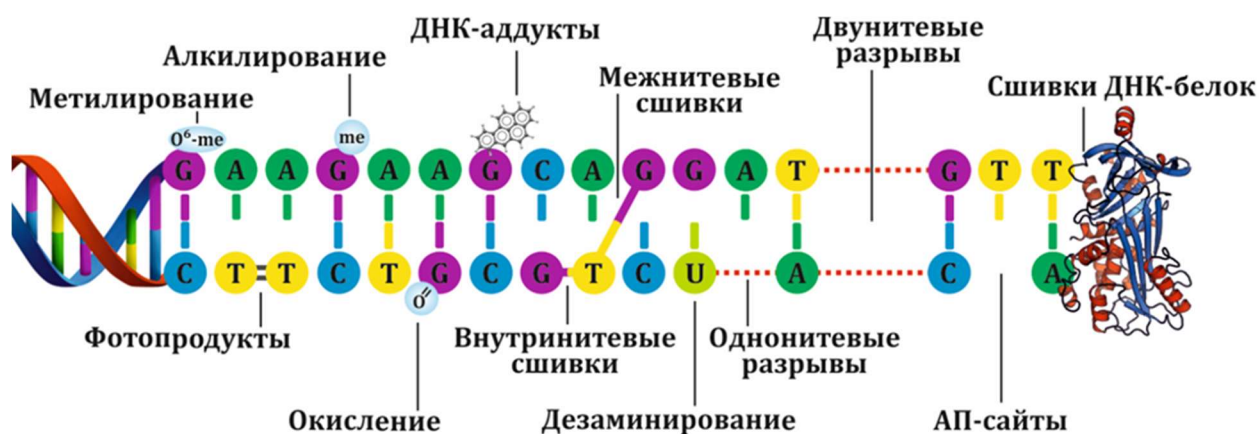


Рисунок 1.2 – Типы первичных повреждений ДНК

Дезаминирование оснований. Дезаминирование происходит в результате химической реакции отщепления аминогруппы ($-NH_2$) от гуанина, аденина и цитозина с превращением их, соответственно, в ксантин, гипоксантин и урацил (рисунок 1.3) [42, 43]. В ДНК этот процесс может происходить путем спонтанного гидролиза, под действием ферментов (AID/APOBEC-семейство активационно-индуцированных дезаминаз, цитидиндезаминаза) или химических агентов (нитриты, бисульфит натрия) [43]. Наиболее частым является спонтанное превращение цитозина в урацил, которое происходит с частотой около 100 оснований на клетку в день, тогда как дезаминирование аденина происходит в

50 раз реже [43]. Дезаминирование оснований приводит к транзициям $C \rightarrow$ урацил $\rightarrow T$, $A \rightarrow$ гипоксантин $\rightarrow G$ и трансверсиям $5mC \rightarrow T$ с возникновением точечных мутаций.

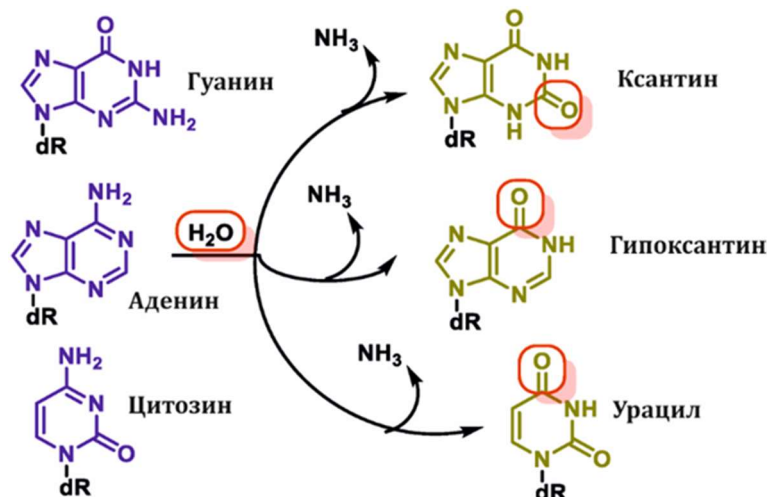
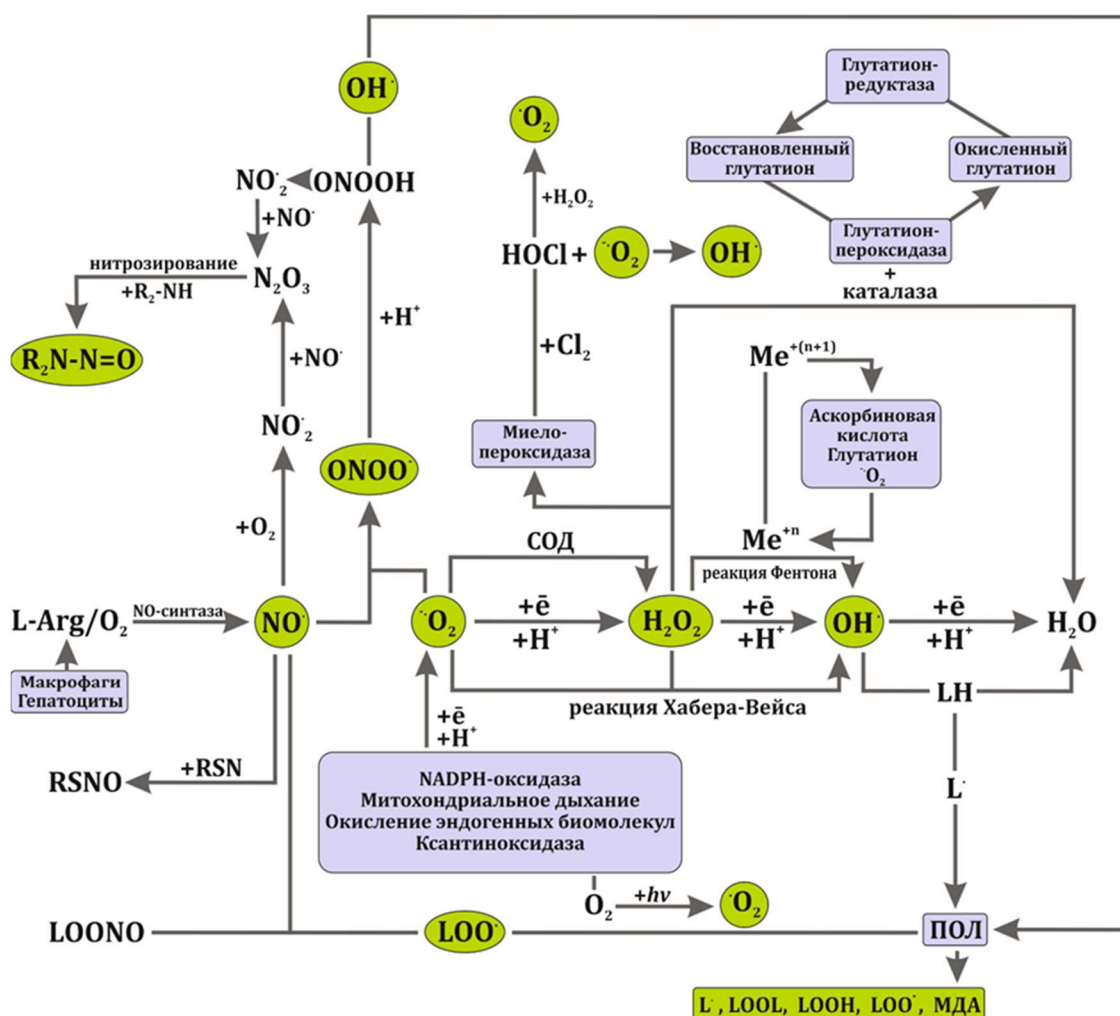


Рисунок 1.3 – Дезаминирование оснований ДНК (адаптировано из [42])

Метилирование оснований. Метилирование цитозина – ковалентная модификация 5-го атома углерода в пиримидиновом кольце с образованием 5-метилцитозина (5mC) – является ключевым эпигенетическим механизмом регуляции генов, играющим критическую роль в контроле экспрессии генов, инактивации X-хромосомы, развитии и дифференциации [44]. В то же время другие метилированные основания являются источником индукции генных мутаций, в особенности O⁶-метилгуанин, возникающий при метилировании гуанина в O⁶-положении [45].

Окислительное повреждение ДНК. От 1 до 5% кислорода в клетках в ходе естественных биохимических процессов преобразуется в воду в процессе одноэлектронного восстановления, при этом в качестве промежуточных продуктов образуются высокореакционноспособные формы кислорода и азота, известные как активные формы кислорода (АФК) и азота (АФА) [46]. В последние десятилетия изучение биологической и токсической роли АФК и АФА стало актуальным направлением, которое произвело прорыв в понимании механизмов генотоксичности [47]. Стало очевидным, что для многих, если не большинства,

генотоксикантов способность повреждать ДНК опосредована образованием АФК и АФА, при этом прооксидантный механизм зачастую сочетается с другими механизмами генотоксической активности. Свободные радикалы – молекулы с неспаренными электронами на внешней орбитали. Подобная нестабильная электронная конфигурация определяет их высокую реакционную способность по отношению ко всем клеточным макромолекулам, включая ДНК [48]. Существующие представления об образовании, превращении и детоксикации АФК и АФА в общем виде представлены на рисунке 1.4.



Примечание – СОД – супероксиддисмутаза; ПОЛ – перекисное окисление липидов; МДА – малоновый диальдегид (агенты, индуцирующие повреждения ДНК, обозначены зеленым цветом).

Рисунок 1.4 – Возникновение АФК и АФА и связанных с ними генотоксических продуктов

АФК, АФА и другие свободные радикалы индуцируют целый спектр повреждений ДНК. В первую очередь, это окислительная модификация оснований. В результате свободно-радикальной атаки образуются более 100 окислительно-модифицированных форм оснований [9, 10]. Гуанин является основанием с самым низким стандартным восстановительным потенциалом среди всех оснований ДНК и, следовательно, наиболее подвержен окислению различными окислителями, такими как радикалы $\text{OH}\cdot$, $\cdot\text{O}_2$, ONOO^- с образованием 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина (8-oxodG) – наиболее часто встречающегося и рассматриваемого сегодня в качестве высокоспецифического биомаркера окислительного повреждения ДНК (рисунок 1.5) [49].

К другим распространенным окисленным основаниям относятся также 2,6-диамино-4-гидрокси-5-формадиопиримидин (FapydG), 7,8-дигидро-8-оксоаденин (8-oxoAde), 4,6-диамино-5-формадиопиримидин (FapydA) и др. (рисунок 1.5) [42, 50].

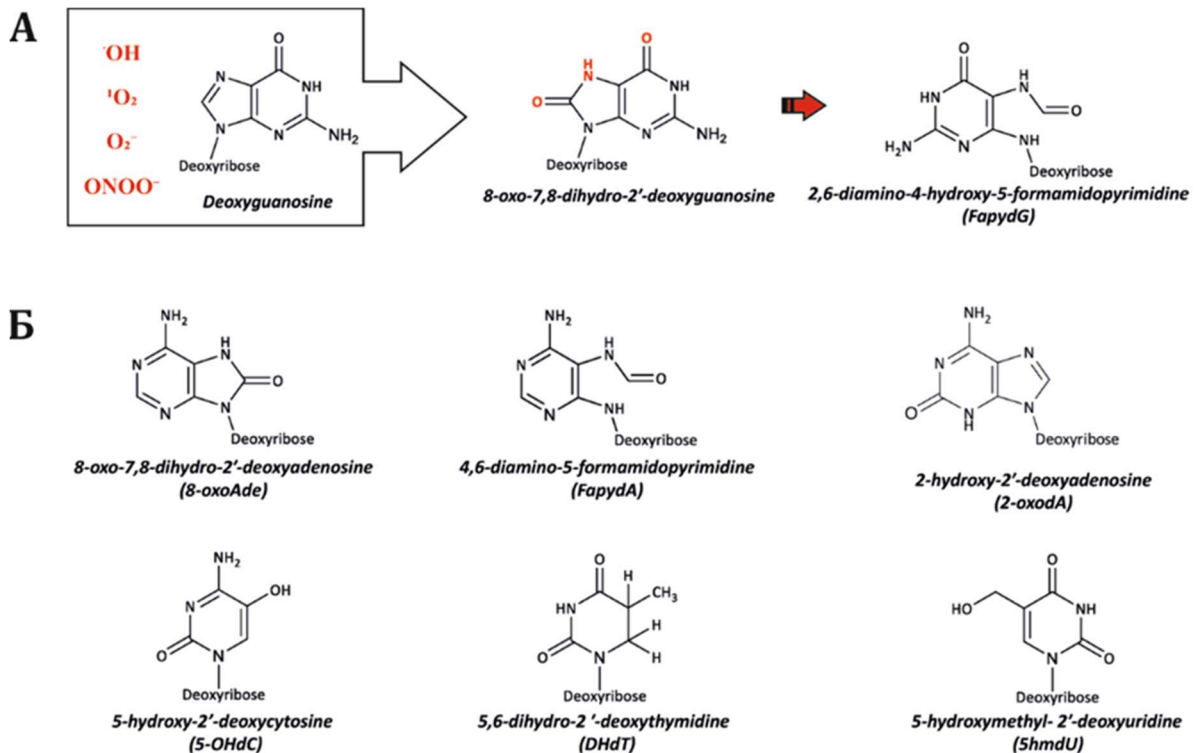


Рисунок 1.5 – Образование 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина и FapydG (А) и наиболее распространенные окисленные основания ДНК (Б)

Повреждение 2'-дезоксирибозы свободными радикалами приводит к образованию различных продуктов окисления с формированием апуриновых/апиримидиновых сайтов и разрывов нитей ДНК [51]. Одновременное же повреждение оснований ДНК и 2'-дезоксирибозы приводит к образованию внутринитевых (рисунок 1.6, А) и межнитевых (рисунок 1.6, Б) сшивок ДНК [52]. Вклад каждой отдельной АФК или иной свободно-радикальной молекулы в индукцию повреждений ДНК до конца не ясен. Большинство авторов склоняется к тому, что ключевая роль в повреждении ДНК при окислительном стрессе *in vivo* принадлежит гидроксильному радикалу, возникающему непосредственно в области мишени [53].

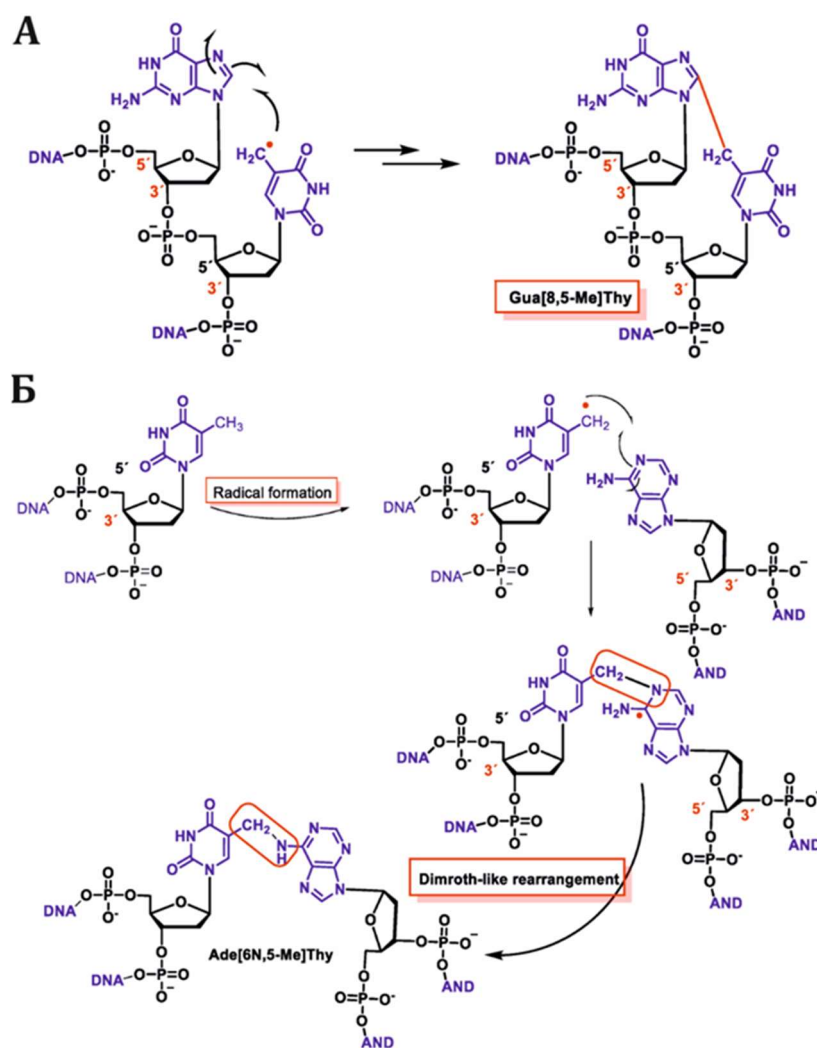
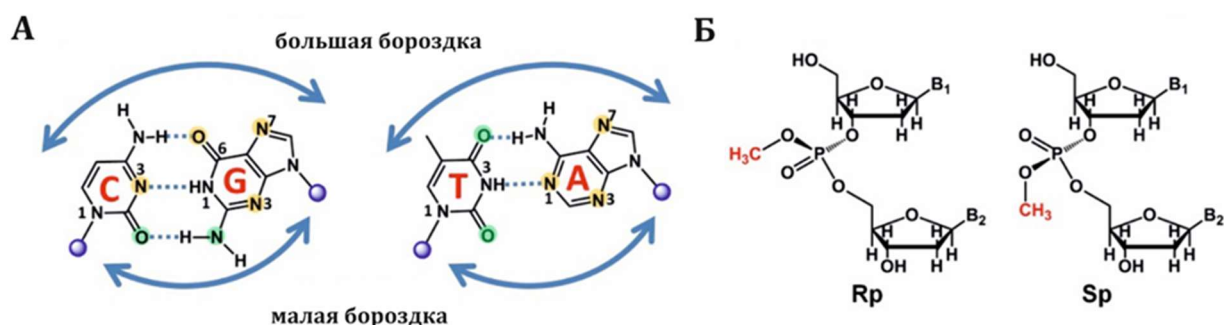


Рисунок 1.6 – Свободно-радикальные механизмы образования внутринитевых (А) и межнитевых (Б) сшивок ДНК [42]

Алкилирование. Существует два основных типа алкилирующих агентов – монофункциональные (S_N1) и бифункциональные (S_N2) [54]. Первые содержат одну реакционную группу, которая ковалентно связывается с нуклеофильным центром в ДНК и в первую очередь модифицирует аминогруппы в кольце, во вторую – кислород (рисунок 1.7). Бифункциональные алкилирующие агенты содержат две реактивные группы, которые в дополнение к алкилированию могут приводить к образованию циклических оснований или межнитевых сшивок ДНК [54].



Примечание – Желтым цветом обозначены основные участки повреждения, зеленым – второстепенные.

Рисунок 1.7 – Участки модификации оснований алкилирующими агентами (А).
Изомеры Rp и Sp метилфосфотриэфиров (Б)

Из-за высокой нуклеофильной реакционной способности в N7-положении гуанина большинство монофункциональных алкилирующих агентов вызывают образование N7-метилгуанина (7meG), на долю которого приходится 60–80% всех алкилирующих повреждений ДНК. Среди атомов кислорода в ДНК O6-положение гуанина является основным местом алкилирования агентами типа S_N1 с образованием O6-метилгуанина (O6meG). Несмотря на то, что O-алкильные повреждения образуются в гораздо меньшей степени, чем N-алкильные, именно первые приводят к возникновению генных мутаций, хромосомных aberrаций и к цитотоксическим эффектам в клетках [45, 55]. Примечательно, что особенности и количественные закономерности цитогенетического действия моно- и

бифункциональных алкилирующих агентов были детально исследованы отечественным коллективом под руководством академика Н.П.Бочкова.

К эндогенным монофункциональным алкилирующим агентам относится S-аденозилметионин. Экзогенными источниками алкилирующих агентов являются средовые загрязнители, широко представленные в табачном и промышленных дымах или возникающие при приготовлении пищи. В настоящее время ряд S_N1 -алкилирующих (дакарбазин, прокарбазин, ломустин, темозоломид, стрептозоцин) и S_N2 -алкилирующих агентов (мелфалан, циклофосфамид, хлорамбуцил, митомицин С) широко используется в качестве противоопухолевых препаратов [54].

Фотопродукты. Под воздействием УФ-излучения между двумя соседними пиримидинами, обычно двумя остатками тимина, могут образовываться молекулярные поперечные связи (рисунок 1.8).

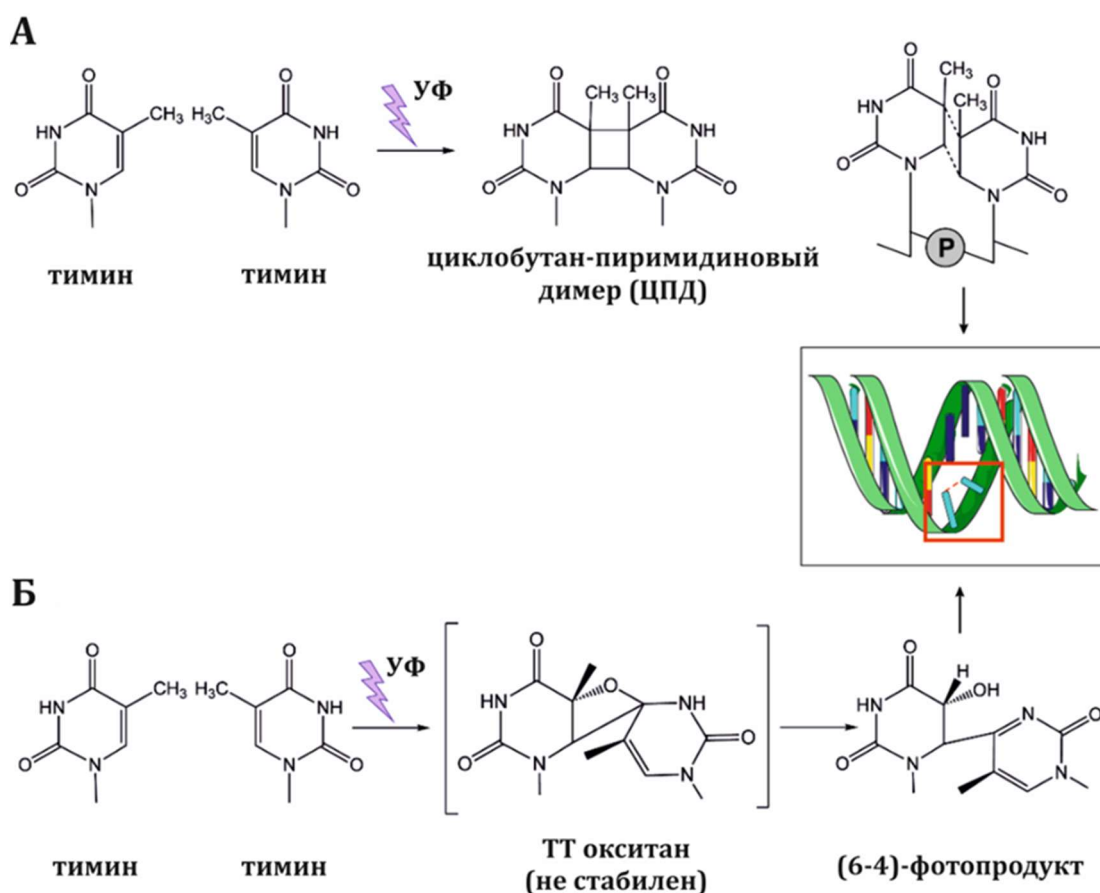


Рисунок 1.8 – Образование под воздействием УФ-излучения циклобутан-пиримидиновых димеров (А) и (6-4)-фотопродуктов (Б)

Наиболее распространенными продуктами УФ-излучения являются циклобутан-пиримидиновые димеры (ЦПД) с двумя и (6-4)-фотопродукты с одной ковалентной связью [56]. На образование ЦПД приходится около 80% индуцируемых УФ-излучением трансзиций С→Т и tandemных трансзиций СС→ТТ – наиболее часто встречающихся при раке кожи мутаций [57]. Образование фотопродуктов блокирует также работу ДНК-полимераз, приводя к нарушению репликации и образованию двунитевых разрывов ДНК.

Объемные ДНК-аддукты. Электрофильные агенты могут вступать в ковалентную связь с основаниями ДНК с образованием объемных аддуктов (bulky adducts) [58]. Наиболее известным соединением, индуцирующим образование ДНК-аддуктов, является бензо[а]пирен – полициклический ароматический углеводород, содержащийся в каменноугольной смоле, табачном дыме и многих продуктах питания, особенно в мясе, приготовленном на гриле [58]. В организме бензо[а]пирен метаболизируется до высокореактивного эпоксида, образующего аддукты с остатками гуанина в ДНК (рисунок 1.9).

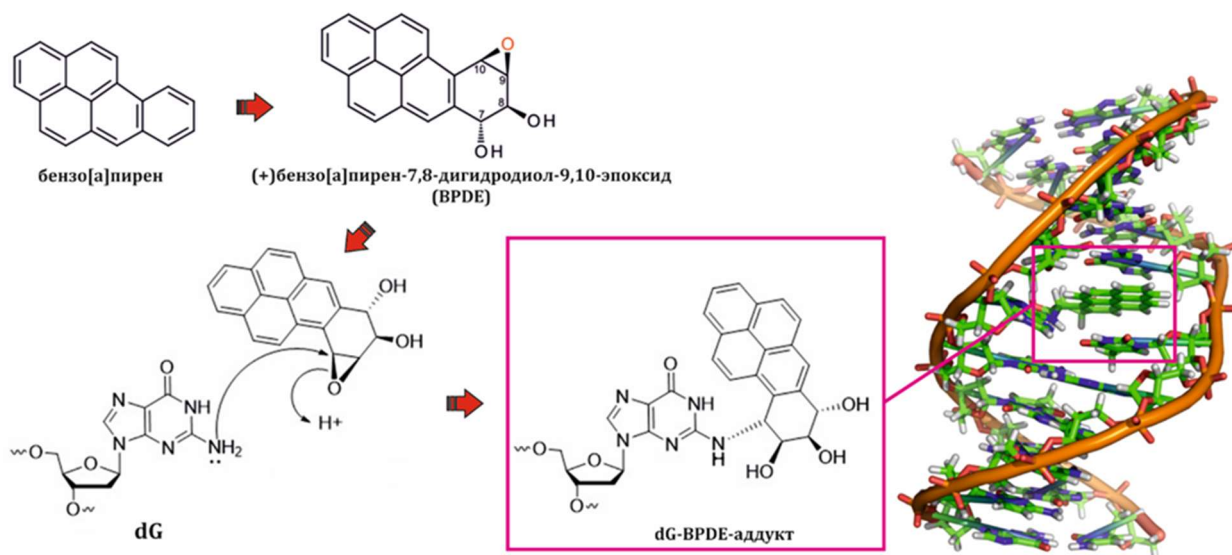
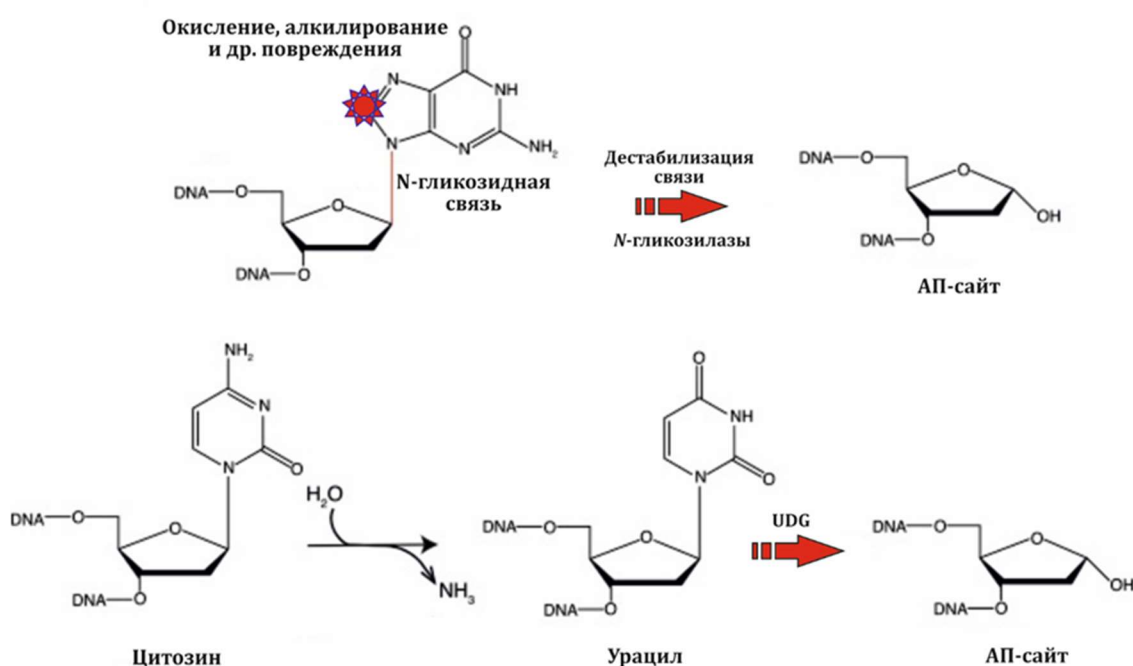


Рисунок 1.9 – Образование объемного ДНК-аддукта под действием (+)бензо[а]пирен-7,8-дигидродиол-9,10-эпоксида, продукта метаболизма бензо[а]пирена

В ходе репликации ДНК напротив повреждения в дочерней молекуле располагается аденин, что приводит впоследствии к возникновению трансверсии $G \rightarrow T$. Другими распространенными соединениями, вызывающими образование ДНК-аддуктов, являются известные канцерогены афлатоксин В₁, аристолохиевая кислота, ароматические амины, многие полициклические ароматические углеводороды, такие как хризен, бенз(а)антрацен, 7,12-диметилбенз(а)антрацен и др. [59]. Для большинства этих соединений характерно образование в ДНК кластера объемных аддуктов (clustered bulky adducts) – множества аддуктов, расположенных близко друг к другу в пределах 1–2 витков спирали [60]. При этом вероятность образования таких кластеров возрастает с увеличением интенсивности воздействия агентом. Репарация путем эксцизионной репарации нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER) и негомологичным соединением концов (NHEJ) малоэффективны в случае кластерных повреждений, что приводит к возникновению двунитевых разрывов ДНК и вследствие этого хромосомных aberrаций [60, 61].

Апуриновые/апиримидиновые сайты (АП-сайты). Возникновение АП-сайтов по сути является следствием индукции описанных выше повреждений оснований ДНК [62]. Именно поэтому они являются наиболее часто наблюдаемым повреждением ДНК в клетках (~20 000 на клетку человека в день) [62]. АП-сайты образуются в результате расщепления *N*-гликозидной связи между азотистым основанием и дезоксирибозой, при этом фосфодиэфирная цепь остается неповрежденной. Потеря оснований может происходить за счет дестабилизации *N*-гликозидной связи в поврежденных основаниях ДНК в результате дезаминирования оснований или под действием ферментов эксцизионной репарации *N*-гликозилаз (рисунок 1.10). Образование АП-сайтов является промежуточным звеном в возникновении одонитевых разрывов, меж- и внутринитевых сшивок ДНК и сшивок ДНК-белок [62, 63]. Как отмечалось выше, к возникновению АП-сайтов также приводит повреждение 2'-дезоксирибозы ДНК свободными радикалами.

АП-сайты стабильны при нормальных физиологических условиях, но разрушаются в щелочных условиях ($\text{pH} > 12$), формируя таким образом в ДНК участки, называемые щелочно-лабильными сайтами. В щелочных условиях фосфатный остов в АП-сайте подвергается β -элиминированию с образованием 5'-фосфата и 3'- α,β -ненасыщенного альдегида и возникновением разрыва нити ДНК [64]. Способность к разрушению фосфатного остова в щелочных условиях возникает также при повреждении оснований, в частности при образовании (6-4) – фотопродуктов и их окислении [64, 65].



Примечание – UDG – урацил-ДНК-гликозилаза.

Рисунок 1.10 – Механизмы образования АП-сайтов

Одно- и двунитевые разрывы ДНК. Возникновение однонитевых разрывов ДНК происходит главным образом в процессе репарации ДНК [66]. В ходе эксцизионной репарации оснований (Base Excision Repair, BER) ферменты семейства гликозилаз удаляют поврежденное основание (рисунок 1.11). Далее АП-эндонуклеазы вносят временный разрыв фосфодиэфирной связи в области образовавшегося АП-сайта. ДНК-полимераза β вставляет комплементарный нуклеотид и фосфодиэфирная связь лигируется комплексом ДНК-лигаза III α /XRCC1. Аналогичным образом однонитевые разрывы возникают в ходе

удаления объемных аддуктов ДНК путем эксцизионной репарации нуклеотидов (Nucleotide Excision Repair, NER) или репарации ошибочно спаренных оснований (Mismatch Repair, MMR). К образованию однонитевых разрывов также может приводить прямое повреждение 2'-дезоксирибозы или ингибирование топоизомеразы I, регулирующей топологию ДНК во время репликации и транскрипции [67].

Значительно более сложны механизмы возникновения двунитевых разрывов ДНК. В случае кластерного повреждения почти одновременная репарация может привести к образованию в противоположных цепях ДНК, близко расположенных промежуточных АП-сайтов или разрывов, способных спонтанно превращаться в двунитевые разрывы до завершения BER (рисунок 1.11). Такие кластерные повреждения вызывает радиация и некоторые химические вещества, такие как блеомицин и неокарциностатин, вследствие чего их часто называют «радиомиметиками». Ингибирование топоизомеразы II также может приводить к возникновению двунитевых разрывов [67].

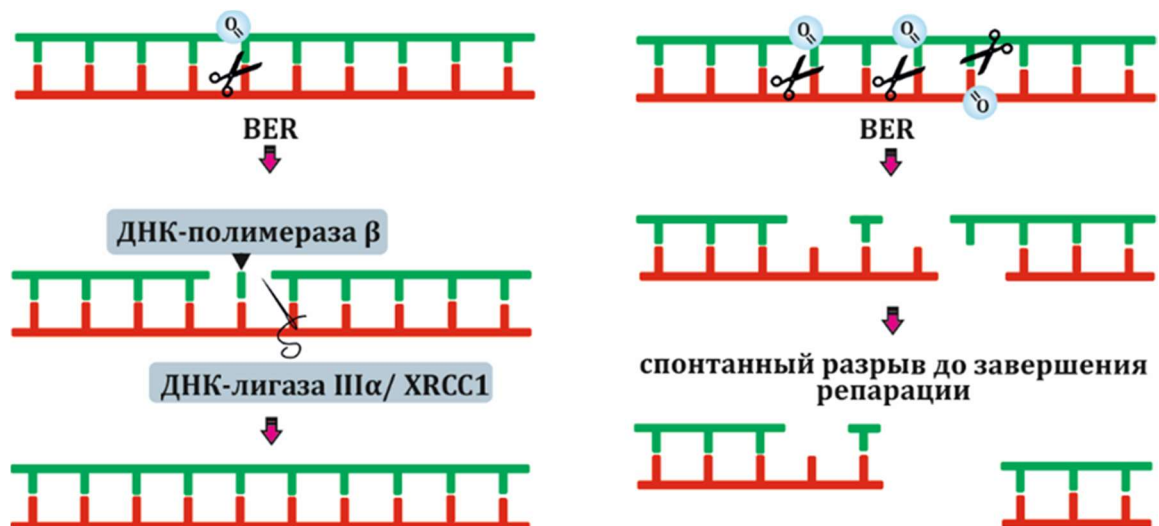


Рисунок 1.11 – Образование одно- и двунитевых разрывов ДНК в ходе эксцизионной репарации оснований (BER)

Большая часть двунитевых разрывов ДНК в клетках возникает в ходе репликации ДНК [68]. Однонитевой разрыв в матричной цепи приводит к остановке репликативной вилки и последующему образованию двунитевого

разрыва (рисунок 1.12, А). Фотопродукты, объемные ДНК-аддукты, сшивки ДНК и АП-сайты в реплицирующейся ДНК приводят к коллапсу репликационной вилки (рисунок 1.12, Б(1)). Последняя может регрессировать и частично вытеснить вновь синтезированные ДНК из матричных цепей, что позволяет 3'-концу ведущей цепи «отжигаться» с 5'-концом отстающей цепи (рисунок 1.12, Б(2)). Получившаяся «куриная лапка» идентична структуре Холлидея и может быть расщеплена резольвазами или нуклеазами с образованием двунитевого разрыва (рисунок 1.12, Б(3)) [69].

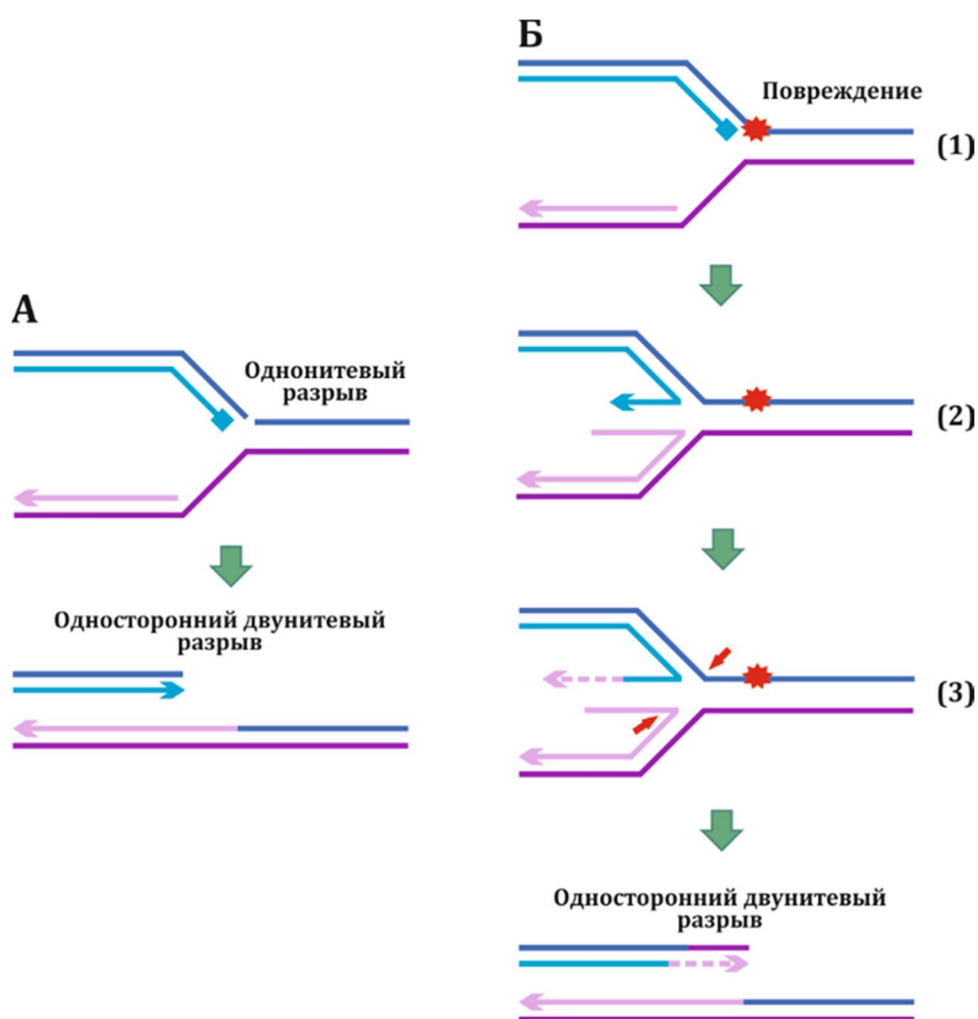


Рисунок 1.12 – Образование двунитевых разрывов ДНК в ходе репликации

Двунитевые разрывы ДНК являются более опасными, поскольку для них, в отличие от однонитевых разрывов, нет неповрежденной комплементарной цепи для использования в качестве матрицы при репарации. Репарация двунитевых

разрывов проходит посредством классического негомологичного соединения концов (canonical Non-Homologous End Joining, cNHEJ), альтернативным NHEJ (aNHEJ или опосредованным микрогомологией) и путем гомологичной рекомбинации (Homologous Recombination, HR). Ошибки при репарации путем cNHEJ приводят к возникновению относительно коротких хромосомных делеций или инсерций, в то время как при репарации путем aNHEJ – более крупных делеций, а также транслокаций и других масштабных перестроек хромосом [61, 69].

Таким образом, повреждение азотистых оснований является ключевым молекулярным событием, ведущим к индукции целого спектра других повреждений ДНК. Возникающие в клетке повреждения ДНК подвергаются репарации, в случае же невозможности их полноценного устранения инициируется гибель клетки или ее переход в состояние сенесценции (клеточного старения). Эти механизмы совместно с детоксицирующими потенциально опасные агенты механизмами являются многоуровневой системой защиты организма от нежелательных изменений генетической информации. Сбои в этой защите приводят к фиксации первичных повреждений ДНК, в зависимости от их типа, в мутации различного масштаба – от генных до хромосомных. Система достаточно эффективно справляется со спонтанными повреждениями ДНК, являющимися неизбежным следствием процессов жизнедеятельности клеток, обеспечивая таким образом низкие темпы спонтанного мутирования. Вместе с тем увеличение генотоксического воздействия эндогенно вследствие активации патологических процессов в организме и/или под действием экзогенных генотоксикантов может приводить к интенсификации возникновения мутаций – индуцированному мутагенезу, представляющему собой одну из важнейших медицинских проблем.

1.2 Медицинские последствия индуцированного мутагенеза

С момента становления медицинской генетики особое внимание привлекала проблема значимости мутаций для здоровья человека. Ее обсуждали многие выдающиеся генетики, в отечественной литературе этому вопросу наибольшее

внимание уделили академик РАМН Бочков Н.П. и академик РАН Дубинин Н.П. Сегодня мутагенез рассматривается как ведущий механизм инициации канцерогенеза, старения и как первооснова возникновения наследственных заболеваний [70, 71].

Мутагенез и канцерогенез. Негативные последствия индуцированного мутагенеза в соматических клетках главным образом связаны с риском возникновения онкологических заболеваний [70].

Первой известной попыткой объяснить происхождение рака можно считать исследования, проведенные в начале XX века [72]. В это время стало известно, что бесклеточные экстракты опухолевых животных способны вызывать опухоли у здоровых особей, что послужило основой для предположения о том, что опухоли могут возникать из структур, меньших по размеру, чем клетка. В 1914 году Теодор Бовери предложил гипотезу соматических мутаций, обнаружив хромосомные аномалии в опухолевых клетках. Следующие исследования подтвердили, что генетическим материалом является ДНК и что для развития рака необходимо накопление примерно шести или семи мутаций. В 1960-х годах был введен термин «онкоген». В это же время исследования Брюса Эймса и других ученых показали, что большинство канцерогенов одновременно являются мутагенами, демонстрируя тесную взаимосвязь мутагенеза и канцерогенеза [73].

Дальнейший прогресс технологий и накопление знаний в молекулярной онкологии способствовали формированию комплексной механистической модели, описывающей канцерогенез как процесс, состоящий из трех стадий [74]: 1) стадия инициации, в ходе которой происходит накопление мутаций в клетках; 2) стадия промоции, на которой в результате длительного воздействия промоторов (факторов, стимулирующих пролиферацию) происходит клональная экспансия инициированных клеток; 3) стадия прогрессии, характеризующаяся накоплением дополнительных мутаций и эпигенетических изменений в клетках, ведущих к неограниченной пролиферации и способности к инвазии и метастазированию. Установлено, что для злокачественной трансформации клетки необходимо последовательное, многораундовое накопление мутаций в определенных

«драйверных» генах – онкогенах (протоонкогенах) и генах-супрессорах опухолей [35, 36]. Процесс канцерогенеза определяется эпистатическими взаимосвязями между его «драйверными» мутациями, их частотой в конкретных генах и последующей интенсивностью роста опухоли [72]. Например, наиболее распространенная форма острого миелоидного лейкоза несет мутации в «драйверных» генах *DNMT3A*, *NPM1* и *FLT3* – именно в таком порядке приобретения. На настоящий момент идентифицирован 591 канонический «драйверный» ген [77], мутации в которых приводят к злокачественной трансформации клеток с приобретением отличительных признаков рака (hallmarks of cancer), включающих: подавление клеточной гибели; автономную стимуляцию пролиферации (независимость от внешних сигналов); нечувствительность к ингибирующим рост факторам; неограниченный репликативный потенциал («клеточное бессмертие»); уклонение от иммунного надзора; индукцию ангиогенеза; способность к инвазии и метастазированию; нарушение регуляции энергетического метаболизма; фенотипическую пластичность [78].

Параллельно установлено, что геномы опухолевых клеток содержат множество дополнительных «пассажирских» мутаций. Совокупный анализ паттернов «драйверных» и «пассажирских» мутаций ДНК в опухолях позволил получить новые сведения о механизмах возникновения различных видов рака и определить его как заболевание, имеющее мутационную основу [85, 86]. Важно отметить, что значительный временной лаг (исчисляемый десятилетиями) между появлением первичных «драйверных» мутаций и клинической манифестацией опухоли превращает индуцированный мутагенез в особую медицинскую проблему с крайне отсроченными клиническими последствиями [79]. Такой временной диссонанс между причиной (мутации) и следствием (опухоль) определяет необходимость особых подходов при разработке стратегий превенции канцерогенеза.

Мутагенез и старение. В начале 1950-х годов Лео Сцилардом была выдвинута гипотеза, что скорость старения определяется скоростью накопления спонтанных мутаций в соматическом геноме [80]. Гипотеза была поддержана

многими исследователями, однако получить экспериментальные подтверждения не удавалось, поскольку количественный анализ мутаций представлял сложную методическую задачу. Косвенным доказательством существования причинно-следственной связи между возникновением мутаций и старением послужили данные о том, что нарушения в механизмах репарации ДНК приводят к ускоренному старению у мышей, а также лежат в основе некоторых прогероидных синдромов у людей, таких как синдром Вернера, синдром Блума, пигментная ксеродерма, триходистрофия, синдром Коккейна или синдром Секкеля [81]. Кроме того, было установлено, что уровень экспрессии генов, отвечающих за репарацию ДНК, имеет прямую корреляцию с продолжительностью жизни у разных видов грызунов [82].

Долгое время единственными типами мутаций, которые можно было обнаружить с помощью цитогенетических методов, были крупные хромосомные aberrации в клетках крови или костного мозга. Было установлено, что у молодых людей ~1% клеток содержит по крайней мере одну хромосомную аномалию, такую как транслокация, делеция, дупликация, инверсия, анеуплоидия или сложные перестройки, а в клетках пожилых людей этот показатель приближается к 5%. Впервые накопление с возрастом мутаций в органах и тканях экспериментально было показано с использованием селективных репортерных генов в моделях мышей [83].

Благодаря значительным достижениям в области секвенирования, в том числе новейшей технологии дуплексного секвенирования отдельных клеток, появилась возможность количественно определить мутации непосредственно в тканях человека [84]. Получены неопровержимые доказательства возрастного накопления мутаций во всех тканях человека [85, 86]. Самая низкая скорость выявлена в клетках семенных канальцев – 2,38 однонуклеотидных замен в год на клетку, самая высокая – в криптах аппендикса толстой кишки – 56 однонуклеотидных замен (рисунок 1.13). На порядок реже наблюдаются мутации по типу инсерций/делеций [86].



Рисунок 1.13 – Средняя скорость накопления одноклеточных замен (Single Nucleotide Variant, SNV) в клетках нормальных тканей человека (адаптировано из [85])

Важно отметить, что возраст проявляется не только в увеличении количества мутаций, но и в характерном их паттерне, именуемом мутационной сигнатурой [87]. На основе различных типов мутаций, наблюдаемых в опухолевых тканях, был создан каталог мутационных сигнатур соматических мутаций при раке (COSMIC), который в настоящее время используется в качестве стандарта для сопоставления сигнатур соматических мутаций, обнаруженных во многих нормальных клетках и тканях [88]. Для описания процесса старения были выделены специфические сигнатуры, названные «часовыми» (clock-like), такие как SBS1, SBS5, SBS40, сигнатуры дуплетной замены оснований DBS2 и DBS4, а также сигнатуры малых инсерций/делеций ID1, ID2, ID5 и ID8. Так, сигнатура SBS1 представляет

трансзиции С→Т в тринуклеотидах NpCpG, возникающие в результате спонтанного дезаминирования 5-метилцитозина. Сигнатура SBS4 – трансверсия С→А, приводящая к смещению транскрипционной цепи, ассоциирована с табакокурением. Определены соматические мутационные сигнатуры, характерные для воздействия различных факторов окружающей среды [89].

До сих пор нет четкого понимания механизмов причинно-следственной связи между возникновением мутаций и старением, а также возрастными заболеваниями, не связанными с раком. Существует три гипотезы функциональных последствий накопления возрастных соматических мутаций – клональной экспансии мутаций, возникающих на этапе раннего развития, соматической эволюции «эгоистичных» мутаций и гипотеза «мутантной сети» [90]. Первые две гипотезы предполагают клональную экспансию в тканях мутантных клеток, либо за счет селективного преимущества, либо путем генетического дрейфа, приводящую к снижению или нарушению функциональности ткани. Третья гипотеза основана на дестабилизации работы генных регуляторных сетей вследствие накопления в них критического уровня мутаций [85]. Генные регуляторные сети (Gene Regulatory Networks, GRNs) – это сложные системы взаимодействий между генами, их регуляторными элементами (например, транскрипционными факторами) и другими молекулами (РНК, белки), которые контролируют экспрессию генов в клетке. Каждый из генов этой системы, который активен в конкретной клетке, должен работать согласованно, чтобы обеспечить специфическую функцию, жизнеспособность и выживание этой клетки. Все эти гены должны экспрессироваться в нужное время, в нужном количестве и в нужных клетках, чтобы обеспечить соответствующую функциональную активность ткани.

Старение – это не полное прекращение определенных биологических процессов, а постепенное снижение их эффективности. Например, терморегуляция, иммунный ответ, кратковременная память и т.д. у пожилых людей снижены, но не утрачены полностью. Такое снижение функциональности можно объяснить и клональной экспансией мутантных клеток с аномальным фенотипом, и постепенным накоплением мутаций в компонентах GRNs, приводящим к

нарушению межклеточного взаимодействия в тканях [90]. Очевидно, что механизмы старения более сложны и комплексны, однако их мутационная природа, как и в случае с раком – ключевым заболеванием, ассоциированным с возрастом, сегодня не вызывает сомнений.

Мутагенез и наследственность. Последние исследования с применением новейших технологий полногеномного секвенирования показали, что каждое последующее поколение в среднем приобретает 98–206 *de novo* мутаций, из которых 74,5 приходится на однонуклеотидные замены, 7,4 на инсерции/делеции вне тандемных повторов, 65,3 на инсерции/делеции и структурные геномные вариации в тандемных повторах, 4,4 на мутации в области центромерных участков хромосом [91]. Повышение частоты мутаций в половых клетках вследствие воздействия мутагенных факторов несет явную угрозу для здоровья и жизни последующих поколений.

Усилиями нескольких коллективов ученых были выявлены основные закономерности проявления патологической наследственной изменчивости у человека:

- показано, что около 25% наследственной патологии манифестирует в гамето- и эмбриогенезе, около 65% – в допубертатном и пубертатном возрасте [92];
- развита первоначально предложенная Джоном Холдейном концепция генетического груза, под которым сегодня понимается сумма мутаций, снижающих приспособляемость и выживаемость популяций, а в медицинском плане приводящих к многочисленным генетически обусловленным заболеваниям, угрожающим жизни и здоровью людей и их потомков (таблица 1.1) [93];
- выявлена ведущая роль в структуре генетического груза генных, хромосомных и геномных мутаций, которые формируют соответственно группы генных и хромосомных болезней [94];
- показано, что мутации неопределенно долго сохраняются в следующих поколениях, их воспроизводство и распространение описывается закономерностями популяционной генетики [94].

Таблица 1.1 – Структура генетического груза

Генотоксическое событие				
	Генные мутации	Хромосомные и геномные мутации	Геномные мутации в 100% случаев мутации <i>de novo</i>	Мутационная и комбинационная изменчивость, эпигенетические события
Патология	Генные болезни (свыше 5 тысяч)	Хромосомные болезни (около 100)	Снижение фертильности	Мультифакторные заболевания (заболевания с генетической предрасположенностью)
	Распространенность: 0,1/100 ÷ 1/100	Распространенность: 0,5/100		
Примеры	Фенилкетонурия	Синдром Клайнфельтера	Из клинически подтвержденных беременностей	Атеросклероз
	Муковисцидоз	Синдром Шерешевского-Тернера	25% завершается гибелью эмбрионов, в 90% случаев по причине геномных мутаций	Бронхиальная астма
	Ахондроплазия	Синдром делеции 5p		Диабет
	Гемофилия	Синдром Дауна		Нейродегенеративные болезни и другие, по существу, все известные нозологии
	Синдром Марфана и др.	1/400 ÷ 1/800		
	Нейрофиброматоз (до 50% мутаций <i>de novo</i>)			

По современным оценкам, до 8% детей рождаются с генетически-обусловленными заболеваниями и предрасположенностью к серьезным патологиям (таблица 1.2) [95]. Выявлено более 4000 генов с редкими однонуклеотидными заменами и около 70 000 локусов количественных признаков, связанных с определенными фенотипами заболеваний [96]. Все чаще при генетически детерминированных заболеваниях обнаруживаются *de novo* структурные нарушения, в том числе инсерции/делеции и вариации числа копий (Copy Nucleotide Variant, CNV) размером >50 нуклеотидов. Более того, в общей популяции их частота на порядки выше, чем частота однонуклеотидных замен [97]. У детей с серьезными нарушениями развития также выявлены случаи масштабных перестроек генома, включая хромотрипсис и множественные *de novo* вариации числа копий [95].

До 26% всех клинически подтвержденных беременностей заканчиваются выкидышем, и по крайней мере в половине случаев причиной является анеуплоидия [98]. Согласно последним данным, по крайней мере у половины эмбрионов на стадии бластоцисты имеются значительные генетические нарушения, которые могут объяснять высокую частоту прерывания беременности [99]. До 60% зигот элиминируется на пре- и самых ранних постимплантационных

стадиях развития, до 20% подтвержденных беременностей прерывается в течение 1-го триместра из-за мутационных поражений [100].

Таблица 1.2 – Примеры генетических нарушений, выявляемых у живорожденных, и связанные с ними патологии [95]

Тип <i>de novo</i> мутации	Примеры патологий	Частота
Анеуплоидия	Синдромы Дауна, тройной X-хромосомы, Клайнфельтера, Шерешевского-Тернера, Эдвардса, Патау	1:1000 – 1:10 000
Хромосомные делеции, инсерции, дупликации, транслокации и перестройки	Полная делеция плеча хромосомы: синдром Якобсена, синдром делеции 6q, синдром «кошачьего крика» Делеции генов импринтинга: синдром Прадера-Вилли, синдром Ангельмана Дупликации и делеции, вызванные неаллельной гомологичной рекомбинацией: болезнь Шарко-Мари-Тута 1А типа, болезнь Гоше, синдром Хантера Инсерции/делеции: муковисцидоз, синдром ломкой X-хромосомы, болезнь Паркинсона	1:3000 – 1:1 000 000
Структурные нарушения (<50 нуклеотидов)	Псориаз, аутизм, шизофрения	Редко
Однонуклеотидные замены	Мутации в генах репарации и контроля целостности ДНК: синдром Ли-Фраумени, прогерия, анемия Фанкони, синдром Линча, пигментная ксеродерма, семейный рак молочной железы, атаксия-телеангиэктазия	1:5000 – <1:1 000 000
Спорадические генные мутации	Синдромы Шинцеля – Гидиона, Кабуки, Боринга-Опица, Протея	<1:1 000 000
Реципрокные транслокации между различными хромосомами	Нарушения развития нервной системы и психические расстройства, общие нарушения развития	1:600

Обобщение многочисленных цитогенетических исследований живо- и мертворожденных, материала спонтанных аборт, полярных телец, бластоцист, спермиев показало, что:

- частота анеуплоидии в спермиях составляет примерно 8–10%; возможно, что часть анеуплоидных сперматоцитов погибает при созревании, т.е. не исключается более высокая частота возникновения анеуплоидии в сперматогониях;

- частота анеуплоидных яйцеклеток колеблется от 10 до 20% и выше; большая часть таких яйцеклеток погибает до оплодотворения;

- частота анеуплоидных бластоцист и ранних зародышей близка к 8–10%;
- среди абортусов (ткани эмбрионов, плодов и оболочек) около 50% с хромосомными аномалиями;
- среди мертворожденных 6% с хромосомными аномалиями;
- частота анеуплоидий среди живорожденных составляет 0,3–0,5%;
- летальные эффекты хромосомных аномалий различаются в зависимости от вовлеченных в аномалии хромосом; например, моносомные зиготы по длинным хромосомам не развиваются, моносомные зиготы по X-хромосоме в 90–99% погибают либо на стадии бластоцисты, либо вскоре после имплантации, 2/3 зародышей с трисомией по 21 хромосоме элиминируются путем спонтанных абортов;
- суммарно 90% зародышей с хромосомными аномалиями отсеиваются отбором;
- частота анеуплоидий по многим хромосомам повышается с возрастом женщин, особенно после 35 лет, возраст мужчин имеет определенное значение, но после 45 лет;
- примерно 20% всех форм хромосомных аномалий относятся к мозаичным формам;
- частота хромосомных мутаций в гаметах составляет примерно 1/1000;
- нерасхождение хромосом в ооцитах происходит чаще, чем в спермиях и чаще в первом мейотическом делении, чем во втором.

Мутации в половых клетках обуславливают бесплодие супружеских пар. На сегодня идентифицировано 14 генов, мутации в которых приводят к нарушениям созревания и фертилизации ооцитов, а также раннего эмбрионального развития, и 10 генов, мутации в которых приводят к нарушениям морфологии сперматозоидов, снижению их количества и подвижности [101].

Таким образом, негативное влияние индуцированного мутагенеза на здоровье человека является научно доказанным и не подлежит сомнению.

Индукция мутаций в соматических клетках ассоциирована с преждевременным старением и повышенным риском развития онкологических заболеваний, которые представляют собой одну из наиболее значимых медико-социальных проблем современного общества. Мутагенез в клетках зародышевой линии является ключевым этиопатогенетическим фактором наследственной патологии и генетического груза популяций, а также выступает одним из ведущих механизмов репродуктивных потерь и снижения фертильности. В 1971 г. Германом Друкреем впервые было выдвинуто предположение, что негативные последствия для организма могут иметь не только мутации, но и лежащие в их основе первичные повреждения генетического аппарата, обуславливая возникновение заболеваний неизвестной этиологии, таких как хронические дегенеративные [102]. В 1973 г. им же и коллегами было предложено понятие «генотоксичный»: «...Для описания компонентов химического взаимодействия с генетическим материалом предлагается использовать термин «генотоксичный» в качестве общего понятия, охватывающего токсические, летальные и наследственные эффекты на кариотический и внекариотический генетический материал в зародышевых и соматических клетках...» [102].

1.3 Генотоксичность: механизмы и фундаментальная значимость

Выдвинутое Друкреем предположение долгое время не получало экспериментального подтверждения и первичным повреждениям ДНК отводилась исключительно роль подчиненных, предмутационных событий. Успехи последних двух десятилетий в области молекулярной биологии и генетики привели к раскрытию механизмов ответа клеток на повреждение ДНК, получившего обозначение DDR (DNA Damage Response) – интегрированной системы сенсоров, сигнальных и эффекторных молекул и репарационных механизмов, регулирующих клеточные ответы на повреждения генома и обеспечивающих клеточный и тканевой гомеостаз.

Механизмы DDR. В ответ на повреждение ДНК в клетках запускается каскад реакций, включающих распознавание повреждений ДНК с помощью

сенсорных молекул, активацию систем репарации напрямую через взаимодействие «сенсор-эффектор» или через ключевые сигнальные киназы, которые, в свою очередь, активируют эффекторные молекулы, осуществляющие репарацию с одновременной остановкой клеточного цикла (рисунок 1.14) [103].

Центральная роль в обнаружении и восстановлении двунитевых разрывов ДНК принадлежит белковому комплексу MRN, который индуцирует активацию киназы ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) [104]. Образование двунитевых разрывов определяется также гетеродимером Ku70/80 комплекса ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-ПК), который активирует его каталитическую киназную субъединицу DNA-ПКcs [104]. Для однонитевых разрывов и повреждений, блокирующих репликацию, главными сенсорами выступают комплексы RPA (Replication Protein A) и RAD9/RAD1/HUS1, а также PARP1. Они, связываясь с однонитевой ДНК, привлекают киназу ATR (Ataxia-Telangiectasia and Rad3-related) через свой партнерский белок ATRIP [104].

Киназа ATM фосфорилирует гистоны H2AX на серине 139 с образованием γ H2AX-фокусов. Это одни из самых ранних и важных маркеров возникновения двунитевых разрывов. γ H2AX-фокусы действуют как «сигнальный маяк», к которому стягиваются десятки других белков репарации и сигнализации [105]. Координация взаимодействия между сенсорами, сигнальными киназами и эффекторами осуществляется молекулами-медиаторами, главными из которых являются 53BP1, TopBP1, MDC1. Эти белки, локализуясь в сайтах повреждения, обеспечивают усиление сигнала от ATM/ATR и рекрутируют именно те эффекторные белки, которые нужны для конкретного типа повреждения и стадии клеточного цикла. Белок 53BP1 (p53-binding protein 1) накапливается в местах двунитевых разрывов и определяет оптимальный путь репарации (NHEJ или HR).

Белок MDC1 (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1) связывается с γ H2AX-фокусами и помогает удерживать комплекс MRN-ATM на сайте повреждения, создавая петлю положительной обратной связи для усиления сигнала. TopBP1 является главным активатором киназного комплекса ATR-ATRIP, участвует в нескольких путях репарации и в ремоделировании хроматина.

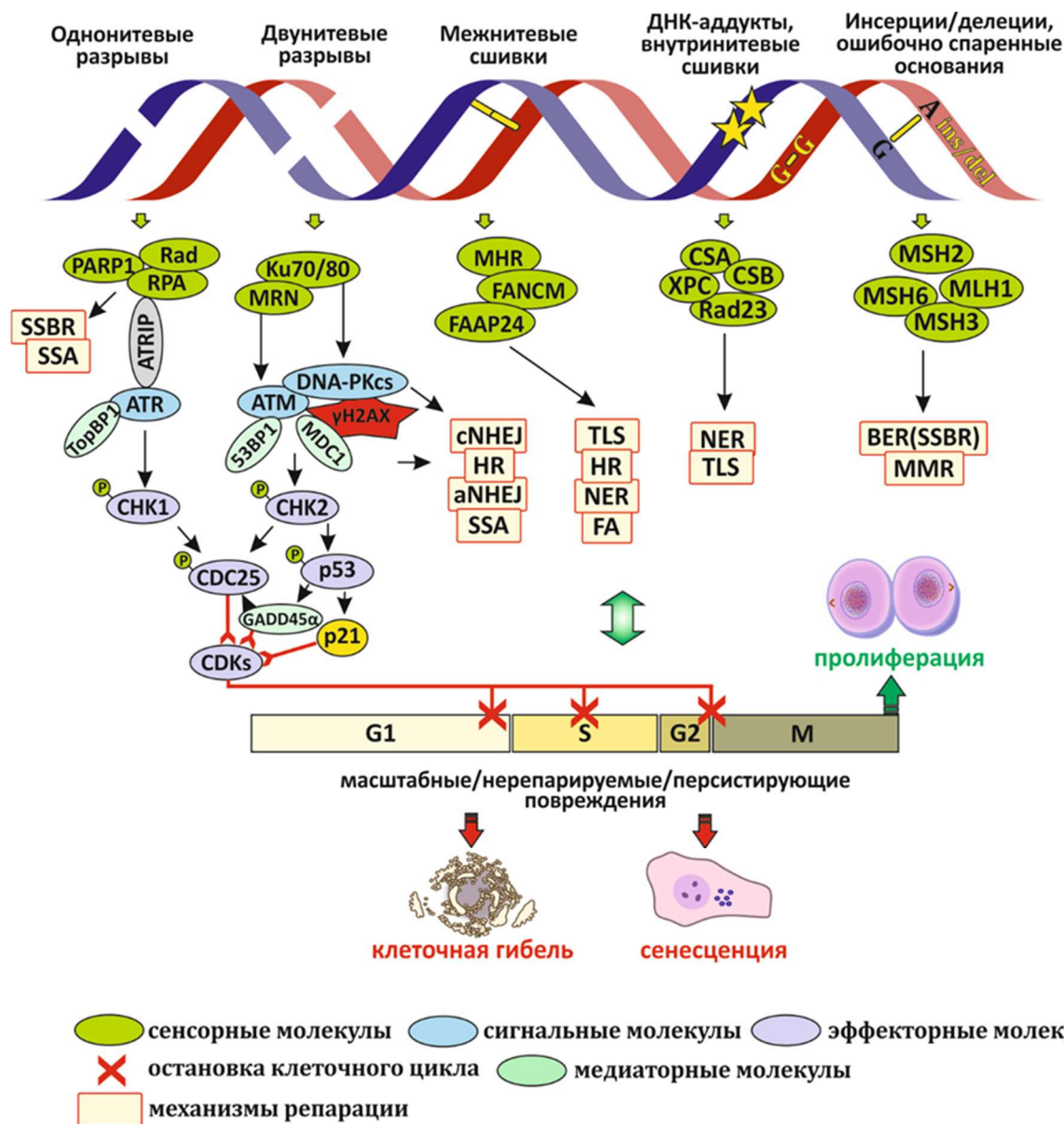


Рисунок 1.14 – Основные механизмы реализации ответа клеток на повреждение ДНК – DDR (DNA Damage Response)

Фосфорилируемые ATR и ATM киназы CHK1 и CHK2, соответственно, в свою очередь, фосфорилируют фосфатазы CDC25, участвующие в активации циклин-зависимых киназ (CDKs), что приводит к остановке клеточного цикла на стадии G₁, S или G₂/M. ATM напрямую или через активацию CHK2 также фосфорилирует белок p53, который инициирует экспрессию генов *p21^{Waf1/Cip1}* (p21) и *GADD45α* – ингибиторов циклин-зависимых киназ. Остановка клеточного цикла является необходимым этапом для проведения репарации и предотвращения фиксации возникших повреждений в мутации [106].

Основные пути репарации ДНК включают:

- Негомологичное соединение концов в каноническом (cNHEJ) или альтернативном (aNHEJ или опосредованное микрогомологией соединение концов) варианте – быстрый, но подверженный ошибкам (error-prone) путь репарации двунитевых разрывов. Активен на всех фазах клеточного цикла, главным образом в G_1 [107].

- Гомологичная рекомбинация (HR) – путь репарации двунитевых разрывов и межнитевых сшивок с высокой точностью с использованием гомологичной последовательности ДНК сестринской хроматиды в качестве шаблона. Активен только в S и G_2 фазах клеточного цикла [108].

- Отжиг одиночной цепи (Single-Strand Annealing, SSA) – неконсервативный механизм репарации двойных разрывов ДНК. Характерен для участков ДНК, состоящих из повторяющихся последовательностей нуклеотидов, которые используются в качестве матриц, по которым строится недостающая часть цепи. Путь репарации считается «экстренным», когда требуется быстрое восстановление разрыва, даже ценой частичной потери генетической информации [109].

- Транслезионный синтез (Translesion Synthesis, TLS) – также «экстренный» механизм репарации ДНК в клетках, позволяющий ей продолжить репликацию в случае присутствия на матричной цепи ДНК повреждений, приводящих к коллапсу репликативной вилки – межнитевых сшивок, фотопродуктов и объемных ДНК-аддуктов [110].

- Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER) – система репарации фотопродуктов, объемных ДНК-аддуктов, внутринитевых сшивок и сшивок ДНК-белок путем удаления протяженных фрагментов (до 1000 п.н.) [111]. Реализуется по двум путям – GG-NER (Global genome NER), при котором поиск и удаление повреждений осуществляется по всему геному, включая молчащие и некодирующие области, и TC-NER (Transcription-Coupled NER), при котором репарируются повреждения, выявляемые в ходе транскрипции.

- Репарация ошибочно спаренных оснований (MMR) – система репарации ошибочно спаренных оснований и коротких (до ~10 нуклеотидов) инсерций/делеций, выявляемых в ходе репликации и рекомбинации [112].
- Эксцизионная репарация оснований (BER) – репарация модифицированных оснований ДНК (окисленных, алкилированных, дезаминированных), АП-сайтов, а также однонитевых разрывов [113].
- Репарация однонитевых разрывов короткой «заплаткой» (патчем) (Short-patch Single-strand Break Repair, SSBR) относится к типу эксцизионной репарации, при которой удаляется короткий фрагмент с отсутствующим нуклеотидом [114].

Скоординированная работа системы DDR, включающей помимо описанных множество других медиаторных и вспомогательных белков, обеспечивает сохранность генетического материала на этапах репликации, репарации и рекомбинации ДНК, а также на контрольных точках клеточного цикла и при сегрегации хромосом. Различные системы репарации ДНК взаимодействуют таким образом, что нарушение одного пути эффективно компенсируется привлечением других путей. При их нормальном функционировании повреждения ДНК успешно обнаруживаются и устраняются с высокой точностью, а клетка возвращается к нормальному функционированию. При нерепарируемых повреждениях ДНК, в зависимости от их масштаба, персистенции и превалирующего типа, а также популяции клеток и их пролиферативного статуса, либо инициируется определенный путь клеточной гибели, что позволяет элиминировать клетки с нестабильным геномом, либо клетка переходит в состояние сенесценции и далее не пролиферирует. Если же ДНК репарируется с ошибками (прежде всего в случае «экстренной» репарации путем SSA или TLS) и клетка избегает сенесценции или гибели, ее дальнейшая пролиферация приводит к фиксации возникших повреждений ДНК в мутации.

Повреждение ДНК и клеточная гибель. Если повреждение ДНК носит масштабный характер или репарация ДНК энергетически не целесообразна, запускается каскад реакций, активирующих клеточную гибель – апоптоз и

различные виды неапоптотической гибели клеток, включающие партанатоз, аутофагию, МРТР-зависимый регулируемый некроз и некроптоз (рисунок 1.15) [77, 78].

Основным путем клеточной гибели при повреждении ДНК является **апоптоз** [115]. Аккумуляция в ядре транскрипционно-активного p53 запускает экспрессию генов белков семейства BH3-only – *BIM*, *PUMA*, *VID*, *NOXA* и др. Они, связываясь с антиапоптотическими белками группы BCL-2 (*BCL-2*, *BCL-XL*, *MCL-1* и др.), ингибируют их, тем самым высвобождая эффекторы клеточной смерти BAX и BAK (проапоптотические мультидоменные члены семейства BCL-2) [117]. Олигомеризация BAX/BAK на мембранах митохондрий высвобождает цитохром С (cyt C), который связывается с активирующим апоптотическую протеазу фактором APAF-1 и образует с ней апоптосому, которая через каспазу 9 запускает эффекторные каспазы апоптоза 3 и 7 [118].

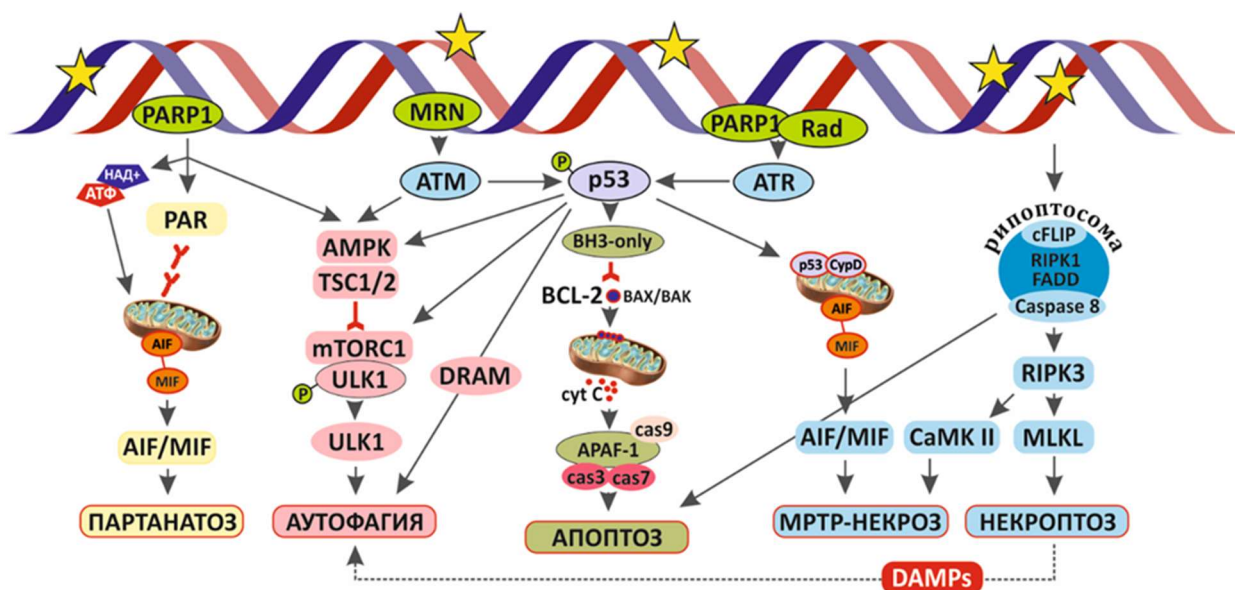


Рисунок 1.15 – Индуцируемые повреждением ДНК виды клеточной гибели и основные пути их реализации

Партанатоз является формой клеточной гибели, опосредованной гиперактивацией поли(АДФ-рибоза) полимеразы 1 (PARP1), играющей роль сенсорной молекулы повреждений ДНК и регулирующей репарацию одно- и двунитевых разрывов ДНК [119]. PARP1 использует внутриклеточный кофермент

НАД⁺ и АТФ для синтеза длинных цепочек поли(АДФ-рибозы) (РАРилирование), которые ковалентно присоединяются к белкам, включая сам фермент и белки, участвующие в репарации. Гиперактивация PАРP1 приводит к истощению внутриклеточного пула НАД⁺ и АТФ, вызывая биоэнергетический «коллапс», нарушение трансмембранного потенциала митохондрий и пермабилизацию их мембран. Избыточный синтез полимеров поли(АДФ-рибозы) РАR приводит к их транслокации в цитоплазму, проникновению в митохондрии и высвобождению из них фактора, индуцирующего апоптоз АIF (Apoptosis Inducing Factor) [119].

Последний связывается в цитоплазме с фактором ингибирования миграции макрофагов MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) и транспортирует его в ядро, где обладающий нуклеазной активностью MIF дискретно фрагментирует ДНК. Индуцируемый окислительным повреждением ДНК партанатоз рассматривается как ведущий механизм клеточной гибели нейронов при нейродегенеративных заболеваниях, нейровоспалении и ишемическом инсульте [120].

Точные механизмы, связывающие повреждение ДНК с индукцией **аутофагии**, остаются предметом активных исследований. Согласно ведущей гипотезе, ключевую роль в этом процессе играет ингибирование сигнального комплекса mTORC1 (мишень рапамицина у млекопитающих, комплекс 1) [121, 122]. В норме mTORC1 конститутивно активен и выступает главным негативным регулятором аутофагии: фосфорилируя киназный комплекс ULK1/2, он блокирует начальный этап формирования аутофагосом. Распознанное сенсорными молекулами PАРP1 и MRN повреждение ДНК через цепочку белков ингибирует mTORC1, что приводит к диссоциации от него ULK1/2-комплекса с последующей активацией им аутофагии. p53 может повышать экспрессию белков, индуцирующих аутофагию, в том числе протеинкиназы AMPK и белка DRAM (регулируемый повреждениями модулятор аутофагии). Истощение пула АТФ в результате гиперактивации PАРP1 может приводить также к активации протеинкиназы AMPK и стимуляции аутофагии [123].

В ответ на повреждение ДНК наблюдается по крайней мере два типа запрограммированного некроза – некроптоз и регулируемый некроз, зависящий от состояния транзитной поры проницаемости митохондрий (Mitochondrial Permeability Transition Pore, МРТР) [116]. Основным мультибелковым комплексом, играющим ключевую роль в индукции **некроптоза** при повреждении ДНК, называется рипоптосомой и включает в себя RIPK1, FADD, каспазу 8 и изоформу ингибитора каспаз cFLIP. В зависимости от соотношения уровней проапоптотической каспазы-8 и ее конкурентного ингибитора c-FLIP в комплексе может инициироваться: 1) некроптоз, через последовательную активацию рецептор-взаимодействующей протеинкиназы 1 (RIPK1), 3 (RIPK3) и белка MLKL; 2) МРТР-зависимый некроз через белок CaMK II; 3) апоптоз через активацию каспазы 8 [124].

Второй тип программируемого некроза, индуцируемый в ответ на повреждение ДНК – МРТР-зависимый **регулируемый некроз**. Подобно партанатозу и аутофагии, этот путь является каспаза-независимым и находится под контролем циклофилина-D (CypD) и белка p53. Ключевым событием является митохондриальная транслокация белка p53, который напрямую взаимодействует с CypD. Это взаимодействие инициирует открытие неспецифического канала во внутренней мембране митохондрий (МРТР), приводящее к резкому увеличению ее проницаемости для ионов и небольших молекул (<1,5 кДа). Выход в цитозоль апоптоз-индуцирующего фактора AIF, его ассоциация с MIF и последующий перенос образовавшегося комплекса в ядро инициируют фрагментацию хроматина [118].

В условиях генотоксического стресса возможна пластичность неапоптотических путей клеточной гибели, которые вступают между собой в сложные перекрестные взаимодействия, проявляя взаимный антагонизм или синергизм [116]. Например, некроптоз сопровождается высвобождением эндогенных молекул – молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (Damage-associated molecular patterns, DAMPs), которые стимулируют эндоцитоз и последующую аутофагию [125]. Несмотря на

бесспорную эффективность клеточной гибели как механизма элиминации клеток с поврежденным геномом, ее масштабная активация может приводить к нарушению функционального и структурного гомеостаза органов/тканей. В качестве альтернативного пути при персистирующем повреждении ДНК или его сублетальном уровне клетки могут вступить в состояние сенесценции – фенотипически измененного, но метаболически активного состояния, которое обеспечивает барьер для пролиферации клеток с поврежденной ДНК без немедленного нарушения тканевой архитектуры.

Повреждение ДНК и сенесценция. Сигнальные пути перехода в состояние сенесценции зависимы от фазы клеточного цикла, на котором клетка была остановлена в ответ на повреждение ДНК [126]. Активация киназ ATM/ATR является ранним ответом на повреждение ДНК, цель которого оперативно остановить клеточное деление (рисунок 1.16).

Через активацию киназ контрольных точек CHK1/2 киназы ATM/ATR ингибируют фосфатазы CDC25, которые, в свою очередь, инактивируют комплекс циклин-киназа E-CDK2 – ключевой регулятор перехода G_1/S . Механизм позднего ответа на повреждение ДНК включает фосфорилирование киназой ATM белка p53, который через индукцию экспрессии белка p21 также ингибирует комплексы циклин-киназа A-, D- и E-CDK2 [127]. Помимо этого, p21 посредством ингибирования комплексов D-CDK4/6 активирует белки семейства белка ретинобластомы Rb, которые подавляют зависимую от белка транскрипционного фактора E2F экспрессию генов, контролирующих переход G_1/S . Активация киназ ATM/ATR в фазе G_2 аналогично ингибирует фосфатазы CDC25, которые инактивируют комплекс циклин-киназа B-CDK1 – ключевой регулятор перехода G_2/M [126]. Белок p21 через прямое ингибирование комплекса B-CDK1 или его деградацию через активацию убиквитин-лигазного комплекса APC/C-Cdh1 также приводит к остановке перехода G_2/M . Как и в фазе G_1 , p21 активирует белки Rb, блокируя опосредованное D-CDK4/6 их фосфорилирование.

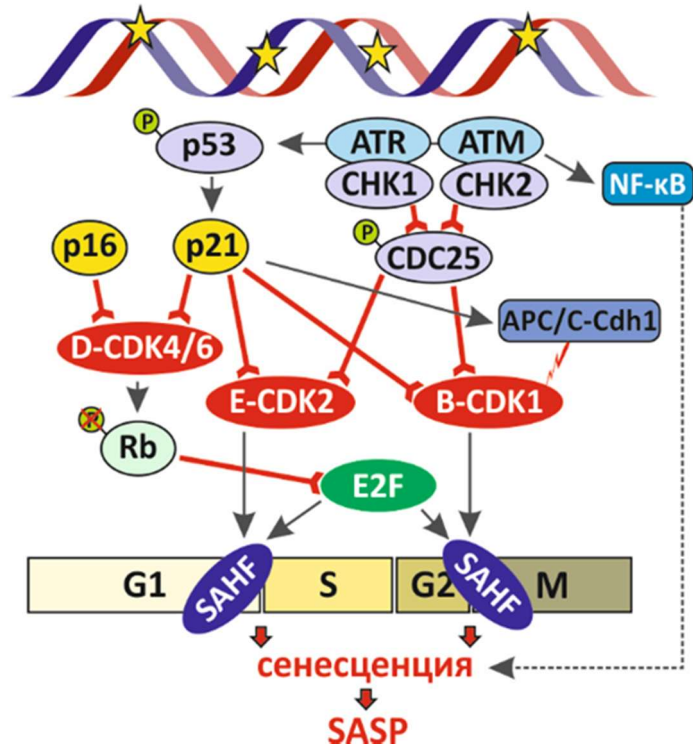


Рисунок 1.16 – Пути индукции сенесценции в ответ на повреждение ДНК

Точные механизмы выбора между гибелью клетки и переходом ее в состояние сенесценции до конца не ясны. Предполагается, что сигналом к переходу к сенесценции является длительная блокировка клеточного цикла вследствие сложно-репарируемых и/или персистирующих повреждений ДНК, ведущих к гиперэкспрессии белка p21 [127]. Опосредованное им ингибирование транскрипционного фактора E2F и формирование ассоциированных с сенесценцией гетерохроматиновых фокусов (Senescence-Associated Heterochromatin Foci, SAHF) – гетерохроматинизации и инактивации участков ДНК, кодирующих гены клеточного цикла, определяют необратимость состояния сенесценции. Последняя характеризуется также перманентной экспрессией белка $p16^{\text{Ink4A}}$ (p16), ингибирующего транскрипционный фактор E2F через активацию белков Rb. Механизмы индукции белка экспрессии p16 при повреждении ДНК не ясны, но ему отводится ключевая роль в поддержании сенесцентного фенотипа за счет усиления действия p21. Между путями индукции сенесценции p53/p21 и p16/Rb существует тесная взаимосвязь и активный перекрестный обмен сигналами, обеспечиваемый множеством механизмов [128]. Экспрессия p21 и/или p16, наряду

с активностью β -галактозидазы (β -Gal), является наиболее информативным биомаркером сенесценции. Помимо указанных путей, переход к сенесценции может быть напрямую инициирован активацией киназой ATM транскрипционного фактора NF- κ B, регулирующего экспрессию провоспалительных цитокинов, хемокинов и белков фазы острого воспаления [129].

Сенесценция вследствие генотоксического воздействия является компромиссным решением между гибелью клеток и риском пролиферации клеток с поврежденной ДНК. Важно отметить, что переход к сенесценции в ответ на повреждение ДНК может возникать не только в пролиферирующих, но и постмитотических клетках, демонстрируя универсальность механизма [130]. Сенесцентные клетки сохраняют метаболическую и в определенной степени функциональную активность, но вместе с тем характеризуются измененным, ассоциированным со старением секреторным фенотипом (Senescence Associated Secretary Phenotype, SASP), который является одним из ключевых признаков старения (hallmarks of aging) [131]. К компонентам SASP относится множество сигнальных факторов, таких как провоспалительные интерлейкины, интерфероны, хемокины, факторы роста и их модуляторы, ангиогенные факторы, ферменты, ремоделирующие матрикс, такие как матриксные металлопротеиназы [132]. Основная функция SASP – восстановление поврежденной ткани за счет привлечения клеток иммунной системы для удаления дисфункциональных клеток, стимуляции миграции и пролиферации стволовых/прогениторных клеток и ремоделирования внеклеточного матрикса [133]. Сами сенесцентные клетки, которые инициируют этот каскад, также удаляются иммунной системой, что в конечном итоге обеспечивает восстановление тканевого гомеостаза. Именно SASP играет ведущую роль в механизмах регенерации тканей после травматического повреждения и при заживлении ран [133]. Вместе с тем, являясь защитным механизмом, сенесценция имеет и обратную сторону: дисбаланс между генерацией сенесцентных клеток и их элиминацией приводит к устойчивой секреции факторов SASP и, как результат, к низкоуровневому хроническому

«стерильному» воспалению (inflammaging), выступающему драйвером патологических процессов [133, 134].

Повреждение ДНК → воспаление → повреждение ДНК: патогенетический порочный круг. Помимо секреции SASP-факторов сенесцентными клетками, генотоксический стресс может приводить к развитию воспаления посредством других механизмов. Повреждение ДНК способствует накоплению в цитоплазме клеток фрагментов ядерного хроматина, несущих маркеры повреждения (такие как γ H2AX), гибридов ДНК/РНК и однонитевой ДНК, возникающих вследствие репарации эндонуклеазами повреждений в транскрипционных R-петлях, и мтДНК, высвобождаемой из дисфункциональных митохондрий (рисунок 1.17) [5]. Такие фрагменты ДНК распознаются комплексом cGAS-STING – универсальным компонентом системы врожденного иммунитета, осуществляющим контроль на наличие в цитоплазме клеток чужеродной или собственной аномальной ДНК [135]. Белок-рецептор GMP-AMP-синтаза распознает одно- и двунитевую ДНК в цитоплазме и синтезирует вторичный мессенджер 2',3'-циклический GMP-AMP (cGAMP). Последний, связавшись с сенсорным белком STING через киназу TBK1 и факторы регуляции интерферонов 3/7 (IRF3/7), запускает экспрессию интерферонов I типа (IFN- α/β), а также других цитокинов и хемокинов посредством активации NF- κ B – ключевого регулятора экспрессии провоспалительных генов. Активация последнего происходит также киназой ATM через сигнальный путь NEMO (NF- κ B Essential Modulator) → IKK киназный комплекс, или через стабилизацию фактора транскрипции GATA4.

Примечательно, что удаление фрагментов ДНК в цитоплазме специфическими нуклеазами, такими как TREX1 (ДНКаза III), предотвращает их взаимодействие с cGAS и последующий иммунный ответ. В то же время окислительно поврежденная ДНК устойчива к деградации TREX1 и вызывает гиперактивацию cGAS-STING, играя таким образом ведущую роль в развитии хронической воспалительной реакции [136].

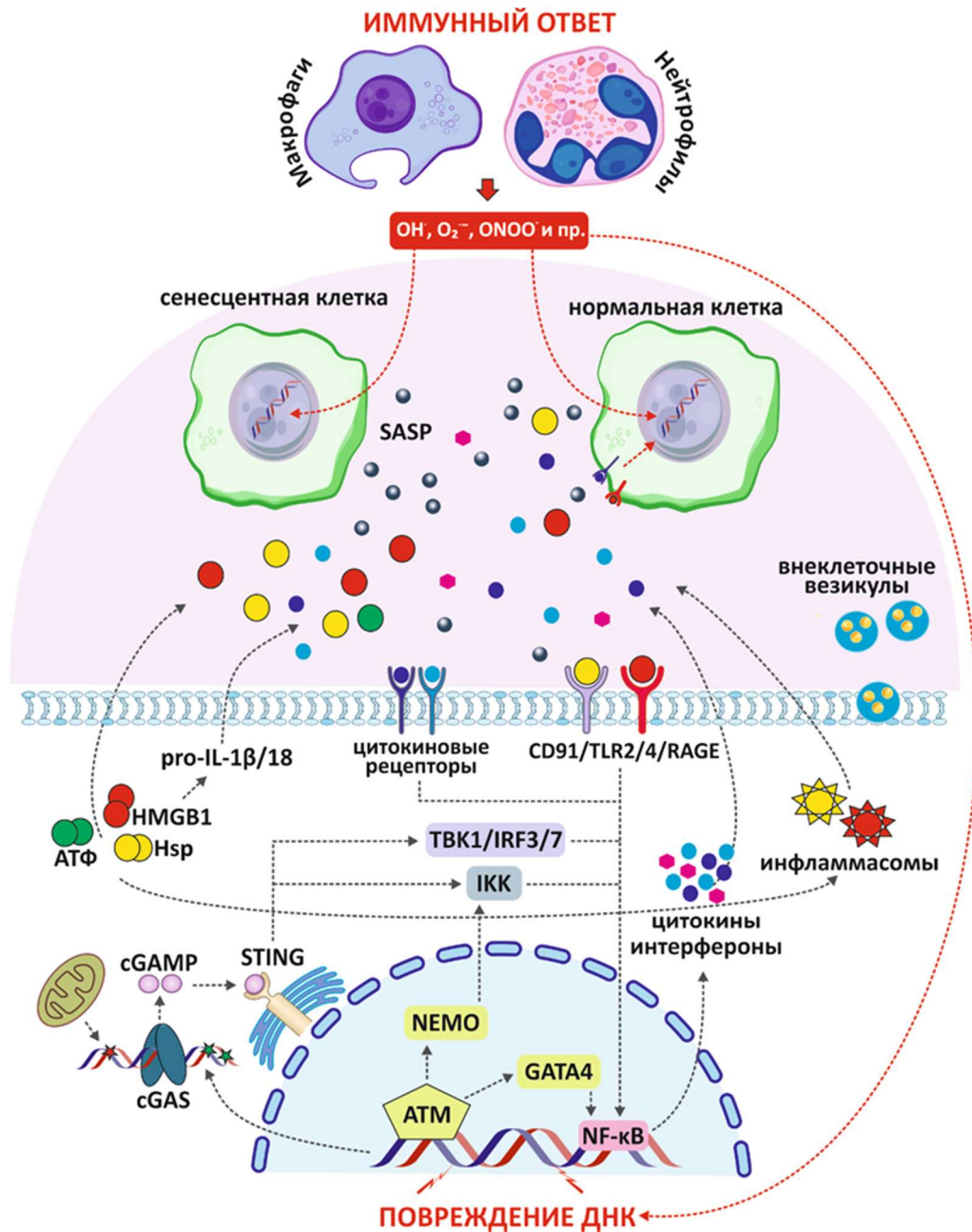
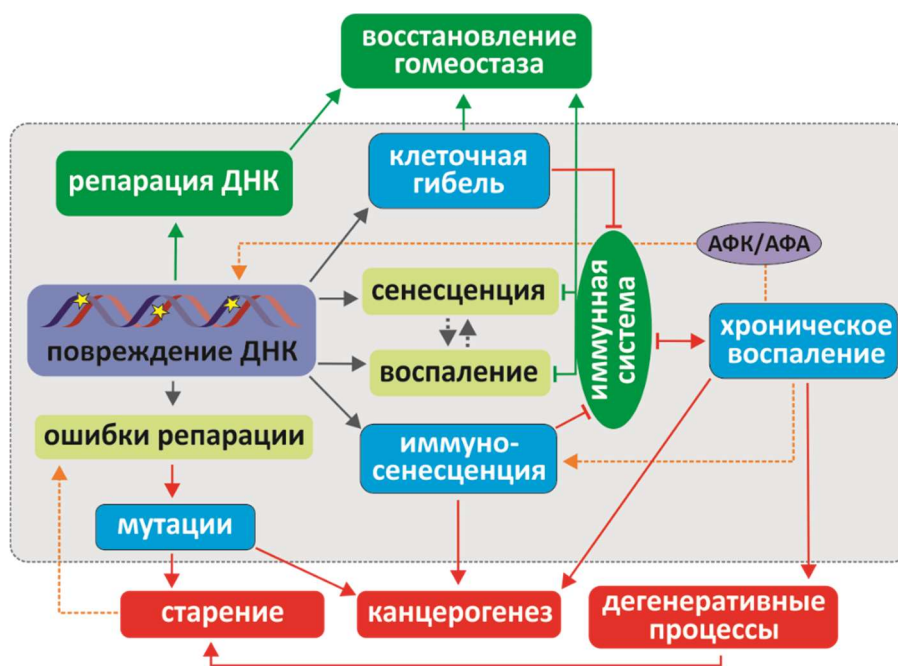


Рисунок 1.17 – Механизмы развития воспаления при генотоксическом стрессе

Повреждение ДНК вызывает высвобождение специфических молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMPs класса I), таких как белки теплового шока (Hsp), внеклеточная АТФ и фактор HMGB1, которые через различные рецепторы (TLR2/4, RAGE, CD91) усиливают экспрессию клеткой провоспалительных генов, а также активируют pro-IL-1 β /18 [5]. Нарушение структуры и функций ключевых цитоплазматических органелл, наряду с DAMPs, приводит к активации инфламмасом AIM2 и NLRP3, которые дополнительно стимулируют выработку цитокинов [137].

Секретируемые клетками с поврежденной ДНК цитокины и факторы SASP сенесцентных клеток, помимо связывания с рецепторами на поверхности самих клеток (аутокринный сигналинг), запускают каскадную активацию провоспалительных генов в соседних клетках (паракринный сигналинг), развивая таким образом локальную «стерильную» воспалительную реакцию и иммунный ответ [101, 102]. В условиях эффективной работы механизмов врожденного иммунитета воспаление успешно ликвидируется. Вместе с тем длительный генотоксический стресс и/или нарушения в иммунной системе способствуют персистенции воспалительной реакции. Гиперпродукция участвующими в иммунном ответе нейтрофилами и макрофагами АФК и АФА, а также продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) приводит к свободно-радикальному повреждению ДНК клеток в очаге воспаления и, как результат – замыканию патогенетического круга (рисунки 1.17 и 1.18) [140–142].



Примечание – Оранжевыми стрелками обозначена положительная обратная связь.

Рисунок 1.18 – Взаимосвязь между повреждением ДНК и развитием патологических состояний

Возникающее хроническое воспаление способствует патологическим изменениям в тканях и развитию и/или прогрессированию нейродегенеративных

[143, 144], сердечно-сосудистых [145], ревматологических и аутоиммунных заболеваний [146], диабета [147, 148], патологий, связанных с фибротическими изменениями [149] и метаболическими нарушениями [150, 151]. Генотоксический стресс расценивается в качестве ведущего механизма развития иммуносенесценции [152]. Связанная с ней дисфункция иммунной системы усиливает негативные эффекты генотоксического стресса [152, 153]. Истощение иммунной системы вследствие хронического воспаления также приводит к иммуносенесценции, формируя петлю положительной обратной связи [154].

Длительный генотоксический стресс может активировать системные иммунные реакции. Высвобождаемые из клеток с поврежденной ДНК или сенесцентных клеток экзосомы и микровезикулы действуют как эндокринные мессенджеры, перенося фрагменты хроматина, окисленную мтДНК, микроРНК и компоненты DAMPs в отдаленные органы/ткани и инициируя в них каскад реакций, ведущих к воспалению [155]. Циркулирующие воспалительные цитокины, такие как IL-6, IFN- β и TNF- α , способны преодолевать тканевые барьеры, в том числе гематоэнцефалический барьер, усиливая воспаление [156]. Способность тканей к регенерации снижается под воздействием внеклеточных везикул, которые нарушают функцию стволовых и прогениторных клеток, как показано, например, для костного мозга и скелетных мышц [157].

Истощение пула стволовых клеток вследствие индуцируемого повреждением ДНК хронического воспаления является одним из инициаторов преждевременного старения [158, 159]. Возрастное снижение ДНК-репаративной активности в клетках приводит к увеличению темпов возникновения мутаций, что усиливает старение, демонстрируя еще один патогенетический круг [160]. Повреждение ДНК и репарация сегодня определены как перспективные фармакологические мишени предупреждения преждевременного старения и связанных с ним патологий [161].

Повреждение ДНК, выступая инициатором канцерогенеза за счет индукций мутаций, в условиях персистенции через механизмы хронического воспаления способно выступать его промотором [162, 163]. Воспалительная микросреда, содержащая высокий уровень цитокинов, факторов роста и хемокинов, создает

селективное давление, способствующее выживанию и пролиферации несущих драйверные мутации инициированных клеток и, как результат, экспансии предзлокачественных клонов [164, 165]. Хроническое воспаление способствует формированию иммуносупрессивного микроокружения, приводя к уклонению трансформированных клеток от иммунного надзора [165]. Ключевые провоспалительные цитокины (VEGF, TNF- α , IL-1 β) выступают в роли мощных индукторов ангиогенеза, стимулируя образование новой сосудистой сети, обеспечивающей рост опухоли и ее инвазию [141]. Концепция канцерогенеза сегодня эволюционирует от простой модели линейной аккумуляции мутаций в комплексную, в которой ведущую роль играют состояние тканевой микросреды и внешние селективные воздействия, включая генотоксические, способствующие переводу латентного мутационного ландшафта в злокачественный фенотип [166, 167].

Таким образом, в ответ на генотоксическое воздействие в клетках активируется комплексная система поддержания геномной стабильности путем обеспечения динамического равновесия между тесно взаимосвязанными процессами – репарацией повреждений ДНК, пролиферативным арестом, элиминацией поврежденных клеток посредством индукции гибели и, в случае неполноценного устранения повреждений ДНК, допущением возникновения мутаций. Эта система обладает значительным буферным потенциалом в условиях небольших и умеренных генотоксических воздействий. Вместе с тем превышение адаптивного порога, когда интенсивность и/или продолжительность генотоксического стресса преодолевает все компенсаторные возможности, приводит к дестабилизации системы, что в конечном итоге может манифестировать запуском каскада реакций, приводящих к развитию хронического воспаления и, как следствие, патологических состояний, таких как онкологические и дегенеративные заболевания или преждевременное старение (рисунок 1.18). Традиционный взгляд на повреждение ДНК как на локализованное, присущее отдельной клетке(ам) событие, ведущее к возникновению мутаций, сегодня уступает место более широкой парадигме, в которой генотоксический

стресс рассматривается как инициатор (триггер) и проводник системной передачи сигналов, приводящих к нарушениям функционирования организма на различных уровнях его организации [5]. Понимание этого актуализирует главную стратегическую задачу генетической токсикологии – разработку и реализацию комплексных мер, направленных на предупреждение или минимизацию генотоксического воздействия на организм человека.

1.4 Источники генотоксических воздействий

Современный человек проживает в условиях генотоксической нагрузки, формируемой совокупным воздействием экзогенных и эндогенных генотоксикантов различной природы.

Экзогенные источники. Многочисленные исследования, проведенные на различных биологических моделях, продемонстрировали генотоксический потенциал таких физических факторов как ультрафиолетовое и ионизирующие излучения. Их способность индуцировать повреждения ДНК, включая образование пиримидиновых димеров (ультрафиолетовое) и двунитевых разрывов ДНК (ионизирующие излучения), считается классическим и давно установленным научным фактом. Значительно бóльшим многообразием и количеством характеризуются генотоксичные химические агенты природного и синтетического (антропогенного) происхождения.

Растения и грибы являются природным источником большого количества химических соединений с различными видами биологической активности, в том числе генотоксической и канцерогенной [168]. Ярким примером служит аристолохиевая кислота – генотоксичный канцероген, содержащийся в растениях рода кирказон (*Aristolochia*), которые до сих пор применяются в традиционной китайской медицине для лечения артрита, кожных заболеваний и в качестве мочегонного средства. Сегодня применение кирказона запрещено в большинстве стран мира, в том числе и в России, ввиду его нефротоксичности и высокого риска развития карцином органов мочевыделительной системы [169]. В таблице 1.3 представлены наиболее изученные группы генотоксикантов из растений и грибов

и сведения о их канцерогенной активности. Для ряда других групп природных соединений, в частности, кумаринов, аллилизотиоцианатов, антрахинонов и некоторых флавоноидов, получены противоречивые или неопределенные данные, не позволяющие сделать однозначное заключение об их генотоксической активности [168].

Таблица 1.3 – Группы генотоксических соединений, продуцируемых растениями и грибами

Группа соединений	Природный источник	Типичный представитель	Канцерогенность
Аristoloxиевые кислоты	Растения семейства Кирказоновые (<i>Aristolochiaceae</i>)	Аristoloxиевая кислота из кирказона ломоносовидного (<i>Aristolochia clematitis</i>)	Группа 1 МАИР (карцинома почки, верхних мочевыводящих путей и мочевого пузыря)
Гликозиды	Растения семейств Деннштедтиевые (<i>Dennstaedtiaceae</i>) и Саговниковые (<i>Cycadaceae</i>)	Птаквилозид из орляка обыкновенного (<i>Pteridium aquilinum</i>)	Группа 2В МАИР (риск развития рака желудка и пищевода)
Пирролизидиновые алкалоиды	Растения семейств Астровые (<i>Asteraceae</i>), Бобовые (<i>Fabaceae</i>), Бурачниковые (<i>Boraginaceae</i>)	Симфитин из окопника лекарственного (<i>Symphytum officinale</i>)	Группа 2В МАИР (риск развития гепатоцеллюлярной карциномы и гемангиосаркомы печени)
Алкалоиды с антимитотической активностью	Растения семейств Кутровые (<i>Arcunaceae</i>), Лилейные (<i>Liliaceae</i>), Тисовые (<i>Taxaceae</i>)	Винкрестин/винбластин из барвинка розового (<i>Catharanthus roseus</i>)	Группа 3 МАИР
Пропенилбензолы (фенилпропаноиды)	Растения семейств Лавровые (<i>Laugaceae</i>), Аирные (<i>Ascoraceae</i>), Мускатниковые (<i>Myristicaceae</i>)	Сафрол из сассафраса лекарственного (<i>Sassafras officinalis</i>)	Группа 2В МАИР (риск развития гепатоцеллюлярной карциномы)
Псоралены	Растения семейств Зонтичные (<i>Ariaceae</i>) и Рутовые (<i>Rutaceae</i>)	8-метоксипсорален из амми большой (<i>Ammi majus</i>)	Группа 1 МАИР (в сочетании с УФ-излучением – плоскоклеточный рак кожи)
Гидразины	Грибы ложный сморчок (<i>Gyromitra esculenta</i>), шампиньон двуспоровый (<i>Agaricus bisporus</i>), шиитаке (<i>Lentinula edodes</i>)	Агаритин из шампиньона двуспорового (<i>Agaricus bisporus</i>)	Группа 3 МАИР

Важно отметить, что сегодня наблюдается широкое и бесконтрольное «увлечение» биологически активными добавками из растений и грибов на фоне отсутствия системных исследований их безопасности, в том числе генотоксической, что создает потенциальные риски для здоровья. В 2019 г. был создан Консорциум по безопасности растительной продукции (The Botanical Safety Consortium, BSC), объединивший специалистов академических институтов, представителей индустрии и регуляторных органов [170].

Целью Консорциума определена разработка стратегии и единых стандартов оценки безопасности пищевой и фармацевтической растительной продукции на основе новых методологических подходов (New Approach Methodologies, NAMs), включая методы высокопроизводительного скрининга. Недавно рабочей группой по генотоксичности предложена стратегия, предусматривающая первоначальную оценку генотоксической активности растительных компонентов на основе *in silico* подходов, теста Эймса, *in vitro* микроядерного теста и скрининговой репортерной *in vitro* системы ToxTracker и последующее углубленное исследование образцов, которые продемонстрируют генотоксический эффект [171].

Пища является потенциальным источником генотоксикантов, которые образуются из компонентов пищевого сырья в ходе его обработки, либо присутствуют в виде контаминантов, переходящих из сырья [172]. При обработке пищевых продуктов, особенно в ходе термической, между компонентами пищи могут протекать реакции, приводящие к образованию генотоксичных полициклических ароматических углеводородов, *N*-нитропроизводных, аминимидазоазаренов, гетероциклических ароматических аминов, продуктов пиролиза аминокислот или белков [173].

В растительном и животном пищевом сельскохозяйственном сырье накапливается значительное количество неорганических соединений, включая соединения тяжелых металлов, генотоксичность которых всесторонне изучена [174]. Широкое применение пестицидов в сельском хозяйстве и их высокая вероятность попадания в пищевое сырье делают их одной из ключевых групп генотоксических контаминантов пищи [175]. Хотя в последнее десятилетие

наблюдается переход на более безопасные карбаматные и пиретроидные пестициды, генотоксичные пестициды предыдущих поколений до сих пор используются и за многие годы применения аккумулировались в больших количествах в экосистемах [176].

Заражение пищевого сырья плесневыми грибами может приводить к контаминации его генотоксичными митотоксинами, наиболее известным из которых является канцероген афлатоксин В₁, продуцируемый поражающими пищевое сырье грибами рода *Aspergillus* [177]. Он в 6,4 раза увеличивает риск развития гепатоцеллюлярной карциномы, а при воздействии на фоне вирусного гепатита В – в 73 раза.

В современной пищевой промышленности для улучшения потребительских качеств продуктов применяется около 500 различных пищевых добавок (консерванты, красители, ароматизаторы, усилители вкуса, подсластители, загустители). Для некоторых из них продемонстрирована генотоксическая активность, а также синергизм эффектов при комбинированном использовании [178, 179].

Источником генотоксикантов являются вредные привычки, в первую очередь курение табака. В составе табачного дыма содержатся полициклические ароматические углеводороды, *N*-нитрозоамины, гетероциклические ароматические амины и альдегиды, обладающие выраженной генотоксической и канцерогенной активностями [180]. Бетель, жевательная смесь, получаемая из орехов пальмы арека (*Areca catechu*) и широко используемая жителями Южной и Юго-Восточной Азии для возбуждения нервной системы, содержит обладающий генотоксичностью алкалоид ареколин [181]. Жевание бетеля связано с риском развития опухолей полости рта и пищевода (Группа 1 МАИР). Хроническое потребление алкоголя вызывает повреждение ДНК и ассоциируется с риском развития нейродегенеративных заболеваний и опухолей желудочно-кишечного тракта [182].

Таблица 1.4 – Генотоксиканты в пище и их происхождение

Группа соединений	Основные представители	Источник
N-нитрозо-производные	N-нитрозодиметиламин N-нитрозопиперидин N-нитрозопирролидин	Сыр и мясо, обработанные нитратами и нитритами, копченое и вяленое мясо, бекон
Полициклические ароматические углеводороды	Бенз(а)антрацен Бенз(а)пирен Бензо(g,h,i)перилен	Мясо и рыба, приготовленные на углях
Гетероциклические ароматические амины	3-амино-1,4-диметил-5Н-пиридо[4,3-b]-индол (Trp-P-1) 3-амино-1-метил-5Н-пиридо[4,3-b]-индол (Trp-P-2) 2-амино-3,4-диметил-имидазо[4,5-f]-хинолин (4-MeIQ) 2-амино-3,8-диметил-имидазо[4,5-f]-хиноксалин (8-MeIQx) 2-амино-1-метил-6-фенилимидазо[4,5-b]-пиридин (PhIP)	Мясо и рыба, приготовленные на гриле и на углях
Тяжелые металлы	Кобальт, кадмий, цинк, ртуть, никель, хром	Накопление в растениях, рыбе и тканях животных
Пестициды	Хлорпирифос, ДДТ, беномил, диметоат, гексахлорбензол	Остаточные количества в сельхозпродукции, накопление в растениях, рыбе и тканях животных
Микотоксины	Афлатоксины В ₁ , В ₂ , G ₁ , G ₂	Заражение кукурузы, злаков, арахиса, фисташек, миндаля, инжира грибами рода <i>Aspergillus</i>
	Охратоксины	Заражение сушеных фруктов, винограда, кофе, какао, сыров грибами рода <i>Aspergillus</i> и <i>Penicillium</i>
	Фумонизины В ₁ , В ₂ , В ₃	Заражение кукурузы, сорго и спаржи грибами рода <i>Fusarium</i>
	Зеараленон	Заражение кукурузы, пшеницы и ячменя грибами рода <i>Fusarium</i>
	Патулин	Заражение яблок и сырья из них грибами рода <i>Penicillium</i>
Пищевые добавки	Бромат калия (E924a), тиабендазол (E233), бутилгидрокситолуол (E321)	Пищевая промышленность

Загрязнители окружающей среды являются наиболее масштабной по своему распространению категорией генотоксичных агентов, воздействию которых подвергаются значительные контингенты лиц, в том числе на вредных производствах [183] (таблица 1.5). Нанотехнологии, широко используемые в последнее десятилетие в медицине и промышленности, стали новым и малоизученным источником потенциально опасных для здоровья загрязнителей окружающей среды [184]. Хотя сведения о токсических эффектах наноматериалов

пока фрагментарны и разрознены, накопленный экспериментальный материал, включая данные исследований *in vivo*, свидетельствует об их высоком генотоксическом потенциале, связанном в первую очередь с индукцией окислительного стресса [28, 185]. Следует отметить, что сегодня одним из основных направлений совершенствования методологии оценки генотоксичности является ее адаптация для тестирования наноматериалов [28].

Таблица 1.5 – Генотоксичные загрязнители в окружающей среде и на производствах

Загрязнители	Основные источники	Путь поступления в организм человека
Полициклические ароматические углеводороды	Выхлопные газы автомобилей (особенно дизельных), выбросы промышленных предприятий, коксохимические производства, угольные ТЭЦ, природные пожары	Атмосферный воздух
Ароматические амины и нитрозосоединения	Производство красителей, пестицидов, пластмасс, резины, переработка нефти и нефтепродуктов	Атмосферный воздух, вода, пища
Тяжелые металлы	Промышленные стоки, горнодобывающая промышленность, угольные ТЭЦ, автомобильные выхлопы	Атмосферный воздух, вода, пища
Диоксины и диоксиноподобные соединения	Сжигание мусора, химическое производство, металлургическая промышленность, деревообрабатывающая и целлюлозно-бумажная промышленность	Атмосферный воздух, вода, пища
Тонкодисперсные частицы (PM ₁ , PM _{2.5} и PM ₁₀)	Выхлопные газы автомобилей, выбросы промышленных предприятий, угледобывающая промышленность, сжигание мусора, природные пожары	Атмосферный воздух
Пестициды	Аграрная промышленность	Вода, пища
Лекарственные средства (цитостатики)	Производство и медицинское применение	Вода, пища
Наноматериалы	Химическая, текстильная и полупроводниковая промышленность, строительство, медицина и фармацевтика	Атмосферный воздух, вода, пища
Формальдегид	Производство мебели, смол, клеев, сжигание мусора, деревообрабатывающая и целлюлозно-бумажная промышленность, лаборатории	Атмосферный воздух
Мышьяк	Стекловаренное и химическое производство	Атмосферный воздух, вода, пища
Стирен	Производство стирола, производство полистиролов, производство пластиковой и резиновой продукции	Атмосферный воздух, вода, пища
Толуол	Переработка нефти и нефтепродуктов	Атмосферный воздух, вода, пища
Асбестовые волокна	Асбест-добывающие и другие производства	Атмосферный воздух
Радиоактивные изотопы	Аварии на АЭС, ядерные испытания, отходы атомной промышленности, медицинская диагностика	Атмосферный воздух, вода, пища

Лекарственные средства, в отличие от других ксенобиотиков, представляют собой категорию химических соединений, целенаправленно и контролируемо применяемых человеком. Обязательность их всесторонней доклинической оценки, включающей стандартизированное тестирование на генотоксичность, минимизирует вероятность попадания в практику потенциально опасных лекарственных средств. Вместе с тем по данным на 2009 г. из 838 лекарственных средств, предназначенных к длительному применению, 24,8% протестированы на генотоксичность и/или канцерогенность в соответствии с современными требованиями, 31,5% с отклонениями от них, а 43,7% средств не исследованы вовсе [186]. При этом для 8,8% протестированных лекарственных средств установлена генотоксичность и канцерогенность. Сведения о генотоксичных лекарственных средствах различных групп представлены в ряде обзоров и обобщены в недавней монографии [3].

Механизмы эндогенной генотоксичности. Возбудители инфекционных и паразитарных заболеваний относятся к биологическим источникам генотоксического воздействия экзогенной природы, однако логично рассмотреть их в контексте эндогенной генотоксичности, которая реализуется по различным механизмам в процессе взаимодействия «патоген – хозяин».

Способность вирусов вызывать хромосомные aberrации в инфицируемых клетках впервые была установлена еще в 60-х годах прошлого столетия [187]. Достижения в области молекулярной биологии и вирусологии показали, что индукция вирусами генетической нестабильности в клетках реализуется по нескольким взаимосвязанным механизмам [188]. Окислительное повреждение ДНК под действием ранних белков вирусов приводит к активации процессов репарации, в частности репарации негомологичным соединением концов (NHEJ), что эффективно используется вирусом для интеграции своей ДНК в геном «хозяина» [189]. Гиперэкспрессия поздних белков вирусов приводит к деградации белков p53, NFX1, pRB и класпина, способствуя геномной нестабильности, ингибированию клеточной гибели и неконтролируемой пролиферации клеток [190]. Окислительное повреждение ДНК, подавление системы антиоксидантной

системы и модуляция сигнального пути cGAS-STING в инфицированных клетках приводит к их сенесценции и активации хронического воспаления, тем самым создавая среду для дальнейшей репликации вируса [191, 192]. Например, цитомегаловирус использует сенесценцию для перехода в латентное состояние, что позволяет избежать обнаружение инфицированных клеток иммунной системой и обеспечивает возможность реактивации вируса при снижении иммунитета [193]. Вирус SARS-CoV-2 (COVID-19) индуцирует повреждения ДНК за счет деградации киназы CHK1 и ингибирования медиаторной молекулы DDR – белка 53BP1, что приводит к активации провоспалительных генов и сенесценции инфицированных клеток [194]. Многие вирусы целенаправленно модулируют систему DDR, превращая ее в инструмент для усиления собственной репликации, предотвращения клеточной гибели, уклонения от иммунного надзора и обеспечения персистенции [195].

Окислительное повреждение ДНК вследствие хронического воспаления и вирусная онкогенная трансформация рассматриваются как ведущие механизмы канцерогенеза при персистирующих вирусных инфекциях (вирусы гепатитов В и С, папилломы человека, Эпштейна-Барр и др.), риск которого многократно возрастает на фоне экзогенных генотоксических воздействий [188, 196, 197]. Экскретируемые инфицированными клетками вирусные белки (например, белки ВИЧ Tat и Vpr) способны напрямую или опосредованно через индукцию окислительного стресса повреждать ДНК в нецелевых для вируса клетках организма, в особенности в клетках иммунной системы, способствуя таким образом подавлению иммунитета, в том числе противоопухолевого [188].

К генотоксическому стрессу вследствие хронического воспаления приводят бактериальные и паразитарные инфекции [198, 199]. Распознавание мембранными и цитоплазматическими рецепторами распознавания паттернов (Pattern Recognition Receptors, PRR) клеток иммунной системы патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMPs) запускает каскад внутриклеточных сигналов, приводящий к активации транскрипционных факторов NF-κB и AP-1, экспрессии провоспалительных медиаторов и развитию воспаления. Рекрутируемые к месту

воспаления макрофаги и нейтрофилы инактивируют патогены путем фагоцитоза и «респираторного взрыва» с генерацией АФК и АФА [200]. Персистенция патогена, неэффективный/незавершенный фагоцитоз или нескомпенсированная продукция АФК и АФА приводят к хронизации воспаления с развитием окислительного стресса и, как следствие, повреждением ДНК [201]. Так, хроническое инфицирование бактерией *Helicobacter pylori* вызывает развитие атрофического гастрита и язвенной болезни, переходящих в аденокарциному желудка в результате нарушения гомеостаза слизистой оболочки желудка, подавления защитных функций клеток и индукции нестабильности их генома [202]. Примерами паразитарных заболеваний, сопровождающихся повреждением ДНК и геномной нестабильностью клеток организма «хозяина», являются шистосоматоз (трематоды рода *Schistosoma*), ассоциированный с развитием карциномы мочевого пузыря, а также описторхоз (трематода *Opisthorchis viverrini*) и клонорхоз (трематода *Clonorchis sinensis*), ассоциированные с развитием холангиоцеллюлярной карциномы [203]. Повреждение ДНК выявлено при инвазиях свиным и бычьим цепнями, эхинококком, печеночным сосальщиком, круглыми червями рода *Strongyloides* и др. [203, 204].

Помимо опосредованного хроническим воспалением повреждения ДНК генотоксичность при инфицировании бактериями может быть вызвана их токсинами [199]. На сегодня идентифицировано три бактериальных токсина, способных прямо повреждать ДНК клеток «хозяина»: продуцируемый штаммами *Escherichia coli* филогенетической группы В2 и другими бактериями семейства Enterobacteriaceae колибактин (colibactin) – поликетидный пептид, алкилирующий основания ДНК и вызывающий межнитевые сшивки; продуцируемый рядом грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Haemophilus ducreyi*, *Shigella dysenteriae* и др.) цитолетальный раздувающий токсин (Cytolethal Distending Toxin, CDT) – АВ-токсин с ДНКазной активностью, индуцирующий двунитевые разрывы в ДНК; продуцируемый *Salmonella enterica serovar typhi* тифоидный токсин (typhoid toxin) – уникальный А2В5-токсин, также обладающий ДНКазной активностью [199, 205]. Преобладание в микробиоте кишечника

штаммов *Escherichia coli*, несущих кластер генов колибактина (pks^+), ассоциировано с высоким риском развития колоректального рака, в том числе в молодом возрасте [206]. Инфицирование мочеполовой системы *Escherichia coli* pks^+ способствует развитию рака предстательной железы и мочевого пузыря [206].

Увеличение маркеров генотоксичности выявлено при сердечно-сосудистых (атеросклероз, инфаркт миокарда, гипертензия, кардиомиопатии, аритмии и др.) [207], нейродегенеративных (болезни Альцгеймера и Паркинсона) [208], цереброваскулярных (ишемический инсульт) [22] и аутоиммунных [209] заболеваниях, глазных болезнях (диабетическая ретинопатия, глаукома, макулодистрофия) [210], метаболическом синдроме [211], сахарном диабете [76, 212], хронической обструктивной болезни легких [213], депрессии и биполярном расстройстве [214, 215]. В основе наблюдаемой при этих заболеваниях эндогенной генотоксичности лежит повреждение ДНК вследствие окислительного стресса, пути развития которого специфичны для каждого из заболеваний. Развитие системного окислительного стресса установлено при системной красной волчанке, травматических поражениях, в частности при тяжелой сочетанной травме, сахарном диабете, предположительно при патологиях беременности и т.д. Роль возникающих повреждений ДНК в их патогенезе до конца не ясна, однако на сегодня уже очевидно, что они могут запускать процессы (возникновение мутаций, сенесценцию, воспаление, клеточную гибель), приводящие к усугублению первичного патологического состояния и, как результат, к прогрессированию и хронизации заболевания. Следует ожидать, что по мере накопления экспериментальных данных этот список будет пополняться заболеваниями, в этиологии и/или патогенезе которых лежат хронические воспалительные процессы [215, 216].

Резюмируя, можно констатировать, что ключевыми молекулами, обуславливающими эндогенную генотоксичность, являются продуцируемые клетками организма высокореакционные АФК/АФА. В условиях нормального функционирования клеток и тканей они участвуют в меж- и внутриклеточной сигнализации, компенсаторно-адаптационных реакциях на стрессорные

воздействия и механизмах иммунного ответа на воспаление и различные патогены [200]. Гиперпродукция АФК/АФА вследствие нарушения баланса между их образованием и детоксикацией приводит к окислительному стрессу, с последующим повреждением всех клеточных макромолекул, включая ДНК [218]. Важно отметить, что генотоксический потенциал ряда экзогенных генотоксикантов, таких как тонкодисперсные частицы и наноматериалы, также опосредован окислительным повреждением ДНК в результате индукции воспалительных процессов в тканях-мишенях воздействия.

Таким образом, источники генотоксических воздействий на организм человека многочисленны и разнообразны. Большинство генотоксикантов распространены и поступают в организм человека в количествах значительно меньших тех, в которых они демонстрируют генотоксичность в экспериментальных условиях. Однако необходимо учитывать два важных момента: 1) вопрос о пороговости/беспороговости действия генотоксикантов остается экспериментально неразрешенным и дискуссионным, следовательно на текущий момент генотоксическое воздействие любого уровня следует рассматривать как потенциально негативное; 2) человек может одновременно подвергаться сочетанному воздействию нескольких генотоксических факторов, зачастую хроническому и на фоне эндогенной генотоксичности, и их аддитивный, а в ряде случаев и синергетический эффект, представляют реальную генотоксическую угрозу. Указанное определяет необходимость выявления потенциальных генотоксикантов с целью исключения контакта с ними человека, что и определено главной прикладной задачей генотоксикологии, решение которой обеспечивается разработкой и совершенствованием соответствующей методической и методологической базы.

1.5 Оценка генотоксичности как элемент исследования безопасности лекарственных средств и других химических веществ

Основные современные принципы тестирования на генотоксичность были обобщены в 2019 г. на 47-м ежегодном собрании Европейского общества по

исследованию мутагенеза и геномики в рамках семинара «*Стратегии в генотоксикологии: принятие инновационных научных методов в нормативном контексте: сильные и слабые стороны с точки зрения регулирования в промышленной перспективе*» [11]. Они констатируют, что глубина и объем тестирования должны определяться степенью воздействия вещества на человека, максимум информации должен добываться минимальными затратами труда и животных, а полное тестирование генотоксичности должно охватывать три генотоксические конечные точки (end-points): генные мутации (мутагенность), структурные (кластогенность) и количественные (анеуплоидия) хромосомные нарушения и первичные повреждения ДНК, что предусматривает комплексное использование тестов.

Развитие генетической токсикологии способствовало разработке, апробации и внедрению в практику более 200 методов и тест-систем для экспериментального выявления различных категорий генотоксических событий. Из множества разработанных тестов на генотоксичность в целях регуляторной оценки используются тесты, валидированные в масштабных исследованиях и многолетней практикой применения, список и методические указания по проведению которых утверждаются и периодически пересматриваются профильной комиссией ОЭСР (Организация экономического сотрудничества и развития, Organization for Economic Co-operation and Development, OECD) (таблица 1.6).

Для различных классов химических соединений, таких как лекарственные средства, пестициды, пищевые добавки, бытовая химия, косметические средства, многотоннажные промышленные химические реагенты и т.д. используются различные наборы (батареи) тестов. Они не имеют принципиальных различий и в зависимости от класса исследуемых соединений включают два или три этапа. На первом этапе тестирования используются методы учета генных мутаций у бактерий и/или в клетках млекопитающих *in vitro* и цитогенетических нарушений *in vitro*. Второй этап тестирования включает анализ цитогенетической активности *in vivo*. В случае отсутствия генотоксичности в клетках костного мозга млекопитающих *in vivo* рекомендована оценка генотоксичности во вторичных тканях, в том числе с

использованием методов анализа повреждений ДНК. На третьем этапе проводится оценка генотоксичности в половых клетках.

Таблица 1.6 – Список методических указаний ОЭСР по проведению тестов для оценки генотоксичности химических соединений

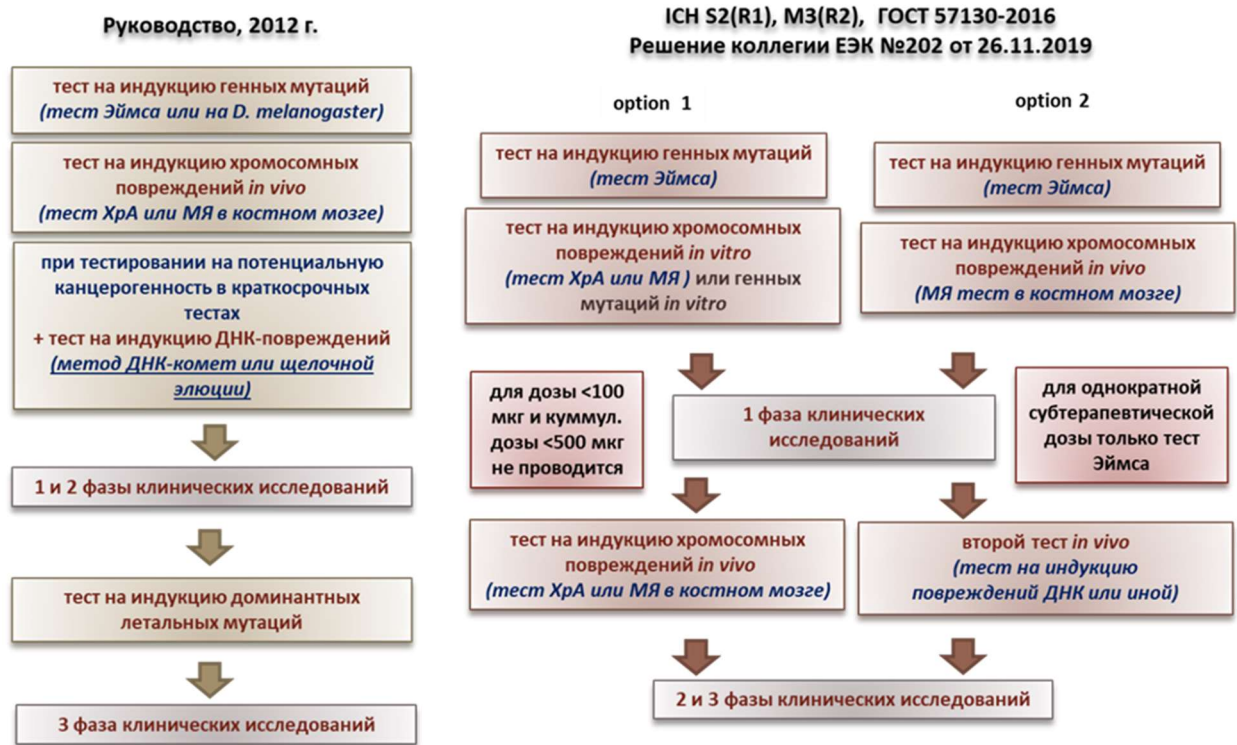
Номер (TG)	Тест	Утверждены	Пересмотрены	Отменены
Действующие методические указания				
471	Учет обратных генных мутаций у бактерий (тест Эймса)	1983	1997, 2020	
473	Тест на индукцию хромосомных aberrаций <i>in vitro</i>	1983	1997, 2016	
474	Микроядерный тест в эритроцитах млекопитающих <i>in vivo</i>	1983	1997, 2016	
475	Тест на индукцию хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих <i>in vivo</i>	1984	1997, 2016	
476	Тест на индукцию генных мутаций в клетках млекопитающих <i>in vitro</i> *	1984	1997, 2016	
487	Микроядерный тест в клетках млекопитающих <i>in vitro</i>	2010	2016, 2023	
478	Тест на индукцию доминантных летальных мутаций у грызунов	1984	2016	
483	Тест на индукцию хромосомных aberrаций в клетках сперматогоний млекопитающих	1997	2016	
488	Тест на индукцию мутаций в соматических и половых клетках трансгенных животных	2011	2013, 2020, 2025	
489	Тест ДНК-комет в клетках млекопитающих <i>in vivo</i>	2014	2016	
490	Тест на индукцию мутаций в гене тимидинкиназы в клетках млекопитающих <i>in vitro</i>	1984	1997, 2016	
470	Тест на индукцию мутаций в гене Pig-a в эритроцитах млекопитающих	2022	2025	
486	Тест на внеплановый синтез ДНК в клетках печени млекопитающих <i>in vivo</i>	1997	-	
485	Тест на наследуемые транслокации у мышей	1986	-	
Архивные/утратившие силу методические указания				
472	Учет обратных генных мутаций у <i>Escherichia coli</i>	1983		1997
477	Учет рецессивных, сцепленных с полом, летальных мутаций у <i>Drosophila melanogaster</i>	1984		2014
479	Тест на индукцию сестринских хроматидных обменов (СХО) в клетках млекопитающих <i>in vitro</i>	1986		2014
480	Тест на индукцию генных мутаций у <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1986		2014
481	Тест на индукцию митотической рекомбинации у <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1986		2014
482	Тест на внеплановый синтез ДНК в клетках млекопитающих <i>in vitro</i>	1986		2014
484	Тест на мутации в специфических локусах мышей	1986		2014
485	Спот-тест на мышцах	1986		2014

* – после пересмотра TG476 включает только тест по учету генных мутаций в локусах *hprt* или *xprt*.

Стратегия тестирования на генотоксичность лекарственных средств. В соответствии с текущими отечественными правилами, изложенными в последнем Руководстве по доклиническим исследованиям (ДИ) 2012 года [219], до начала

фазы I клинических исследований (КИ) в рамках изучения специфических видов токсичности лекарственных средств проводится исследование их мутагенной активности и потенциальной канцерогенности в краткосрочных тестах (рисунок 1.19). Общим этапом этих исследований является оценка индукции генных мутаций на бактериях (тест Эймса) или *D. melanogaster* и хромосомных повреждений *in vivo* методом анализа хромосомных aberrаций в клетках костного мозга на стадии метафазы или учета микроядер в клетках костного мозга или периферической крови грызунов. Оценка потенциальной канцерогенной активности включает проведение дополнительно теста на индукцию повреждений ДНК *in vivo*. С этой целью рекомендовано использование метода анализа внепланового синтеза ДНК в клетках печени *in vivo*, щелочной элюции или теста ДНК-комет. В совокупности указанная схема по набору тестов и методологии тестирования соответствует принятой в международной практике доклинической оценки генотоксичности лекарственных средств. Отличие состоит лишь в том, что перед проведением фазы III КИ предполагается тестирование методом учета доминантных летальных мутаций в половых клетках млекопитающих.

При получении отрицательных результатов во всех тестах или позитивных результатов по меньшей мере в двух тестах выносится соответствующее заключение об отсутствии или наличии у лекарственного средства генотоксичности и, соответственно, канцерогенного потенциала. Если позитивный эффект выявляется в одном из тестов, проводится дополнительное исследование с использованием альтернативного теста, регистрирующего тот же тип генотоксического события. В случае подтверждения позитивного эффекта исследования далее не проводятся, а в случае отрицательного результата переходят к заключительному этапу с использованием одного из прямых экспресс-тестов определения канцерогенности, к примеру, учета опухолевой трансформации клеток *in vitro*. При получении экспериментальных результатов, не позволяющих с полной определенностью сделать заключение о генотоксической активности, на фазе III КИ проводится исследование методами учета хромосомных aberrаций и/или повреждений ДНК в клетках периферической крови пациентов.



Примечание – ХрА – тест на индукцию хромосомных aberrаций; МЯ – микроядерный тест.

Рисунок 1.19 – Стратегии проведения исследований по оценке генотоксичности лекарственных средств согласно отечественным и международным регуляторным требованиям

С целью унификации и гармонизации подходов в обеспечении качества, безопасности и эффективности лекарственных средств в апреле 1990 года представителями регуляторных органов, фармакопей и производителей лекарственных препаратов США, ряда европейских стран и Японии был создан международный орган – Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения (International Conference on Harmonization, ICH). Актуальная на сегодня программа ICH по испытанию лекарственных средств на генотоксическую активность построена по принципу ступенчатого тестирования и определяется совместными требованиями руководств ICH S2(R1) и M3(R2). Набор тестов, методология проведения и экспертиза результатов исследований определены в руководстве S2(R1) [220], заменившем руководства S2A и S2B. Порядок проведения исследований в зависимости от этапа/фазы КИ в числе других

видов токсикологических исследований регламентируется мультидисциплинарным руководством МЗ(R2) [221].

Согласно правилам МЗ(R2) тестирование на генотоксичность не проводится при КИ с введением лекарственного средства в микродозах – суммарно ≤ 100 мкг ($\leq 1/100$ от дозы без наблюдаемых нежелательных эффектов (NOAEL) или фармакологически активной) или ≤ 500 мкг (не более 5 введений; каждая доза $\leq 1/100$ от NOAEL или фармакологически активной). Перед КИ с однократным введением лекарственного средства в субтерапевтических или ожидаемых терапевтических дозах достаточной считается оценка генотоксического потенциала в тесте Эймса или, в случае его неприменимости, в альтернативном ему тесте. КИ, предусматривающие многократное введение лекарственного средства, могут быть проведены при наличии данных о его цитогенетической активности, полученных в тесте по учету хромосомных нарушений *in vitro* или *in vivo*. До начала фазы II КИ оценка генотоксичности должна быть завершена в полном объеме. При этом в документе дается отсылка на утратившее силу руководство S2B, поскольку на момент утверждения МЗ(R2) обновленное руководство S2(R1) находилось на стадии разработки.

В соответствии с S2B, батарея обязательных тестов включает тест Эймса, *in vitro* тест на индукцию хромосомных нарушений в клетках млекопитающих (или генных мутаций *in vitro*) и тест на индукцию хромосомных нарушений в клетках грызунов *in vivo*. В случае неприменимости теста Эймса в качестве альтернативы определено проведение двух *in vitro* тестов с детекцией различных типов генотоксических событий в клетках млекопитающих. Выбор цитогенетического теста перед I фазой КИ с многократным введением документом не регламентируется и решение остается за разработчиком лекарственного средства.

Анализ опыта доклинических исследований в странах-участниках ICH показывает, что исследователи параллельно выполняют тестирование *in vitro* и *in vivo*. Причиной является низкая специфичность *in vitro* тестов, дающих зачастую ложноположительные или неоднозначные результаты, которые требуют дальнейшей верификации в расширенных исследованиях *in vivo*. Аргументом

также выступает «методологическое удобство» проведения микроядерного анализа *in vivo* на животных, задействованных в эксперименте по оценке хронической токсичности при 2-недельном введении, предшествующем фазе I КИ.

В 2006 г. экспертной рабочей группой ИСН по вопросам безопасности была начата разработка нового усовершенствованного руководства на основе научных и методических достижений с учетом результатов практики применения стратегий S2A и S2B. В итоге длительных обсуждений была разработана компромиссная версия руководства S2(R1), согласованная исполнительным комитетом ИСН в 2011 г. и принятая регуляторными органами регионов ИСН в 2012 г. Обновленное руководство S2(R1) предусматривает возможность проведения исследований генотоксичности с использованием двух взаимозаменяемых батарей (options) тестов (рисунок 1.19). Первая батарея тестов (option 1) полностью соответствует принятой в руководстве S2B, что отчасти разрешает отмеченную выше регуляторную коллизию, когда руководство M3(R2) ссылается на утративший силу документ. Вторая батарея (option 2) включает тест Эймса и два *in vivo* теста, позволяющих оценить различные типы генотоксических событий в двух разных органах/тканях, что, как правило, включает цитогенетический тест в клетках костного мозга и тест на индукцию повреждений ДНК в клетках печени. Хотя руководство M3(R2) прямо не определяет порядок проведения *in vivo* исследований в случае батареи 2, предполагается, что к началу фазы I КИ с многократным введением лекарственного средства должен быть проведен цитогенетический тест.

В S2(R1), как и в предыдущих версиях руководства, не регламентирована стратегия последующих исследований при выявлении у лекарственного средства положительного результата в тесте Эймса. Ввиду высокой степени корреляции мутагенной активности в тесте Эймса с канцерогенностью *in vivo* целесообразным считается прекращение дальнейшей разработки лекарственного средства. При выявлении позитивного результата в тесте *in vitro* на клетках млекопитающих (option 1) проводят дополнительное исследование *in vitro* с учетом предполагаемых механизмов наблюдаемых эффектов и возможных методических артефактов (mechanistic information). Если результаты исследования однозначно

свидетельствуют в пользу отсутствия генотоксического потенциала, тестирование лекарственного средства завершают проведением одного *in vivo* теста. В противном случае требуется проведение двух *in vivo* тестов, т.е., по сути, переход ко второй схеме тестирования (option 2). При выявлении позитивных эффектов в *in vivo* тесте(ах) разработка лекарственного средства может быть продолжена при соответствующем обосновании «польза-риск» на основе данных расширенных генотоксикологических исследований.

Таким образом, отличительной особенностью международных требований к доклинической оценке генотоксичности лекарственных средств по сравнению с отечественными является возможность поэтапного тестирования в зависимости от дозы/режима применения и фазы КИ, а также отсутствие необходимости отдельных исследований в половых клетках. Такая стратегия позволяет существенно сократить временные и ресурсные затраты в случае лекарственных средств, неперспективных для дальнейшей разработки по результатам ДИ или первой фазы КИ. Кроме того, она лежит в русле реализации директивы гуманизации экспериментальных исследований с использованием лабораторных животных 3R (Replacement, Reduction, Refinement). В РФ в области ДИ лекарственных средств в настоящее время ведется активная работа по внедрению новых межгосударственных стандартов в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС) с целью гармонизации норм и правил с международными регламентирующими документами. Утвержден ГОСТ 57130-2016 [222], являющийся адаптированной версией руководства ICH S2, а также Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии утверждено руководство по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов [223], гармонизированное с руководством ICH M3(R2).

Предиктивность канцерогенности в краткосрочных тестах на генотоксичность. На заре становления генотоксикологии ее главной задачей была определена оценка риска возникновения наследуемых мутаций у человека под действием различных факторов окружающей среды, и испытания на мутагенную и

канцерогенную активности являлись независимыми процедурами. С введением в 1970-х годах в практику теста Эймса был накоплен массив экспериментальных данных по мутагенным эффектам известных канцерогенов. После выявления на основе сравнительного анализа этих данных сопряженности мутагенной активности в тесте Эймса с канцерогенностью *in vivo* стало очевидным, что результаты краткосрочных тестов на генотоксичность могут быть использованы для прогнозирования канцерогенного риска. С этого момента фактически началось смещение фокуса развития генотоксикологической методологии от изначально направленной на предикцию наследуемого мутагенеза в сторону оценки канцерогенного потенциала. Таким образом, на сегодня тестирование на генотоксическую активность преследует две цели – оценку собственно генотоксичности и прогноз потенциальной канцерогенности.

В таблице 1.7 представлены данные по чувствительности и специфичности генотоксических тестов и их комбинаций в прогнозировании канцерогенности, обобщенные из нескольких источников. Как видно из таблицы, индивидуальные тесты на генотоксичность характеризуются различной, но всегда менее чем 100% чувствительностью в прогнозировании канцерогенеза из-за специфичности к определенным типам генотоксических событий. Наилучшие показатели чувствительности (до 92%) и специфичности (до 100%) установлены для теста ДНК-комет. Его комбинация с цитогенетическими тестами увеличивает чувствительность до 96–97%.

Высокая чувствительность (до 94%) установлена также для теста на индукцию мутаций в специфических локусах у трансгенных животных (TGR) и его комбинаций с другими тестами. Тест также позволяет проводить оценку в различных органах и тканях, однако он не получил широкого применения в качестве экспертного теста ввиду длительности, трудоемкости и высокой стоимости.

Оценка генотоксичности в половых клетках. Считается, что генотоксиканты для половых клеток с высокой степенью вероятности выявляются в тестах на соматических и отсутствие генотоксичности *in vivo* предполагает ее

отсутствие и в половых клетках. В основу этой концепции, сформулированной еще в 90-х годах прошлого века, легли результаты сравнительного ретроспективного анализа генотоксической активности ряда соединений в половых клетках при соответствующих ответах в тестах на бактериях и/или соматических клетках.

Таблица 1.7 – Предиктивность канцерогенных эффектов на основе тестов по оценке генотоксичности и при их комбинировании

Тест	Чувствительность	Специфичность
Отдельные тесты		
Тест Эймса	49–61%	72–75%
МЯ <i>in vitro</i>	63–79%	31–49%
ХрА <i>in vitro</i>	66%	45%
MLA	73–86%	26–39%
МЯ <i>in vivo</i>	36–74%	41–78%
ХрА <i>in vivo</i>	35–69%	66–100%
ДНК-комет <i>in vivo</i>	78–92%	77–100%
ВПД	48–64%	20–63%
Pig-a	82%	-
TGR	72–93%	-
Комбинации тестов		
Тест Эймса + МЯ <i>in vitro</i>	73%	
Тест Эймса + MLA	81–89%	
Тест Эймса + MLA+ ХрА <i>in vitro</i>	85%	
Тест Эймса + MLA+ МЯ <i>in vitro</i>	91%	
Тест Эймса + МЯ <i>in vitro</i> + МЯ <i>in vivo</i>	80%	
Тест Эймса + МЯ <i>in vitro</i> +TGR	89%	
Тест Эймса + МЯ <i>in vivo</i> +TGR	87%	
Тест Эймса + МЯ <i>in vitro</i> + МЯ <i>in vivo</i> +TGR	89%	
Тест Эймса + TGR	84%	
Тест Эймса + ДНК-комет <i>in vivo</i>	90%	
Тест Эймса + МЯ <i>in vivo</i>	78%	
MLA + МЯ <i>in vitro</i>	87%	
MLA + ХрА <i>in vitro</i>	89%	
ХрА <i>in vivo</i> + МЯ <i>in vivo</i>	88%	
МЯ <i>in vivo</i> + ДНК-комет <i>in vivo</i>	92–94%	
ХрА <i>in vivo</i> + ДНК-комет <i>in vivo</i>	97%	
МЯ <i>in vivo</i> + TGR	94%	
МЯ <i>in vivo</i> + Pig-a	93%	
МЯ <i>in vivo</i> + ДНК-комет <i>in vitro</i>	96%	
ХрА <i>in vivo</i> + ДНК-комет <i>in vitro</i>	91%*	

* – позитивный эффект для 4 негенотоксичных канцерогенов в тесте ДНК-комет.

МЯ – микроядерный тест;

TGR – совокупно тесты на индукцию мутаций в специфических локусах у трансгенных животных (ОЭСР TG488);

MLA – тест на индукцию генных мутаций в клетках мышечной лимфомы L5178Y Tk^{+/-} (ОЭСР TG490);

ХрА – тест на индукцию хромосомных aberrаций в клетках костного мозга *in vivo* (ОЭСР TG475);

ВПД – тест на внеплановый синтез ДНК (ОЭСР TG486);

Pig-a – тест на индукцию мутаций в гене Pig-a в эритроцитах млекопитающих (ОЭСР TG470).

В совокупности с научными представлениями о единстве механизмов возникновения генотоксических событий для различных типов клеток, а также учитывая методические сложности проведения исследований в половых клетках, была определена стратегия предикции генотоксических эффектов в половых клетках на основе стандартных тестов на генотоксичность. Исходя из этого, для лекарственных средств обязательность исследования генотоксичности в половых клетках была исключена из S2(R1).

Вместе с тем ведущие специалисты в области генотоксикологии сходятся во мнении, что, несмотря на высокую прогностическую эффективность, результаты тестов на соматических клетках не могут служить надежным предиктором генотоксичности в половых [15]. Согласно исследованиям последних лет, наряду с особенностями процессов клеточного деления при гаметогенезе, половые клетки и их предшественники характеризуются специфичными протеомным, транскриптомным и метаболомным профилями, а также путями эпигенетической регуляции, что предполагает наличие для них уникальных мишеней генотоксического воздействия.

На текущий момент для оценки генотоксичности в половых клетках в качестве экспертных утверждены три теста: тест на индукцию мутаций в соматических и половых клетках трансгенных животных (ОЭСР TG488), тест на индукцию хромосомных aberrаций в клетках сперматогоний млекопитающих (ОЭСР TG483) и тест на индукцию доминантных летальных мутаций у грызунов (ОЭСР TG478). Указанные тесты обладают низкой специфичностью и/или производительностью, дорогостоящи, либо в недостаточной степени валидизированы и верифицированы, что ограничивает их рутинное применение в экспертной генотоксикологической оценке. Важным их недостатком является использование в качестве тест-объекта исключительно самцов при имеющихся экспериментальных свидетельствах особенностей процессов спонтанного и индуцированного мутагенеза в мужских и женских половых клетках.

Методологические особенности оценки генотоксичности наноматериалов. Использование наноматериалов стало неотъемлемой частью

современного инновационного развития в различных сферах, включая медицину и фармацевтику. В то же время стремительный рост разработки и применения наноматериалов происходит на фоне отсутствия стандартизированной регламентированной методологии оценки их безопасности, что вызывает обоснованную обеспокоенность у научного сообщества [16]. Уникальные физико-химические свойства наноматериалов определяют специфичность механизмов реализации их биологических и токсических эффектов: большая удельная площадь поверхности способствует высокой реакционной, каталитической и адсорбционной активности; малые размеры и наличие заряда способствуют свободному прохождению через тканевые и гистогематические барьеры, мембраны клеток и органелл; неэффективность эволюционно-сформированных механизмов биodeградации и выведения способствует накоплению в органах/тканях [16]. Эти особенности наноматериалов требуют адаптации разработанных изначально для химических соединений методологических подходов к оценке безопасности, в том числе генотоксичности, однако несмотря на достигнутый прогресс в этом направлении проблема остается нерешенной [16, 17].

В 2018 г. на основе критического анализа накопленного на тот момент пула экспериментальных данных была разработана стратегия (дорожная карта) оценки генотоксичности наноматериалов [17, 224]. Согласно предложенной стратегии, перед проведением исследований тестируемый образец должен быть максимально охарактеризован (происхождение, метод получения/синтеза, физико-химические свойства), описана его пробоподготовка (носитель, способ получения раствора/суспензии), приведены сведения о стабильности и способности к агрегации/агломерации, в том числе в экспериментальных условиях *in vitro*, обоснован выбор тестируемых доз/концентраций и режима введения/экспозиции, приведены сведения об интернализации наноматериала клетками в условиях *in vitro* и его биораспределении *in vivo*. На первом этапе генотоксичность предложено исследовать в экспериментах *in vitro* с оценкой двух генотоксических событий (конечных точек) – генных мутаций и хромосомных нарушений. Для оценки генных мутаций рекомендовано использование теста на индукцию генных мутаций

в клетках млекопитающих *in vitro* (ОЭСР TG476) или тест на индукцию мутаций в гене тимидинкиназы в клетках млекопитающих *in vitro* (ОЭСР TG490). Тест Эймса признан нерелевантным ввиду низкой проницаемости стенок бактерий для наноматериалов. Для оценки хромосомных нарушений рекомендовано использование микроядерного теста в клетках млекопитающих *in vitro* (ОЭСР TG487) или теста на индукцию хромосомных aberrаций *in vitro* (ОЭСР TG473). В случае выявления *in vitro* позитивного эффекта или неоднозначных результатов предложено проведение *in vivo* исследований с использованием одного из тестов – микроядерного теста в эритроцитах млекопитающих (ОЭСР TG474), теста на индукцию хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих (ОЭСР TG475), теста на индукцию мутаций в соматических и половых клетках трансгенных животных (ОЭСР TG488) или теста ДНК-комет в клетках млекопитающих (ОЭСР TG489).

Методологические и регуляторные вопросы оценки генотоксичности наноматериалов были подняты в 2023 г. на семинаре «*Текущее состояние и предстоящие задачи в области разработки руководств по тестированию наноматериалов на генотоксичность*», проведенном под эгидой ОЭСР при участии представителей регулирующих органов, промышленности и специалистов в области генотоксикологии [38]. По итогам семинара были вынесены следующие заключения, вносящие коррективы и дополнения в описанную выше дорожную карту: 1) существующие протоколы проведения *in vitro* тестов требуют соответствующей адаптации для тестирования наноматериалов, как в случае с микроядерным тестом в клетках млекопитающих *in vitro*, адаптированная версия которого в виде предварительного руководства утверждена ОЭСР [226]; 2) с учетом все возрастающего числа новых наноматериалов актуализируется валидация и внедрение высокопроизводительных скрининговых *in vitro* тестов, в том числе на основе новых методических подходов с использованием технологий 3D-культур, органоидов и орган-на-чипе, эмулирующих основные функции органов/тканей [28]; 3) низкая доступность костного мозга для некоторых видов наноматериалов обуславливает риск получения в стандартных цитогенетических

тестах *in vivo* (ОЭСР TG474 и TG475) ложноотрицательных результатов; 4) для тестирования *in vivo* приоритетно использование тестов, позволяющих оценивать эффекты в органах/тканях, являющихся первичной мишенью воздействия наноматериалов (легкие, органы желудочно-кишечного тракта) и способных их аккумулировать (печень, почки, селезенка); 5) способность наноматериалов вызывать повреждение ДНК не только напрямую, но и опосредованно через индукцию воспаления, определяет необходимость разработки специфических *in vitro* моделей и подчеркивает весомость данных *in vivo* тестирования. В качестве основных методов разрабатываемой методологии рассматриваются метод анализа микроядер и метод ДНК-комет, применимость которых для оценки генотоксичности в различных *in vitro* моделях (моно- и смешанные 2D и 3D-культуры, органоиды) и в *in vivo* исследованиях продемонстрирована неоднократно [28, 38, 224].

Таким образом, в современной регуляторной практике сложилась и успешно функционирует гармонизированная система тестирования химических соединений на генотоксичность, позволяющая с высокой эффективностью выявлять генотоксиканты и потенциальные канцерогены. Основу ее методологии составляют сформированные в батарее валидированные тесты, детектирующие различные категории генотоксических событий. Расширение фундаментальных представлений о механизмах и закономерностях реализации генотоксических эффектов, новые вызовы, возникающие вследствие инновационного технологического развития и достижения в области инструментальных и молекулярных методов анализа, в совокупности определяют необходимость постоянного совершенствования методологии. Важная роль в этом отводится разработке и внедрению методов регистрации первичных повреждений ДНК. Так, значительное усиление прогностической «мощности» генотоксикологического тестирования достигнуто с внедрением в практику метода ДНК-комет, обеспечившего решение важнейшей задачи – органо- и тканеспецифичной оценки генотоксичности. Метод сегодня определен в качестве одного из базовых «инструментов» в разрабатываемой стратегии оценки безопасности

наноматериалов. Возможность выявления низкоуровневых генотоксических воздействий определяет также значимость методов регистрации повреждений ДНК для оценки эндогенной генотоксичности и в целях генотоксикологического биомониторинга. Вместе с тем, несмотря на положительный опыт применения в фундаментальных научных исследованиях и регуляторной практике, для каждого из методов существует ряд ограничений и методических «пробелов», влияющих на надежность, воспроизводимость и интерпретацию получаемых результатов. Их решение представляет сегодня одну из актуальных задач в рамках совершенствования методологии тестирования на генотоксичность и генотоксикологических исследований в целом.

1.6 Методические подходы к регистрации повреждений ДНК

Методы регистрации повреждений ДНК условно можно разделить на три группы – методы, основанные на оценке различных модификаций азотистых оснований (также обозначаемых термином ДНК-аддукты); методы, основанные на оценке целостности структуры молекулы ДНК; непрямые методы, основанные на оценке репаративного ответа клеток на повреждение ДНК [227].

Первую группу составляют преимущественно хроматографические методы исследования. Процедура анализа включает выделение тотальной ДНК из анализируемых клеток, термический или ферментативный гидролиз ДНК и последующий анализ содержания ДНК-аддуктов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД), газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ-МС) или жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС) [228]. Последний метод получил более широкое применение ввиду высокой чувствительности, малых количеств образца для анализа, отсутствия необходимости получения летучих дериватов (как в случае с ГХ-МС) и возможности структурной идентификации, позволяющей одновременно оценить в одном образце различные ДНК-аддукты (adductome) [229]. Внедрение новейших разработок в метод ЖХ-МС/МС, таких как нанопотоковая хроматография (nanoLC) на колонках малого диаметра и

ультраэффективная жидкостная хроматография (UPLC) с использованием микро- и наноэлектрораспыления (μ ESI и nESI), позволило снизить пределы обнаружения ДНК-аддуктов до 1 на 10^9 немодифицированных нуклеотидов [230].

Источником потенциальных артефактов при использовании указанных методов является этап пробоподготовки. Процедура выделения ДНК для анализа *per se* может приводить к повреждению ДНК за счет окисления, спонтанного дезаминирования или вследствие дестабилизации *N*-гликозидных связей. Ряд ДНК-аддуктов, стабильных в составе молекулы ДНК, при переходе после ферментативного гидролиза в форму 2'-дезоксинуклеозидов могут спонтанно разрушаться [230]. Фосфодиэфирная связь объемных ДНК-аддуктов устойчива к действию нуклеаз, что может приводить к неполному гидролизу ДНК и, как результат, к недооценке их уровней [228, 230]. Разработаны процедуры, позволяющие избежать указанные артефакты, однако они увеличивают и без того высокие трудоемкость и стоимость анализа.

Для селективной и неселективной детекции ДНК-аддуктов разработаны методические приемы на основе ПЦР в режиме реального времени (real-time PCR) и опосредованной лигированием ПЦР (ligation-mediated PCR), иммуноферментного анализа с использованием специфических антител, капиллярного электрофореза и [32 P]-пост-мечения, но они не нашли пока широкого применения ввиду недостаточной разработанности [227].

Вторую группу составляют физико-химические методы, основанные на оценке одно- и двунитевых разрывов и щелочно-лабильных сайтов в ДНК, выявляемых по степени ее фрагментации в условиях щелочной денатурации. Двунитевая ДНК в щелочных условиях денатурирует и переходит в одонитевую форму, и чем больше разрывов, тем на большее количество одонитевых фрагментов различной длины она распадается. Денатурированную ДНК разделяют и анализируют соотношение фрагментированной ДНК к не фрагментированной. Важным достоинством такого методического подхода является интегральная оценка повреждений ДНК, поскольку возникновение разрывов в ДНК является

результатирующим следствием всех типов первичных повреждений оснований и/или их репарации.

Пионерским в этом ряду стал разработанный в начале 70-х годов прошлого столетия метод щелочной элюции, основанный на определении кинетики прохождения одностранных фрагментов денатурированной ДНК через мембранные фильтры [231]. Исследуемые клетки лизируют на мембранном фильтре из нитроцеллюлозы или поликарбоната, в результате чего очищенная от клеточных компонентов депротенинированная ДНК иммобилизуется на фильтре. Через фильтр пропускается щелочной раствор (элюент), денатурирующий ДНК и вымывающий короткие одностранные фрагменты. Определяется содержание ДНК в элюате и на фильтре и подсчитывается процент оставшейся на фильтре ДНК или процент элюированной ДНК, которые используются в качестве показателя относительной поврежденности ДНК.

Позднее был разработан метод FADU (Fluorometric analysis of DNA unwinding), основанный на оценке кинетики самой щелочной денатурации ДНК [232]. Клетки после лизиса инкубируют в умеренно-щелочных условиях (рН 12,2–12,4), при которых ДНК денатурирует не вся сразу, а начиная с концов и участков с одно- и двунитевыми разрывами. Через заданное время денатурацию резко останавливают путем быстрой нейтрализации и охлаждения образца: та часть ДНК, что успела денатурировать, остается одностранным, а остальная ренатурирует обратно в двунитевую форму. Флуориметрически определяют концентрацию ДНК, а уровень поврежденности ДНК выражают как время полуденатурации или как начальную скорость денатурации.

Были также разработаны методы, основанные на разделении денатурированной ДНК в градиенте сахарозы, на колонках с гидроксипатитом или пульс-электрофорезом, но они не получили широкого применения. Основными недостатками вышеописанных методов являются усредненный анализ поврежденности ДНК для всей популяции исследуемых клеток, что не позволяет дифференцированно оценить клетки с истинными повреждениями ДНК и клетки с фрагментацией ДНК вследствие клеточной гибели, а также низкая

чувствительность в случае гетерогенного ответа клеточной популяции на генотоксическое воздействие.

В 1984 г. О. Остлингом и К. Йохансоном был предложен оригинальный метод оценки двунитевых разрывов ДНК в отдельных клетках, основанный на их электрофорезе в агарозном геле и микроскопическом анализе [233]. Н. Сингх и соавт. модифицировали метод, включив этап щелочной денатурации и заменив электрофорез в нейтральных условиях на щелочной ($\text{pH} > 13$), что позволило помимо двунитевых разрывов ДНК выявлять однонитевые разрывы и щелочно-лабильные сайты [234]. Метод первоначально получил название гель-электрофореза отдельных клеток (single-cell gel electrophoresis, SCGE), сменившееся на более распространенное сегодня метод «ДНК-комет» (DNA comet assay) [26].

Стандартная процедура метода ДНК-комет включает получение гель-слайдов с подложкой из агарозы, внесение исследуемых клеток в агарозный гель и нанесение на гель-слайды, лизис, электрофорез, фиксацию/нейтрализацию, окрашивание и микроскопический анализ (рисунок 1.20). В процессе лизиса под действием высокой концентрации соли и детергента происходит диссоциация клеточных структур, депротеинизированная ДНК заполняет образованную клеткой полость в агарозе. В нейтральной версии метода в ходе электрофореза в нейтральном буфере ДНК в виде линейных фрагментов и/или петель двунитевой ДНК мигрирует в порах агарозы к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий хвост кометы (отсюда и название метода). Щелочная версия метода включает дополнительно этап щелочной денатурации, а электрофорез проводится в жестких щелочных условиях ($\text{pH} > 13$). В ходе щелочной денатурации ДНК переходит в однонитевую форму, щелочно-лабильные сайты реализуются в однонитевые разрывы. Во время электрофореза в том же буфере образовавшиеся нити и фрагменты однонитевой ДНК мигрируют к аноду, образуя хвост ДНК-комет, в котором после нейтрализации/фиксации случайным образом (негомологично) ренатурируют в двунитевую ДНК. Препараты окрашивают специфичными к ДНК флуоресцирующими красителями (этидиум бромид, 4,6-

диамидино-2-дифенилиндол (DAPI), SYBR Green I, YOYO-1 и др.) и микроскопируют с помощью флуоресцентного микроскопа. В простом варианте непосредственно под микроскопом измеряют длину комет, диаметр головы и длину хвоста комет. Программно-аппаратный комплекс для анализа включает совмещенную с микроскопом высокочувствительную CCD-камеру и специализированное программное обеспечение, что позволяет проводить цифровую регистрацию и обработку параметров ДНК-комет. В качестве показателя поврежденности ДНК используют показатели длина хвоста, процентное содержание ДНК в хвосте (%ДНК в хвосте) или их произведение – момента хвоста (tail moment).

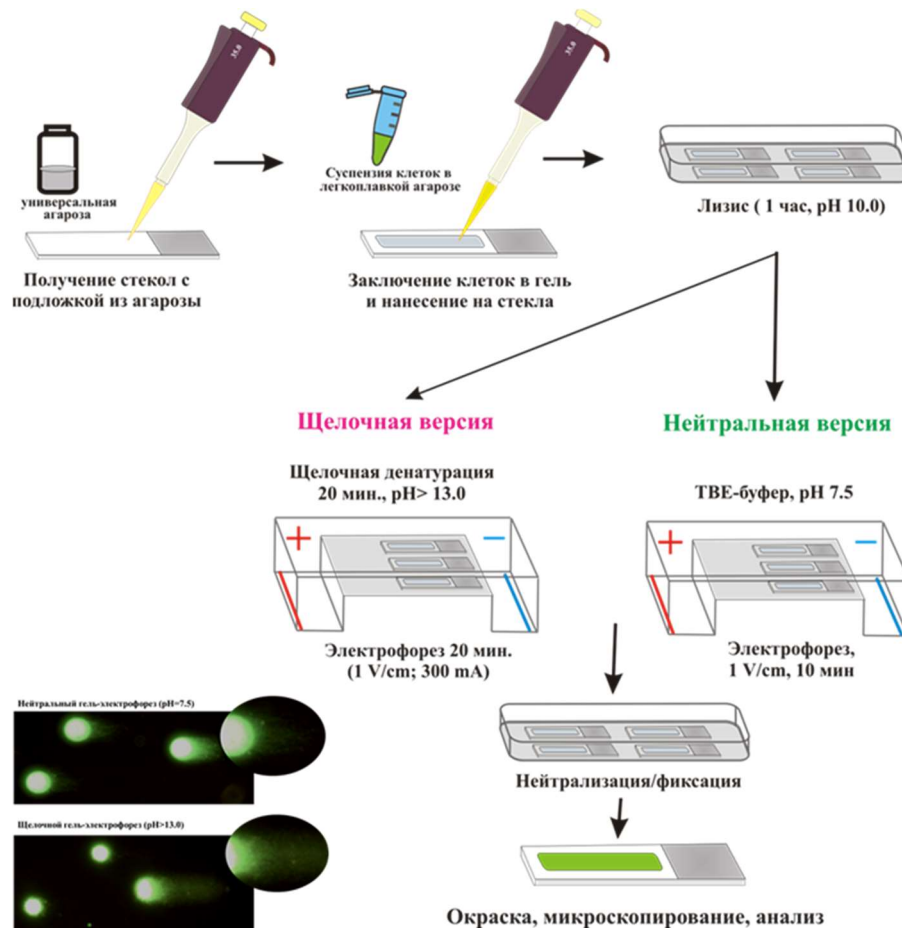


Рисунок 1.20 – Стандартная процедура проведения метода ДНК-комет

В нейтральной версии метод ДНК-комет позволяет оценивать двунитевые разрывы ДНК, в щелочной версии – одно- и двунитевые разрывы ДНК и щелочно-лабильные сайты. При соответствующей модификации метод позволяет оценивать

различные типы повреждений ДНК более специфично. Разработана модификация метода для селективной детекции поврежденных оснований в ДНК (enzyme-modified comet assay) [235]. Суть модификации заключается в обработке ДНК лизированных клеток на препаратах специфическими ферментами репарации, которые вносят разрывы в ДНК в местах локализации поврежденных оснований. Далее препараты подвергают стандартной процедуре с щелочной денатурацией и электрофорезом, и по разнице показателей для ДНК, обработанной ферментом и обработанной только буфером для фермента, определяют относительные уровни поврежденных оснований. На основе описанного выше подхода также разработан способ оценки методом ДНК-комет уровней метилирования ДНК.

При соответствующей модификации метод позволяет регистрировать сшивки ДНК-белок и меж- и внутринитевые сшивки ДНК [236]. В первом случае ДНК лизированных клеток обрабатывают протеиназой К и по соотношению показателей с обработкой ферментом и без обработки определяют процентное содержание сшивок в ДНК. В случае оценки сшивок ДНК препараты подвергают воздействию заведомых генотоксикантов. Такая обработка приводит к увеличению исходной поврежденности ДНК, при этом ДНК, содержащая сшивки ДНК, в процессе электрофореза мигрирует в меньшей степени. По соотношению изменения подвижности ДНК контрольных и исследуемых клеток вычисляется процент сшивок в ДНК. Все больший интерес вызывает методический подход, совмещающий метод ДНК-комет и флуоресцентную *in situ* гибридизацию, что позволяет оценивать на уровне отдельных клеток способность генотоксикантов специфично повреждать определенные участки ДНК [237].

На препаратах ДНК-комет при различных экспериментальных условиях можно наблюдать имеющие нестандартную морфологию ДНК-кометы, далее описываемые термином «атипичные». Их общей характеристикой является небольшая или недифференцируемая голова и широкий диффузный хвост (рисунок 1.21), при этом в хвосте кометы представлено от 70 до 100% от всей ДНК клетки [238]. В литературе такие ДНК-кометы получили различные определения – “ghost cells” (клетки-призраки), “clouds” (облака), “hedgehogs” (ежи) или “highly

damaged cells” (сильно-поврежденные клетки). Предполагается, что в процессе лизиса короткие фрагменты ДНК свободно диффундируют в геле, формируя широкое гало либо с небольшой головой в центре, либо без таковой. В ходе электрофореза образовавшееся гало смещается относительно головы, формируя в первом случае ДНК-комету, морфологически напоминающую ежа в горизонтальной проекции (отсюда название *hedgehog*) или подобие облака (*cloud*) во втором случае. На сегодняшний день природа возникновения атипичных ДНК-комет остается неясной. Выдвинуты различные предположения, преимущественно основанные на том, что такая форма ДНК-комет является свидетельством фрагментации хроматина в ходе того или иного типа клеточной гибели, однако ни одна из гипотез пока не получила должного экспериментального подтверждения [239]. Исходя из этого, при рутинной оценке генотоксичности принято исключать атипичные ДНК-кометы из общего анализа и учитывать их как отдельный показатель, не характеризующий генотоксичность, но указывающий на способность исследуемого агента индуцировать в клетках процессы, приводящие к обратимой/необратимой фрагментации ДНК [31, 239].

Несмотря на очевидные преимущества, определившие широкое применение метода ДНК-комет в фундаментальных, поисковых и регуляторных экспертных исследованиях, нерешенными остаются два методических вопроса – меж- и внутрилабораторная вариабельность экспериментальных данных и неопределенность природы атипичных ДНК-комет и их значения при интерпретации получаемых результатов.

Наиболее известным из **третьей группы** является метод внепланового синтеза ДНК (Unscheduled DNA Synthesis, UDS). Метод основан на детекции синтеза ДНК в ходе репаративного восстановления ДНК, проходящего преимущественно по механизму эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) [240]. В *in vitro* исполнении метода клетки подвергаются генотоксическому воздействию в среде, содержащей меченый нуклеотид (³H-тимидин или 5-бром-2'-дезоксинуридин), с последующей блокировкой клеточного цикла для исключения полуконсервативной репликации. Через определенное время проводят детекцию

меток – любое включение меченого нуклеотида в ДНК в таких условиях считается «внеплановым» и свидетельствует о процессе репарации. Количество включившейся метки пропорционально уровню репарационной активности клетки. В *in vivo* исполнении детекцию проводят в печени крыс, являющейся оптимальным объектом для таких исследований, поскольку, во-первых, большинство зрелых гепатоцитов находятся в фазе клеточного цикла G₀, но при этом обладают высокой метаболической и репарационной активностью, во-вторых, печень является мишенью воздействия для большинства генотоксикантов [241]. К недостаткам метода относятся: высокий риск получения ложноположительных (неоптимальные условия блокировки репликации, неспецифичное иммуноцитохимическое окрашивание при использовании 5-бром-2'-дезоксисуридина) или ложноотрицательных (нерепарируемые повреждения, клеточная гибель) результатов; ограниченность *in vivo* исследований печенью как органом-мишенью; специализированные требования к работе с радиоактивным ³H-тимидином.

Разработана большая группа методов, основанных на детекции репаративного ответа с использованием технологии репортерных генов. В качестве тест-систем в них используются генетически модифицированные микроорганизмы или линии эукариотических клеток, в геном которых встроен ген-репортер, находящийся под контролем промотора какого-либо экспрессирующегося в ответ на повреждение ДНК гена. Например, в SOS-хромостесте используются штаммы бактерий *Escherichia coli*, несущих ген фермента β-галактозидазы *lacZ* под управлением промотора гена SOS-системы *sfiA*. Активация SOS-системы в ответ на повреждение ДНК приводит к экспрессии последовательно генов *sfiA* и *lacZ*. Генотоксический эффект определяют по активности β-галактозидазы, измеряемой колориметрически [242]. Тот же принцип используется в UmuC-тесте на штаммах *Salmonella typhimurium* и в тесте на lux-биосенсорах, несущих ген-репортер люциферин-люциферазного комплекса [243]. Разработаны высокочувствительные эукариотические тест-системы GreenScreen HC [244] и BlueScreen [245] с использованием клеток лимфобластомы ТК6, несущих, соответственно, гены-репортеры зеленого флуоресцирующего белка GFP и люциферазы под

управлением промотора гена медиаторного белка системы DDR – GADD45 α (рисунок 1.14). Показано, что тест-системы с 80–100% чувствительностью и 100% специфичностью выявляют потенциальные генотоксиканты и канцерогены [245]. Важным преимуществом описанных методов является возможность их использования для высокопроизводительного скрининга, что особо актуально в области разработки лекарственных средств, когда скринингу подвергаются от десятков до сотен соединений-кандидатов. Главный же их недостаток – неприменимость для исследований *in vivo*.

*Таким образом, разработано множество методов регистрации повреждений ДНК, каждый из которых обладает определенными преимуществами и недостатками. Методы на основе хроматографического анализа позволяют с очень высокой чувствительностью регистрировать широкий спектр модифицированных оснований ДНК, однако ввиду трудоемкости, стоимости анализа и необходимости в дорогостоящем оборудовании малопригодны для рутинных генотоксикологических исследований. Методы с использованием технологии репортерных генов обладают высокой чувствительностью, специфичностью и производительностью, однако применимы только в целях тестирования *in vitro*. Наиболее оптимальным методическим подходом для оценки поврежденности ДНК является оценка ее целостности, что подтверждено многолетней успешной практикой применения методов щелочной элюции и FADU. Им на смену сегодня приходит метод ДНК-комет, обладающий 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. Вместе с тем нерешенным остается ряд его методических вопросов, сказывающихся на получаемых результатах и их интерпретации. Их решение позволит значительно расширить применение метода ДНК-комет в различных*

областях генотоксикологических исследований, включая одну из важнейших практических – поиск и разработку средств антимуtagenной защиты организма.

1.7 Антимуtagenная защита организма: экспериментальные данные и опыт практического применения

Выявление генотоксикантов и исключение контакта человека с ними является наиболее конструктивной мерой профилактики генотоксических воздействий. Вместе с тем существуют ситуации, когда избежать их не представляется возможным, как в случае с загрязнителями окружающей среды, вредными производствами, пищевыми мутагенами, лекарственной терапией и медицинскими процедурами, сопровождающимися генотоксическим воздействием, а также с эндогенной генотоксичностью при различных патологиях и патологических состояниях. В этой связи внимание привлекает явление антимутагенеза, под которым понимают снижение спонтанных и/или индуцированных генотоксических событий под действием экзогенных соединений.

Впервые явление антимутагенеза было продемонстрировано А. Новиком и Л. Сцилардом в начале 50-х годов прошлого столетия в эксперименте со снижением спонтанного мутирования у *E.coli* под действием аденозина. С этого момента начался активный поиск и изучение соединений, обладающих способностью снижать спонтанный или индуцированный мутагенез, объединенных термином «антимутаген». На ранних этапах развития (1960–1980 годы) значительный вклад в развитие исследований по антимутагенезу внесли отечественные исследователи, обобщившие собственный экспериментальный материал и мировой опыт в монографиях «Антимутагенез» за авторством Гончаровой Р.И. (1974 г.) и Алекперова У.К. (1984 г.), а также монографии Арутюняна Р.М. «Модификация химического мутагенеза в клетках человека» (1985 г.).

На сегодняшний день нет единой базы или обобщающих работ, позволяющих оценить количество всех выявленных антимутагенов. По состоянию на конец

2025 г. на запрос с ключевым словом “antimutagenic” база PubMed выдает более 4000 ссылок, с ключевым словом “antigenotoxic” – более 1000. Таким образом, можно утверждать по меньшей мере о 5000 идентифицированных агентах с антимуtagenной активностью. Сведения об антимуtagенах, чья активность выявлена и/или подтверждена в экспериментальных исследованиях *in vivo* и/или для которых защитные эффекты продемонстрированы у человека, обобщены в недавней монографии [3], ключевые моменты из которой отражены ниже.

Анализ экспериментальных исследований.

Антимуtagены

Анализ более 500 исследований *in vivo* показал, что в 46% случаев на антимуtagenную активность изучались продукты, получаемые из растительного сырья (экстракты, настойки, соки), в 41% работ оценивали эффекты отдельных соединений растительного происхождения. Ксенобиотики, включая лекарства, оценивались на антимуtagenность в 8% исследований, метаболиты – в 4%, а пищевые продукты – в 2% работ.

Используемые тест-системы

Антимуtagenные эффекты чаще всего оценивали с использованием в качестве тест-объекта мышей (75% работ) и крыс (22%), а также сирийских хомяков (1%), в единичных исследованиях кроликов и цыплят-бройлеров (суммарно 2%). В экспериментах использовались мыши разных сток и линий, чаще всего Swiss (42%), BALB/c (8%), C57BL/6 (9%), менее часто использовали мышей CD-1 (3%), NIH (2%), беспородных (2%), совсем редко, в 7% случаев, других линий мышей, включая трансгенных. В 2% исследований авторы ограничивались указанием объекта исследования («мыши») и не приводили дополнительных характеристик. В экспериментах на крысах использовали животных линий Wistar (16%), Sprague-Dawley (2%), беспородных (2%), другие, включая трансгенных животных, около 1%. В подавляющем большинстве исследования проводили на самцах (84%), реже на самках (16%), в ряде работ на обоих видах животных (10%).

Используемые конечные точки и ткани

Более чем в половине исследований авторы в качестве конечной точки генотоксичности использовали микроядра (64%), из которых в клетках костного мозга 46% исследований, в периферической крови 23%, в гепатоцитах 3%. В некоторых случаях параллельно оценивали уровень микроядер в нескольких тканях. Учет хромосомных aberrаций, преимущественно в клетках костного мозга, применялся в 26% работ, оценку повреждений ДНК методом ДНК-комет использовали в 20% работ. Последнюю проводили в клетках костного мозга (18%), периферической крови (21%), гепатоцитах (5%), реже в других клетках. В 28% работ авторы учитывали сразу два биомаркера генотоксичности, при этом чаще в рамках одного исследования использовали метод ДНК-комет и учет микроядер (17,5%), реже – учет микроядер и хромосомных aberrаций (7,6%).

Единичны работы, в которых антимуtagenные эффекты оценивались в половых или эмбриональных клетках. Примечательно, что с помощью некогда широко распространенного метода учета доминантных летальных мутаций (OECD TG478) выполнено только одно исследование, в котором анализировались эффекты аминобензотриазола. Другие посвящены цитогенетическому анализу в сперматоцитах и сперматиде, и лишь одно – в ооцитах мышей.

Режимы введения и дозы исследуемых соединений

Наиболее часто в исследованиях применяли предварительное (предобработка) или одновременное совместное введение потенциального антимуtagена с используемым индуктором генотоксичности. При этом прослеживается тенденция к выбору многократного предварительного введения антимуtagенов с последующим однократным введением мутагена. Подобная схема имитирует реальные условия возможной антимуtagенной профилактики и особенно часто применяется при тестировании соединений природного происхождения и компонентов пищи. Значительно меньше исследований проведено с многократным совместным введением антимуtagена и индуктора генотоксичности, и менее чем в 10% исследований использован режим

постобработки, предусматривающий введение антимутагена после воздействия индуктора. Вместе с тем потребность в антимутагенах, проявляющих протекторную активность при указанных режимах введения, очевидна. В первом случае – это применение для защиты в условиях перманентной генотоксической нагрузки (вредные производства или проживание в экологически неблагоприятных районах), во втором случае – применение *post factum* в ситуациях, когда генотоксическое воздействие невозможно спрогнозировать, как, например, техногенные катастрофы.

Предполагаемые механизмы антимутагенеза

Очевидно, что большинство антимутагенов по своей природе обладают мультитаргетностью защитных эффектов. При этом они обладают специфичностью защитного действия, вытекающей как из фармакокинетических и фармакодинамических свойств самого антимутагена, так и аналогичных характеристик генотоксиканта. Это весьма затрудняет рассмотрение механизмов антимутагенеза, однако с некоторыми допущениями и при формальном рассмотрении возможно выделить несколько наиболее общих механизмов (таблица 1.8).

Таблица 1.8 – Возможные механизмы, наиболее часто используемые для объяснения защитных эффектов природных и синтетических антимутагенов

Механизм защиты	Пути реализации действия и примеры
Влияние на концентрацию генотоксиканта в области мишени	Снижение поступления мутагенов через «входные ворота» организма/ускорение эвакуации мутагенов из организма, ингибирование образования мутагенов их экзогенных не мутагенных предшественников, ингибирование проникновения мутагенов в клеточное ядро. Например, за счет: <ul style="list-style-type: none"> – абсорбции мутагенов (пищевые волокна, пектины); – усиления моторики кишечника (пищевые волокна, пектины); – взаимодействия с образованием неактивного комплекса (альфа-маннан с афлатоксином В₁); – ингибирования реакций нитрозирования содержимого желудка (аскорбиновая кислота, полифенолы); – взаимодействия с электрофильными формами мутагенных метаболитов (серосодержащие соединения); – влияния на активность белков-транспортеров, например, известны индукторы и ингибиторы Р-гликопротеина.

Влияние на реакционную способность мутагена	Ингибирование ферментативной активации не прямых мутагенов и/или увеличение активности детоксицирующих ферментов I и II фазы метаболизма. Среди известных антимутагенов подобной активностью обладают изотиоцианаты, индолы, флавоноиды и многие другие.
Продолжение Таблицы 1.8	
Антиоксидантные воздействия	– Ингибирование разветвления и обрыв цепи свободно-радикального окисления; – Инактивация активных форм кислорода; – Хелатирование металлов переменной валентности; – Увеличение эффективности ферментативной антиоксидантной защиты и /или пула эндогенных антиоксидантов. Приписывается подавляющему большинству известных антимутагенов, наиболее яркие примеры – витамины-антиоксиданты и полифенолы.
Репарагенные воздействия	Детальные механизмы неизвестны, приписывается кумаринам, ванилину, кофеину, N-ацетилцистеину, тиолам, аскорбиновой кислоте и некоторым другим соединениям.
Индукция апоптоза	– Индукция каспаз, P53, BAX (индолы); – Ингибирование циклин-зависимой киназы 6 (индолы); – Снижение/подавление BCL-2 и NF-kB (изотиоцианаты, флавоноиды, серосодержащие соединения); – По неустановленным механизмам (эритропоэтин, фенэтилизотиоцианат).
Увеличение содержания эндогенных антимутагенов	На сегодняшнем этапе в качестве эндогенных антимутагенов следует рассматривать интерфероны, убихиноны, мелатонин, глутатион, желчные кислоты. Содержание отдельных из них может регулироваться фармакологически. Например, индуктор интерферонов амиксин обладает выраженной антимутагенной активностью (собственные не опубликованные данные).
Стабилизация структуры ДНК и/или акцепции энергии с генетической мишени и/или экранирование нуклеофильных участков ДНК	Детальные механизмы неизвестны, приписывается полифенолам.

Опыт применения антимутагенов у человека

Известно чуть более 150 исследований, посвященных оценке модификации генотоксичности под влиянием приема человеком экзогенных соединений и/или их комплексов. Большая часть этих исследований выполнена методом ДНК-комет в клетках периферической крови или других клетках (колоноцитах, уротелиальных клетках из мочи и др.). Микроядерным анализом в клетках периферической крови или буккального эпителия выполнено 26% исследований, с использованием метода учета хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови и клетках буккального эпителия 3%. Только в 3% случаев исследователи использовали более чем один метод, при этом чаще всего сочетали метод ДНК-комет и микроядерный

анализ. В исследованиях участвовали мужчины и женщины, часто в смешанных группах. В большинстве исследований оценивалось влияние тех или иных антимутоксигенов на спонтанный уровень показателей генотоксичности у здоровых добровольцев и у курильщиков. Ряд антимутоксигенов был исследован у лиц с профессиональными вредностями, а также у лиц пожилого возраста, при менопаузе, избыточном весе, сахарном диабете, хронических заболеваниях почек, в комплексной терапии некоторых заболеваний.

Однократный прием антимутоксигена использовали только в 5% случаев, в остальных случаях применялся курсовой прием потенциального антимутоксигена. Самую большую группу составляют исследования, посвященные оценке эффектов соединений и комплексов природного происхождения (51%). В одних использовали витамины и их комплексы (38%), в других – продукты питания (38%). Синтетические химические соединения, представленные в основном лекарственными средствами, исследовали только в 7 работах.

Направления развития антимутоксигенных исследований

На основе накопленного экспериментального и практического опыта выделяются два главных направления применения антимутоксигенов – фармакологическое и нутрициологическое. Первое базируется на изучении механизмов, вычленении возможной мишени, анализе дозовых и временных зависимостей проявления антимутоксигенных эффектов и предполагает создание фармакологических корректоров, специфичных в отношении одного или группы сходных генотоксикантов. С этой целью в полной мере применима методология экспериментальных фармакологических исследований. Область адресного применения фармакологических антимутоксигенов весьма широка. Это коррекция генотоксических эффектов незаменимых лекарств, в том числе защита нецелевых органов/тканей при химиотерапии для предупреждения вторых первичных опухолей, снижение/предупреждение генотоксического риска при ряде медицинских процедур (гемодиализ и др.), профессиональных вредностях (космические полеты, контакты с заведомыми генотоксикантами), а также при заболеваниях, сопровождающихся эндогенной генотоксичностью.

Второе, нутрициологическое, предполагает повышение неспецифической резистентности организма, например, за счет оптимизации и/или ликвидации дефицитов витаминной/микронутриентной обеспеченности, либо за счет поступления веществ, выполняющих антиоксидантные функции и/или обеспечивающих оптимизацию энергетического и пластического обмена или ускоренной эвакуации генотоксикантов (пищевые волокна и пр.). Возможная область применения таких антимутагенов – коррекция низкоуровневых генотоксических воздействий, например, у лиц, проживающих в экологически неблагоприятных районах.

Большинство исследований на текущий момент направлены на разработку нутрициологических антимутагенов, предусматривающих преимущественно витаминно- и диетопрофилактику генотоксических эффектов. Это объяснимо тем, что подобные исследования требуют существенно меньше организационных усилий в сравнении с полноценными клиническими испытаниями. Использованию фармакологических корректоров антимутагенеза посвящены лишь единичные исследования.

*Таким образом, пока 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 антимутагенной защиты человека и указывают на перспективы дальнейших работ в этом направлении. Расширение контингента лиц, подвергающихся значительным генотоксическим нагрузкам, а также патологий и патологических состояний, при которых наблюдается выраженная эндогенная генотоксичность, сегодня определяют необходимость сосредоточения усилий в области разработки фармакологических антимутагенов. Основу для проведения исследований в этом направлении должна составить современная методология генотоксикологических исследований и ее методическая база. Анализ исследований за последнее десятилетие демонстрирует стремительно расширяющееся применение с этой целью метода регистрации повреждений ДНК – метода ДНК-*

комет, что еще более актуализирует устранение его вышеобозначенных методических пробелов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 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».

2.2 Исследуемые вещества

В исследовании использованы следующие вещества: бетаин (Sigma-Aldrich, США); аспартам (Ajinomoto, Япония); лекарственный препарат «Афобазол» (фабомотизол) (Отисифарм, Россия); метформин (Тева, Израиль); апигенин, нарингенин, гесперетин, бетанин производства 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 ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» 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).

2.3 Реактивы

В исследовании использованы реактивы: стрептозоцин, метилметансульфонат, циклофосфамид, 3,5-дииодсалицилат лития, дитиотреитол, среда M2, гиалуронидаза, коллагеназа и липополисахарид из *E.coli* (Sigma-Aldrich, США); митомицин С (Kyowa, Япония); этопозид (Cayman Chemical, США); смесь для ПЦР qPCRmix-HS LowROX (Евроген, Россия); диоксидин (Валента-Фарм, Россия); темозоломид (Masklin, КНР); формадиодипиримидин-ДНК-гликозилаза (Fpg) и терминальная трансфераза TdT (New England Biolabs, Великобритания); набор реагентов GeneJET™ для выделения ДНК из клеток и тканей млекопитающих (Thermo Fisher Scientific, США); колхицин (Acros Organics); SYBR Green I (Invitrogen); EDTA-Na₂, Tris-HCl, диметилсульфоксид, KCl, NaCl, Triton X-100, агароза тугоплавкая и легкоплавкая (Panreac, Испания); фосфатно-солевой буфер и среда DMEM (Gibco); праймеры и TAMRA-dUTP («ДНК-синтез», Россия); PG 600 и Хорулон (Intervet, Нидерланды); набор «Human 8-oxoguanine DNA Glycosylase (OGGI) FLARE Assay» (R&D Systems Inc., США); набор для выделения РНК «SV Total RNA Isolation System» (Promega, США); набор для получения кДНК First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Латвия).

2.4 Метод ДНК-комет

2.4.1 Общая процедура проведения метода ДНК-комет

В исследованиях *in vivo* после эвтаназии лабораторных животных максимально быстро выделяли анализируемые органы/ткани и измельчали их в предварительно охлажденном до 4°C фосфатно-солевом буфере, содержащем 20 мМ EDTA-Na₂ и 10% диметилсульфоксида (рН 7,4). Пробирки выдерживали 5 мин при комнатной температуре для осаждения крупных фрагментов ткани. Костный мозг из бедренных костей после удаления эпифизов вымывали в 1,5 мл этого же буфера.

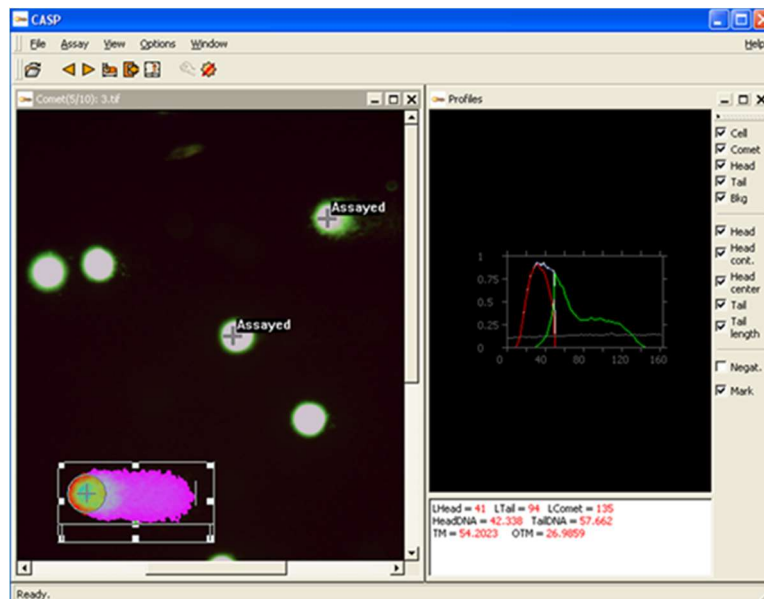
Суспензии клеток в объеме 30 мкл вносили в пробирки с 120 мкл 1% раствора легкоплавкой агарозы в фосфатно-солевом буфере (42°C, термостат «Термит», Россия) и ресуспендировали. Затем по 30 мкл раствора агарозы с клетками наносили на каждую половину предварительно покрытых 1% универсальной агарозой стандартных для микроскопии предметных стекол, накрывали покровным стеклом (24×24 мм) и помещали на лед. Далее все операции проводили в затемненном помещении при желтом свете. После затвердевания агарозы (~5 минут) покровные стекла осторожно удаляли, гель-слайды помещали в стеклянную кювету типа Шиффендекер, заполненную охлажденным до 4°C лизирующим буфером (10 мМ Tris-HCl (рН 10), 2,5М NaCl, 100 мМ EDTA-Na₂, 1% Triton X-100, 10% диметилсульфоксида) и инкубировали не менее 1 часа.

В щелочной версии метода после окончания лизиса микропрепараты переносили в охлажденный до 4°C раствор для электрофореза (300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA-Na₂, рН>13) и инкубировали в холодильнике в течение 20 минут для щелочной денатурации ДНК и реализации щелочно-лабильных сайтов. После этого микропрепараты переносили в камеру для электрофореза, заполненную свежим охлажденным раствором, и проводили электрофорез в течение 20 минут при напряженности поля 1 В/см и силе тока ~300 мА. В экспериментах с рециркуляцией электрофорезного раствора использовали перистальтический насос В3-V PER (Etatron D.S., Италия) с устойчивым к щелочным растворам шлангом из сантопрена (Santoprene®). По окончании электрофореза гель-слайды переносили в стеклянную

кювету, отмывали в течение 10 мин в фосфатно-солевом буфере и фиксировали 70% раствором этилового спирта в течение 10 минут. После фиксации гель-слайды высушивали и хранили до анализа при комнатной температуре.

В нейтральной версии метода гель-слайды после лизиса переносили в камеру с 90 мМ Трис-боратным буфером (рН 7,5), содержащим 2 мМ EDTA-Na₂, проводили электрофорез в течение 10 мин при напряженности поля 1 В/см, отмывали и фиксировали как указано выше.

Перед микроскопированием микропрепараты окрашивали флуоресцирующим красителем SYBR Green I (1:10000 TE-буфер в 50% глицерине, рН 8,5) в течение 30 минут в темноте. Анализ проводили на эпифлуоресцентном микроскопе Микмед-2 12Т («Ломо», Россия), совмещенном с цифровой камерой высокого разрешения (VEC-335, «ЭВС», Россия), при увеличении ×200. Изображения ДНК-комет анализировали с использованием программного обеспечения CASP 1.2.2 [219] (рисунок 2.1). В качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте ДНК-комет – %ДНК в хвосте. С каждого микропрепарата снимали и анализировали не менее 100 ДНК-комет.



Примечание – На анализируемой ДНК-комете дифференцированы ее голова и хвост.

Рисунок 2.1 – Анализ изображений ДНК-комет в программной среде CASP

Атипичные ДНК-кометы исключали из общего анализа и отдельно подсчитывали их процентное содержание на 500 проанализированных ДНК-комет.

2.4.2 Инструментальный анализ технических параметров электрофореза

Определение фактической напряженности электрического поля в камерах проводили измерением разности потенциалов в электрофорезном растворе на высоте ~1 мм над слайдами с использованием цифрового мультиметра (Mastech MAS838, КНР) с позолоченными щупами.

Измерение температуры электрофорезного раствора во время электрофореза проводили с помощью цифрового пирометра DT-8860B (СЕМ, КНР), цифрового термометра MS6501 (Precision Mastech Enterprise) и с помощью высокоразрешающего инфракрасного термографа, работающего в режиме реального времени. В последнем случае использовалась ИК-камера охлаждаемого типа с матрицей фокальной плоскости («TITANIUM», CEDIP, Франция), обладающая чувствительностью в спектральном диапазоне 3–5 мкм и с пространственным разрешением 320×256 пикселей. Чувствительность по температуре (ограниченная шумовым эквивалентом разности температур) составляла не менее 0,01°С в прямом режиме измерений при частоте съемки 50 кадров в секунду. ИК-камера была откалибрована в диапазоне температур 10–60°С с точностью 0,2°С. Камера была оснащена 25-мм ИК-объективом. Расстояние между объективом ИК-камеры и поверхностью электрофоретического раствора составляло 25 см. Цифровая обработка ИК-изображений выполнялась с использованием программного пакета «Альтаир», который позволял рассчитывать температурные профили и динамику температуры в заданной области в зависимости от времени.

2.4.3 Селективная детекция поврежденных оснований ДНК методом ДНК-комет

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), вносящей разрывы в ДНК в местах с поврежденными пуриновыми основаниями [235] и 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека (набор «Human 8-oxoguanine DNA Glycosylase (OGG1) FLARE Assay»), вносящей разрывы в ДНК в местах локализации 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина.

На каждую экспериментальную точку готовили по два гель-слайда. По окончании лизиса гель-слайды промывали трижды по 5 мин в буфере, содержащем 40 мМ HEPES (pH 8,0), 0,1 М KCl, 0,5 мМ EDTA-Na₂ и 0,2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. После последней промывки на один гель-слайд наносили 50 мкл раствора фермента Fpg или hOGG1 в том же буфере (1:800) и накрывали покровным стеклом. На второй гель-слайд наносили 50 мкл буфера. Гель-слайды помещали в подогретую до 37°C влажную камеру и инкубировали при 37°C в течение 30 минут. Далее проводили электрофорез в щелочной версии, фиксацию, окраску и анализ микропрепаратов, как описано выше. Относительный уровень Fpg-чувствительных и hOGG1-чувствительных сайтов определяли как соотношение показателя %ДНК в хвосте для ДНК клеток, обработанных ферментом к таковому для ДНК, обработанной только буфером для фермента (кратность превышения показателя).

2.5 Получение гель-слайдов ДНК-комет ооцитов и одно- и двухклеточных эмбрионов мышей

Получение ооцитов мышей. Исследование выполнено на мышах F₁ CBA×C57Bl/6. Индукцию суперовуляции с целью получения достаточного количества ооцитов проводили методом гормональной стимуляции, осуществляемой последовательным введением PG600 – комбинированного гормонального препарата, содержащего сывороточный и хорионический гонадотропина, и хорионического гонадотропина Хорулон. PG600 в виде водного раствора вводили внутривентрально однократно в дозе 5 МЕ/мышь. Для индукции овуляции Хорулон в виде водного раствора вводили внутривентрально однократно в дозе 5 МЕ/мышь через 48 часов после введения PG600.

После эвтаназии животных яичники с яйцеводами переносили в капли среды M2 и под стереомикроскопом (Stemi DV4, Carl Zeiss, Германия) с помощью препаровальной иглы вскрывали ампулы яйцеводов. Вышедшие в ооцит-кумуляном комплексе ооциты микрокапиллярной пипеткой (EZ-Grip, RI, Великобритания) переносили в каплю среды, содержащую 150 МЕ/мл гиалуронидазы тип II и инкубировали 20 минут при комнатной температуре. Ооциты отмывали от фермента и кумулюсных клеток путем последовательного переноса через 6–8 капель свежей среды M2. Для удаления зоны пеллюцида ооциты инкубировали в 0,025% растворе коллагеназы Тип I в течение 20 минут с последующей последовательной отмывкой от фермента в 6–8 каплях среды M2.

Гель-слайды получали стандартным способом (2 слоя агарозы) и способом, включающим нанесение 3-го дополнительного слоя агарозы. Во втором случае после описанных выше манипуляций, по 40–45 ооцитов в небольшом объеме среды вносили в 30 мкл 1% раствора легкоплавкой агарозы, подогретой до 37°C (термостат «Термит», Россия) и аккуратно распределяли каплю по стеклу с помощью наконечника автоматической пипетки (второй слой агарозы). После затвердевания второго слоя наносили третий слой из 30 мкл 1% легкоплавкой агарозы и сверху накрывали покровным стеклом (24×24 мм), после чего гель-слайды помещали на хладоэлемент на 3 мин до затвердевания геля. Далее метод ДНК-комет на полученных гель-слайдах проводили в различной вариации (глава 3, раздел 3.2).

Получение одно- и двухклеточных эмбрионов мышей. Исследование выполнено на самках и самцах мышей F₁ CBA×C57Bl/6. Индукцию суперовуляции с целью получения достаточного количества эмбрионов проводили методом гормональной стимуляции, осуществляемой последовательным введением PG600 – комбинированного гормонального препарата, содержащего сывороточный и хорионический гонадотропины, и хорионического гонадотропина Хорулон. PG600 в виде водного раствора вводили внутрибрюшинно однократно в дозе 5 МЕ/мышь. Для индукции овуляции Хорулон в виде водного раствора вводили внутрибрюшинно однократно в дозе 5 МЕ/мышь через 48 часов после введения

PG600. Самок в тот же день подсаживали к самцам на ночь из расчета 1:1. Оплодотворение определяли утром по наличию копуляционной пробки, после чего самок отсаживали в отдельную клетку до момента вскрытия животных и извлечения эмбрионов (рисунок 2.2).

После эвтаназии животных яйцеводы извлекали и помещали в капли среды M2. Осторожно разрывали верхний отдел отпрепарированных яйцеводов. Вышедшие одноклеточные и двухклеточные эмбрионы с помощью микропипетки переносили через 6–8 капель свежей среды.

В экспериментах *in vitro* полученные эмбрионы помещали в капли среды M2, содержащей генотоксиканты. Эмбрионы группы контроля инкубировали в каплях среды M2, содержащей соответствующий растворитель. По окончании инкубации, в экспериментах с удалением зоны пеллюцида, эмбрионы помещали в капли среды, содержащие 0,025% раствор коллагеназы тип I, и инкубировали в течение 15 минут. Эмбрионы далее использовали для получения микропрепаратов ДНК-комет. Для контроля проведения метода ДНК-комет в экспериментах *in vitro* использовали клетки костного мозга мышей, экспонированные теми же генотоксикантами.

В экспериментах *in vivo* эмбрионы, полученные от контрольных и экспонированных генотоксикантами самок, использовали для получения микропрепаратов ДНК-комет. Гель-слайды получали стандартным способом (2 слоя агарозы) и способом, включающим нанесение 3-го дополнительного слоя агарозы. Во втором случае после описанных выше манипуляций, по 40–45 одноклеточных или двухклеточных эмбрионов в небольшом объеме среды вносили в 30 мкл 1% раствора легкоплавкой агарозы, подогретой до 37°C (термостат «Термит», Россия) и аккуратно распределяли каплю по стеклу с помощью наконечника автоматической пипетки (второй слой агарозы). После затвердевания второго слоя наносили третий слой из 30 мкл 1% легкоплавкой агарозы и сверху накрывали покровным стеклом (24×24 мм), после чего гель-слайды помещали на холодоэлемент на 3 мин до затвердевания геля. Далее метод ДНК-комет на полученных гель-слайдах проводили в различной вариации (глава 3, раздел 3.2).

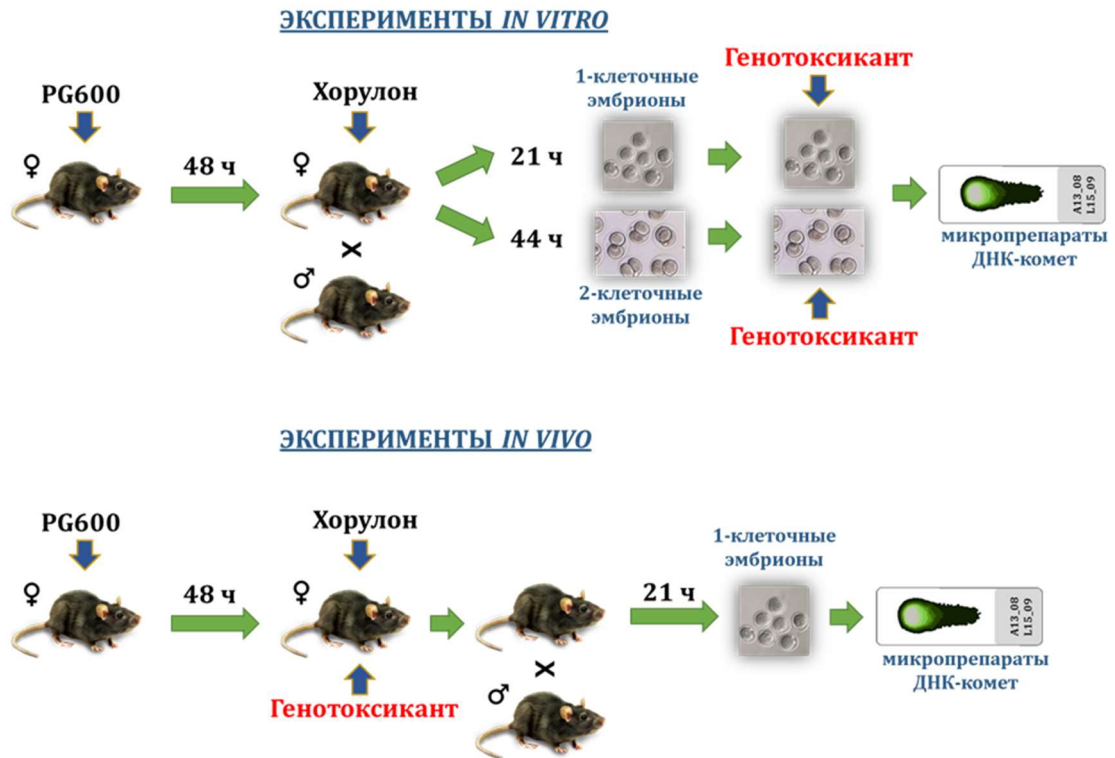


Рисунок 2.2 – Схема *in vitro* и *in vivo* экспериментов на одно- и двухклеточных эмбрионах мышей

2.6 Метод ДНК-комет в сперматозоидах мышей

Исследование выполнено на самцах мышей F₁ СВА×С57В1/6. После эвтаназии животных извлекали семенники, отделяли каудальные отделы эпидидимиса (*cauda epididymis*), разрезали их пополам, помещали в 1 мл подогретой до 37°C среды DMEM и инкубировали в термостате в течение 15 минут. Суспензию высвобожденных эпидидимических сперматозоидов, не захватывая ткань эпидидимиса, переносили в микроцентрифужные пробирки и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант удаляли и осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере с 20 мМ EDTA-Na₂ и 10% диметилсульфоксидом (pH 7,5). Процедуру получения гель-слайдов и лизиса проводили как описано в разделе 2.4.1. По окончании лизиса проводили процедуру деконденсации хроматина сперматозоидов. Для этого гель-слайды отмывали в фосфатно-солевом буфере и инкубировали в 10 мМ растворе дитиотреитола при 4°C в течение 30 мин с последующей инкубацией в одном из вариантов: 1) в 4 мМ растворе 3,5-дииодсалицилата лития при 20°C в течение 90 мин; 2) в 20 мг/мл

растворе протеиназы К при 37°C в течение 60 мин; 3) в 200 МЕ/мл гепарина при 37°C в течение 30 мин; 4) без последующей инкубации. После этого проводили электрофорез в нейтральных условиях и в различных вариантах щелочных условий – в 300 мМ NaOH и 1 мМ EDTA-Na₂ при значениях pH 12,1; 12,6 и >13. Также проводили стандартную процедуру щелочной денатурации и электрофореза без этапа деконденсации хроматина.

2.7 Оценка поврежденности митохондриальной ДНК

Оценку поврежденности митохондриальной ДНК (мтДНК) проводили методом ПЦР в режиме реального времени [247]. Для этого из образцов анализируемых тканей выделяли тотальную ДНК с помощью набора GeneJET™ (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрацию выделенной ДНК в пробах определяли с помощью набора dsDNA BR kit (Invitrogen, США) на флуориметре Qubit 4 (Invitrogen, США).

Количественный анализ проводили методом ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific). Реакции амплификации проводили в объеме 20 мкл в стандартных 8-луночных стрипах. Реакционная смесь включала 2 мкМ интеркалирующего красителя SYBR Green I, 50 нМ пассивного красителя ROX, 1X смеси для высокоточной ПЦР qPCRmix-HS LowROX, по 0,5 мкМ прямого и обратного праймера и 10 нг ДНК. Использовали праймеры для D-петли мтДНК мыши [247]:

F` общий прямой – AAGAAGGAGCTACTCCCCACC;

R` обратный для длинного фрагмента – GTTGACACGTTTTACGCCGA;

R` для короткого фрагмента – AGCTTATATGCTTGGGGAAAATAGT.

Температурный профиль реакции: 98°C – 1 мин; 35 циклов: (98°C– 10 с, 61°C – 30 с, 72°C – 15 с для короткого фрагмента и 90 с для длинного фрагмента); 72°C – 10 мин.

Оценивали разницу показателей Ct между длинным и коротким фрагментами для контрольной (ΔC_{t_k}) и опытной (ΔC_{t_o}) мтДНК. Уровень поврежденности ДНК,

представленный как количество повреждений мтДНК на 10 т.п.о., высчитывали по формуле:

$$\text{Повреждений на 10 т. п. о.} = \left(1 - 2^{-(\Delta C_{to} - \Delta C_{tk})}\right) \times \frac{10\ 000}{\text{Длина фрагмента (п. о.)}}$$

2.8 Метод цитогенетического анализа в клетках костного мозга мышей *in vivo*

Во всех вариантах экспериментов за 2,5 часа до забоя животным вводили колхицин в дозе 4 мг/кг с целью подавления формирования ахроматинового веретена и накопления клеток на стадии метафазы. Цитогенетические препараты костного мозга бедренных костей готовили стандартным суховоздушным методом [248]. После эвтаназии максимально быстро выделяли бедренные кости, срезали эпифизы и вымывали клетки костного мозга гипотоническим раствором (0,55% KCl), предварительно подогретым до 37°C. После инкубации при 37°C в течение 15 минут клеточную взвесь центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин (ELMI CM-6MT, Латвия). После удаления супернатанта осадок ресуспендировали и добавляли 3 мл предварительно охлажденного фиксатора, состоящего из смеси этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1). Клетки инкубировали 10 минут в холодильнике. Далее после повторного центрифугирования проводили смену фиксатора (3 мл). После этого клетки инкубировали в холодильнике еще 20 минут. Взвесь вновь центрифугировали, удаляли супернатант, осадок ресуспендировали в 0,5 мл вновь добавленного фиксатора и наносили на предварительно обезжиренные влажные и охлажденные стекла, которые высушивали в пламени спиртовой горелки. Окраску производили азур-эозином. Состав красителя включал: 5 частей азура (0,1%), 2 части эозина (0,1%), 10 частей дистиллированной воды. Время окраски – 20 минут.

Анализ проводили на микроскопе Standart-20 (Carl Zeiss, Германия) при маслоиммерсионном увеличении $\times 1000$. Учитывали клетки с ахроматическими пробелами (гепами), хроматидными и хромосомными фрагментами, обменами различного типа [249]. В отдельную категорию выделяли метафазы с

множественными повреждениями, имеющие более пяти хромосомных aberrаций. Каждая экспериментальная группа включала по 4–5 животных, от каждого животного анализировалось по 100 метафаз.

2.9 Модели стрептозоцин-индуцированного диабета

В исследовании использовали самцов мышей BALB/c. Диабет моделировали внутрибрюшинным введением стрептозоцина в двух режимах: однократно в дозе 200 мг/кг или 5-кратно в дозе 40 мг/кг [250]. Раствор стрептозоцина готовили непосредственно перед введением в 50 мМ цитратном буфере (рН 4,5). Контроль гипергликемии осуществляли при эвтаназии при помощи сертифицированного глюкометра Акку-Чек Актив (Roche, Германия).

В случае с однократным введением за 4 часа до введения стрептозоцина удаляли корм из клеток. После введения стрептозоцина заменяли питьевую воду на 10% раствор сахарозы и насыпали корм. На третьи сутки после введения 10% раствор сахарозы заменяли на обычную воду. Эвтаназию животных осуществляли на 10 и 21 день после введения стрептозоцина.

В случае с многократным введением за 4 часа до введения стрептозоцина удаляли корм из клеток. После введения стрептозоцина заменяли питьевую воду на 10% раствор сахарозы и насыпали корм. Следующие 4 введения выполняли через каждые 24 часа, удаляя еду за 4 часа до введения. Через сутки после последнего введения 10% раствор сахарозы заменяли питьевой водой. Эвтаназию животных осуществляли на 14 и 28 день после последнего введения стрептозоцина. Выделенные образцы органов/тканей анализировали на поврежденность ядерной и митохондриальной ДНК.

2.10 Модель алкогольной кардиомиопатии

Исследование проведено на беспородных белых самцах крыс, масса тела которых на начало эксперимента составляла 180–200 г, к окончанию эксперимента – 400–650 г.

Трансляционная модель алкогольной кардиомиопатии была разработана в «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» [251]. Животные принудительно подвергались алкоголизации посредством предоставления в течение 24 недель в качестве единственного источника жидкости 10% водного раствора этанола. На протяжении всего исследования еженедельно регистрировали количество потребляемого этанола (г/кг). Далее были отобраны крысы, активно потребляющие физиологически значимое количество 10% раствора этанола, составляющего в пересчете на чистый 5,0–6,5 г/кг в сутки. Животным прекращали доступ к алкоголю, переводили на обычный рацион питания и содержали еще в течение 28 дней для развития абстиненции. Эхокардиографически верифицировали развитие кардиомиопатии, воспроизводящей основные клинико-диагностические признаки этого заболевания: дилатацию правого и левого желудочков сердца, жировую дистрофию миокарда, снижение инотропной функции сердца. После эвтаназии животных выделяли сердце для анализа на поврежденность ДНК методом ДНК-комет.

Часть образцов миокарда крыс использовали для оценки апоптоза на парафиновых срезах методом мечения терминальной трансферазой (TUNEL). Образцы фиксировали в 10% растворе формалина и после стандартной проводки сердца в парафиновые блоки готовили гистологические срезы толщиной 5 мкм. Срезы помещали на стекло с покрытием из поли-L-лизина и проводили стандартную процедуру депарафинирования. Демаскирование проводили нагреванием срезов в микроволновой печи в течение 45 секунд при мощности излучения 1000 Вт в 200 мл 0,01 М цитратного буфера (pH 6,0), содержащего 0,1% Triton X-100. После микропрепараты охлаждали добавлением 80 мл дистиллированной воды и дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4) и однократно дистиллированной водой.

На каждый микропрепарат наносили 50 мкл реакционной смеси, включающей 1,5 ед. терминальной трансферазы TdT, 0,25 mM хлорида кобальта и 10 мкМ TAMRA-dUTP в 1X реакционном буфере для TdT. Микропрепараты накрывали покровным стеклом и помещали во влажную камеру и инкубировали

1 час при 37°C. Далее препараты дважды отмывались дистиллированной водой. Хроматин ядер кардиомиоцитов контрастировали красителем SYBR Green I.

Микроскопирование проводили на микроскопе AxioImager M2 (Carl Zeiss, Германия) с набором фильтров для FITC (SYBR Green I) и родамина (TAMRA). При увеличении $\times 1000$ получали цифровые изображения с 10 полей зрения для каждого микропрепарата. Совмещенные по обоим каналам цифровые изображения (merge) получали с помощью камеры AxioCam Mrm в программе AxioVision. Рассчитывали индекс апоптоза, представляющего собой отношение числа TUNEL-позитивных ядер к общему числу кардиомиоцитов.

2.11 Модель перинатальной иммунной активации

В исследовании использовали самцов и самок аутбредных крыс Wistar. Выявление сперматозоидов во влагалищном мазке рассматривали как 1-й день беременности. В первой серии экспериментов опытным крысам внутрибрюшинно вводили липополисахарид (ЛПС) в дозе 0,25 мг/кг однократно на 16 день беременности с некропсией через 24 часа после введения. Во второй серии экспериментов опытным крысам внутрибрюшинно вводили ЛПС в дозе 0,1 мг/кг двукратно на 16 день и 17 день беременности с некропсией через 3 часа после введения. В третьей серии экспериментов опытным крысам вводили ЛПС в дозе 0,15 мг/кг двукратно на 16 день и 17 день беременности с некропсией через 6 часов после введения. В четвертой серии экспериментов ЛПС вводили в дозе 0,2 мг/кг однократно на 16 день беременности с некропсией через 3 и 6 часов после введения и 17 день беременности, с некропсией через 24 часа после введения. Крысам контрольных групп в аналогичные сроки беременности внутрибрюшинно вводили эквивалентные объемы изотонического раствора хлорида натрия.

После эвтаназии животных проводили некропсию брюшной полости и пальпаторное обследование рогов матки. Осторожно вскрывали их по наружному краю, освобождали плоды от околоплодных оболочек и отделяли от плаценты. От каждой самки отбирали по 2 эмбриона краниального и 2 каудального расположения (рисунок 2.3), которые разделяли на голову и туловище. Выделенные образцы

плаценты, головы и туловища эмбрионов анализировали на поврежденность ядерной ДНК методом ДНК-комет и поврежденность мтДНК методом ПЦР в режиме реального времени.

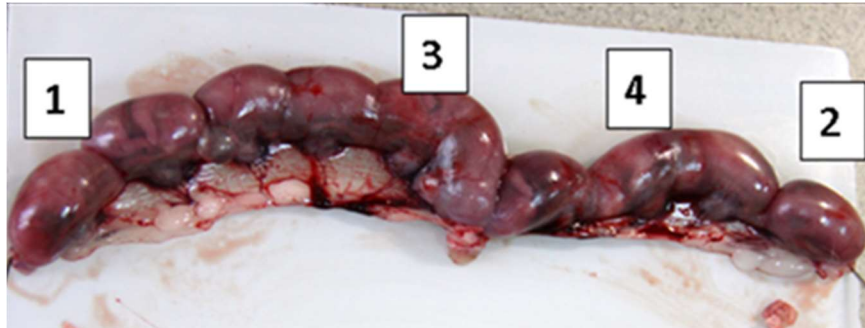


Рисунок 2.3 – Каудально (1,2) и краниально (3,4) расположенные эмбрионы в матке крыс

2.12 Клинические исследования

2.12.1 Исследования у пациентов с тяжелой травмой

Исследования проводились на базе НИИ общей реаниматологии им. В.А.Неговского ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии с согласия этического комитета учреждения. Проведено две серии исследований.

В первой серии исследований клиническая выборка пациентов включала 19 человек (13 мужчин и 6 женщин), перенесших тяжелую механическую травму и кровопотерю (22–45 мл/кг) с нарушением гемодинамики. Возраст пациентов был от 17 до 68 лет ($41,9 \pm 13,3$ лет). Пострадавшие с тяжелой черепно-мозговой травмой из исследования были исключены. Тяжесть состояния оценивали в баллах по шкале APACHE II в течение всего периода пребывания в реанимационном отделении, средняя величина при поступлении составила $19,1 \pm 5,4$ баллов. Забор образцов крови для исследования осуществляли при поступлении в реанимационное отделение (день 0), на 3, 5, 7 и 15 сутки. Группу сравнения составили 14 здоровых доноров (5 мужчин и 9 женщин) в возрасте 25–35 лет ($37,9 \pm 9,6$ лет), за 3–6 месяцев до забора крови не болевших вирусными заболеваниями, не проходивших рентгенодиагностическое обследование и не принимавших лекарственных препаратов.

Во второй серии исследований выборка пациентов состояла из 95 пациентов (67 мужчин и 28 женщин) в возрасте от 20 до 79 лет ($40,6 \pm 16,5$ лет). Все пациенты получили тяжелую механическую травму, сопровождавшуюся кровопотерей (от 100 до 4000 мл) и гемодинамическими нарушениями. Средняя массанормированная кровопотеря составила $21,5 \pm 16,5$ мл/кг. Время поступления пациентов в отделение реанимации составило $9,1 \pm 5,1$ часа (2–13 часов). В зависимости от вида травмы все пострадавшие были разделены на три группы: тяжелая скелетная травма (ТСТ) – 17 человек; черепно-мозговая травма (ЧМТ) – 43 человека; сочетанная травма (ТСТ+ЧМТ) – 35 человек, получивших одновременно тяжелую скелетную и черепно-мозговую травму.

Группу сравнения составили 8 здоровых доноров в возрасте 25–35 лет за 3–6 месяцев до забора крови не болевших вирусными заболеваниями, не проходивших рентгенодиагностическое обследование и не принимавших лекарственных препаратов. Забор образцов крови для исследования осуществляли при поступлении в реанимационное отделение (день 0), на 3, 5, 7 и 15 сутки.

В обеих сериях экспериментов забор крови для исследования у здоровых доноров производился однократно из локтевой вены, у пациентов – из подключичной вены в указанные дни наблюдения. Полученные образцы крови объемом ~2 мл смешивали с равным объемом среды RPMI-1640, содержащей 10% диметилсульфоксида, после чего замораживали и хранили до проведения анализа при температуре -20°C .

2.12.2 Исследования у пациентов с неразвивающейся беременностью

Исследования проводились на базе гинекологических отделений государственных бюджетных учреждений здравоохранения города Москва «Городская клиническая больница №1 им. Н.И. Пирогова Департамента здравоохранения города Москвы» и «Городская клиническая больница №24 Департамента здравоохранения Москвы» с согласия этических комитетов учреждений. Клиническая выборка пациентов состояла из 69 беременных женщин, объединенных в 3 группы: группа I – с диагнозом «начавшийся выкидыш»;

ретрохориальная гематома» (20 человек); группа II – с неразвивающейся беременностью (25 человек); группа III – с физиологически протекающей беременностью и с отсутствием репродуктивных потерь в анамнезе (24 человека). Критериями включения в группы беременных были: срок беременности 8–16 недель, отсутствие грубой экстрагенитальной и генитальной патологии, согласие на участие в клиническом исследовании.

Группу сравнения составили 25 здоровых небеременных женщин с отсутствием репродуктивных потерь в анамнезе, не болевших вирусными заболеваниями за 3–6 месяцев до забора крови, не проходивших рентгенодиагностическое обследование и не принимавших лекарственных препаратов.

Всем пациентам, согласно протоколу отделения гинекологического профиля, проводили стандартное клинико-лабораторное обследование, включавшее активное выявление жалоб, сбор анамнестических данных, объективный осмотр, гинекологический осмотр, стандартное лабораторное обследование, УЗИ органов малого таза. По клиническим характеристикам включенные в исследование группы были однородными. 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.

2.12.3 Клинические исследования у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ)

Исследования проводились на базе ФГБУН «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой» с согласия этического комитета учреждения.

В исследовании по оценке экспрессии гена *hOGG1* у пациентов с СКВ клиническая выборка составила 18 пациентов. Все пациенты соответствовали диагностическим критериям для СКВ Американской коллегии ревматологов (ACR). Все обследованные пациенты были женщины, в возрасте от 16 до 49 лет, средняя продолжительность заболевания – 10 лет (от 2 до 30 лет). 14 человек из 18 имели умеренную и высокую степень активности СКВ. Средняя активность по

шкале SLEDAI 2K составила $12,3 \pm 6,3$ баллов. 15 человек из 18 имели поражение почек в виде активного нефрита с нефротическим или выраженным мочевым синдромом.

Тотальную РНК выделяли из 1 мл отобранной с ЭДТА-К₃ в качестве антикоагулянта крови с использованием набора для выделения РНК (SV Total RNA Isolation System, Promega). Для получения кДНК проводили ревертазную реакцию с использованием набора First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Латвия).

Для амплификации экзонов гена *hOGG1* использовали следующие праймеры [252]:

для экзонов 1–4:

F – 5'-TCCATCCCGTGCCCTCGCTCTG-3';

R – 5'-GATGGCTCGGGCACTGGCACTCA-3';

для экзонов 4–7:

F – 5'-GCTGGGCCTGGGCTATCGTG-3';

R – 5'-CTGCGCTTTGCTGGTGGCTCCTG-3'.

Смесь для амплификации включала по 5 пМ прямого и обратного праймеров, 10 мкл 10х ПЦР буфера, 1 мМ каждого dNTP, 2 мкл кДНК и 0,5 ед. Taq-полимеразы. Процесс амплификации проводился методом мультиплексной ПЦР. Температурный профиль реакции: 95°C – 5 мин (денатурация); 27 циклов в режиме: 95°C – 1 мин, 64°C – 1 мин, 72°C – 1 мин. Для контроля за количеством выделенной мРНК использовали амплификацию гена глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH). ПЦР реакцию проводили в тех же условиях, что и для экзонов гена *hOGG1*, за исключением температуры отжига, которая составляла 52°C. Последовательности праймеров для GAPDH [253]:

F – 5`-CATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3`;

R – 5`-CCACCACCCTGTTGCTCTAGCCA-3`.

Идентификацию амплификационных фрагментов проводили электрофорезом продуктов в 8% полиакриламидном геле с последующей окраской этидиум бромидом и визуализацией фрагментов в проходящем УФ свете. Для определения возможных изменений в первичной последовательности экзонов гена

hOGGI использовали анализ в градиентном денатурирующем гель-электрофорезе (DGGE анализ). Амплификацию экзонов проводили в условиях, описанных выше, количество циклов увеличивали до 35. Электрофорез проводили на установке Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Systems (G.B.S.Scientific, Великобритания) в 8% градиентном денатурирующем геле (с градиентом денатурирующих агентов от 0 до 100 %) при 80 мА в течение 7 часов при температуре 60°C. Визуализацию фрагментов проводили путем окрашивания азотнокислым серебром.

Клиническое исследование по оценке поврежденности ДНК у пациентов с СКВ 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).

Все пациенты соответствовали диагностическим критериям для СКВ Американской коллегии ревматологов (ACR). В обеих группах преобладали женщины (97%) с заболеванием длительностью 11,5–14 лет (138–168 месяцев), преимущественно с хроническим течением (у 60–70%). Средний возраст пациентов – 36,7±11,4 лет (19–57 лет). Активность заболевания на момент включения в исследование в большинстве случаев была умеренной (II степени, у 30–47%) и низкой (I степени) (36–43%). Около 20% пациентов в обеих группах имели высокую (III степени) клинико-лабораторную активность СКВ. Средний балл активности СКВ, оцененной по шкале SLEDAI, составил 7,6 в обеих группах, что соответствует умеренной активности. На момент включения в исследование пациенты обеих групп были сравнимы по полу, возрасту, длительности и степени активности заболевания. Пульс-терапия высокими дозами метилпреднизолона проводилась равному количеству пациентов в обеих группах – 14 (47%). Циклофосфамид получали 9 человек (30%) в каждой группе.

Группу сравнения составили 14 здоровых доноров (11 женщин, 3 мужчин), не болевших вирусными заболеваниями за 3–6 месяцев до забора крови, не проходивших рентгенодиагностическое обследование и не принимавших

лекарственных препаратов. Образцы венозной крови у доноров отбирали однократно, у пациентов – до и после соответствующей терапии.

2.13 Статистическая обработка данных

В исследованиях методом ДНК-комет *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 aberrантных 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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

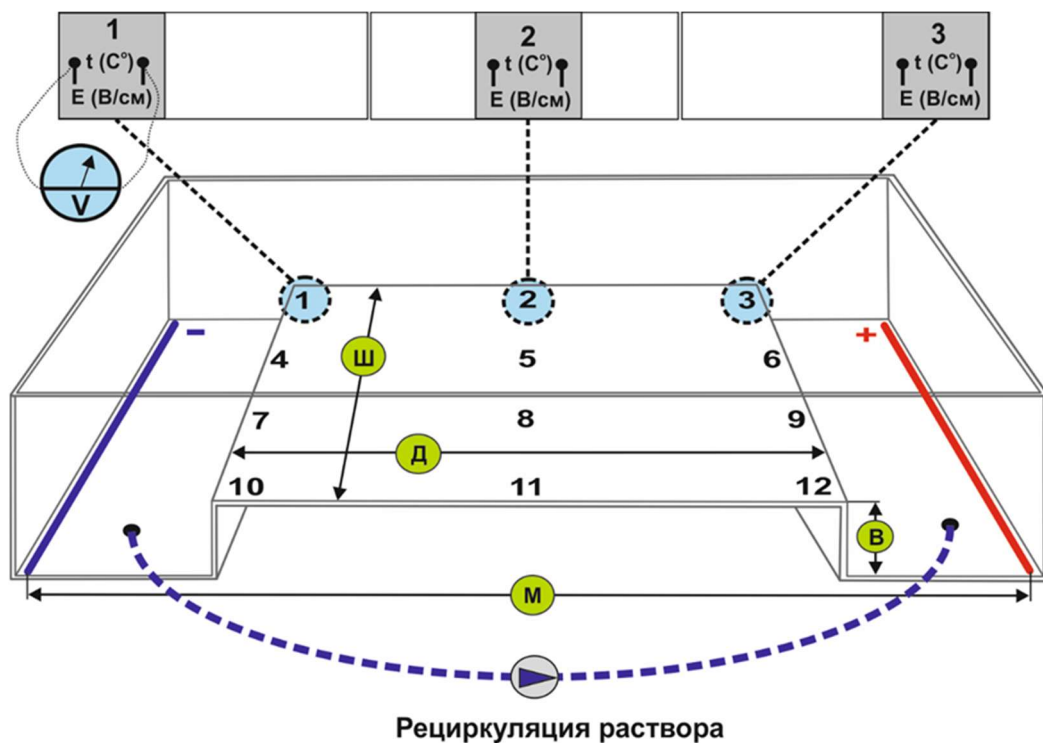
Ключевыми требованиями к любому методу являются его точность и воспроизводимость. Для метода ДНК-комет серьезной проблемой остается значительная вариабельность данных, как внутрилабораторная – внутри- и между сериями экспериментов, так и межлабораторная, что зачастую приводит к получению неоднозначных или противоречивых результатов. В ходе масштабных исследований по валидации метода был определен ряд факторов (концентрация агарозного геля, длительность щелочной денатурации/электрофореза, напряженность электрического поля во время электрофореза), определяющих причины такой вариабельности. Разработан и предложен стандартизованный протокол, унифицирующий указанные этапы, что позволяет снизить внутрилабораторную вариабельность, однако межлабораторная остается достаточно высокой. Было высказано предположение, что ключевую роль в вариабельности результатов играют технические условия проведения этапа электрофореза. Для подтверждения этой гипотезы проведено две серии экспериментов.

В первой серии экспериментов проведена сравнительная оценка расчетной и фактической напряженности электрического поля в пяти различных электрофоретических камерах и вклада выявляемых различий в вариабельность показателей поврежденности ДНК при оценке спонтанного и индуцированного уровней.

В исследовании использованы половозрелые самцы мышей-гибридов F₁ CBA×C57Bl/6. Для индукции повреждений ДНК мышам однократно внутрибрюшинно вводили метилметансульфонат в дозе 30 мг/кг. Мышам негативного контроля вводили тем же путем эквивалентные объемы

физиологического раствора. Через 3 часа после введения физиологического раствора или метилметансульфоната от животных получали образцы почек и костного мозга и готовили идентичные гель-слайды из одной суспензии клеток.

Для проведения электрофореза использовали пять различных электрофоретических камер – SE-2 (Хеликон, Россия), SubCell 192 (BioRad, США), MultiSUB Screen 32, CSL-COM40 и COMPAC-50 (Cleaver Scientific, Великобритания). Во всех экспериментах использовали источник питания Power PRO 300 (Cleaver Scientific, Великобритания). В камерах MultiSUB Screen 32, CSL-COM40 и Sub-Cell 192 гель-слайды располагали на 12 участках площадки камер, согласно схеме, представленной на рисунке 3.1. Оставшееся пространство на площадке полностью заполняли гель-слайдами, также покрытыми агарозой, но без второго слоя с клетками. Площадка в камере SE-2 полностью заполнялась 8 гель-слайдами с клетками.



Примечание – М – межэлектродное расстояние; В – высота, Д – длина и Ш – ширина площадки камер.

Рисунок 3.1 – Геометрические параметры, расположение гель-слайдов с клетками на площадке и участки (обозначены цифрами 1 – 12) измерения локальной напряженности электрического поля и температуры электрофорезного раствора для камер CSL-COM40, Sub-Cell 192 и MultiSUB Screen 32

Для достижения расчетной напряженности электрического поля 1 В/см подаваемое на камеры напряжение (В) равнялось расстоянию (см) между электродами камеры. Для определения фактической напряженности электрического поля измеряли разность потенциалов в начале электрофореза (0–1 минута) и конце электрофореза (19–20 минута). Фактическую напряженность электрического поля определяли путем измерения разности потенциалов между двумя точками в срединной части площадки камеры, расположенными на расстоянии 10 см, и разности потенциалов на сантиметровом отрезке над слайдами с клетками на различных участках камеры (рисунок 3.1). Измерение температуры электрофорезного раствора на этих же участках проводили с помощью цифрового пирометра DT-886OB. Во всех случаях определяли среднее значение для трех измерений. В экспериментах с рециркуляцией электрофорезного раствора из катодного резервуара камеры раствор подавался в анодный со скоростью, обеспечивающей смену 1,5 объемов раствора в резервуарах (рисунок 3.1). Электрофорез проводили в течение 20 минут с установленной на источнике питания стабилизацией по напряжению. По окончании электрофореза гель-слайды фиксировали, окрашивали и анализировали как описано в разделе 2.4.1.

В таблице 3.1 представлены геометрические характеристики использованных камер и измеренные в ходе электрофореза реальные значения напряженности электрического поля. Только для камеры CSL-COM40 фактическое значение напряженности совпало с расчетным. Различие между расчетным и фактическим значениями оказалось наименьшим для камеры SE-2. Поскольку камера Sub-Cell 192 комплектуется устанавливаемой поверх площадки дополнительной платформой, позволяющей увеличить размер агарозного геля и, соответственно, количество слайдов при использовании камеры для метода ДНК-комет, измерения были проведены в двух вариантах.

Таблица 3.1 – Геометрические характеристики электрофоретических камер (рисунок 3.1) и значения спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК в клетках почек мышей при электрофорезе с расчетной и фактической напряженностью электрического поля 1 В/см

Камера	Измерения (см)					Объем раствора (мл)*	При расчете подаваемого напряжения по измерению Д			При E=1 В/см		
	Ш	В	Д	М	E** (В/см)		%ДНК в хвосте (m±SD)***		Напряжение (В)	%ДНК в хвосте (m±SD)***		
							контроль	ММС 30 мг/кг		контроль	ММС 30 мг/кг	
SE-2	13	2,4	17,6	27	550	1,1	1,9±0,9	13,1±1,7	26	1,6±0,8	12,2±1,5	
CSL-COM40	35,5	3,3	14,5	25	1900	1,0	3,4±2,8	13,3±3,7				
Sub-Cell 192 (без платформы)	26	4,1	15,2	32	2080	2,0	9,0±1,7	20,7±1,9	24	1,7±0,7	9,9±0,9	
Sub-Cell 192 (с платформой)	26	4,6	25,7	32	2150	1,2	2,2±0,3	15,5±2,9	30	1,5±0,4	12,8±2,2	
MultiSUB Screen 32	27	2,5	32	46	1280	1,4	4,9±1,9	16,7±3,2	38	1,8±0,5	11,8±1,6	
COMPAC-50	10,6	3,2 [#]	18	21	550	0,6	0,9±0,3	4,6±0,6	28	1,5±0,8 ^{##}	12,9±2,1 ^{##}	

Примечание – М – межэлектродное расстояние; В – высота; Д – длина; Ш – ширина площадки камер; * – высота электрофорезного раствора над стеклами ~2 мм; ** – измерения проведены в начале электрофореза при силе тока ~300 мА (кроме камер COMPAC-50 и Multi SUB Screen 32; см. в тексте); *** – для 12 слайдов (камеры CSL-COM40, Sub-Cell 192 и MultiSUB Screen 32) и для 8 слайдов (камеры COMPAC-50 и SE-2); # – высота столба электрофорезного раствора (рисунок 3.1); ## – электрофорез 30 минут; ММС – метилметансульфонат.

При проведении электрофореза без дополнительной платформы фактическое значение напряженности составило 2,0 В/см, тогда как с платформой – 1,2 В/см.

В камере MultiSUB Screen32 при подаваемом напряжении 46 В и высоте электрофорезного раствора над стеклами ~2 мм сила тока составила ~420 мА. Снижение предела силы тока до рекомендуемых 300 мА путем удаления части раствора оказалось технически недостижимым, поскольку в этом случае раствор не покрывал слайды. Фактическая напряженность при указанных параметрах при этом оказалась значительно выше расчетной – 1,4 В/см.

Особенностью электрофоретической камеры СОМРАС-50, разработанной специально для метода ДНК-комет, является уникальная запатентованная конструкция с вертикальной ориентацией гель-слайдов во время электрофореза (рисунок 3.2).

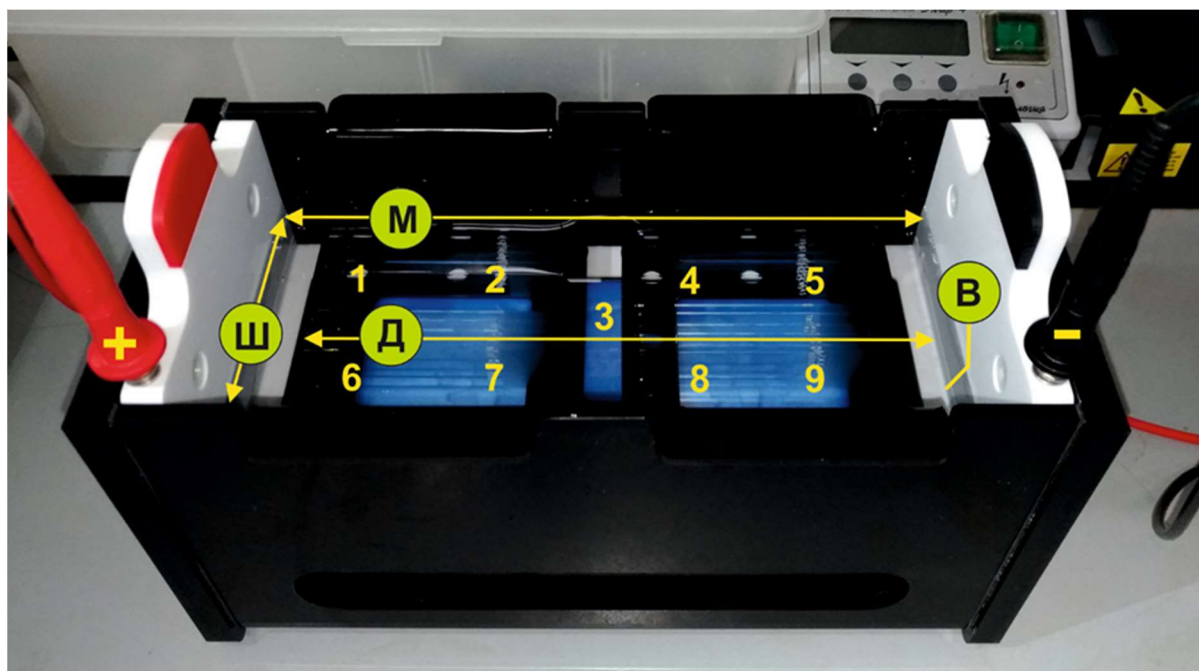


Рисунок 3.2 – Геометрические измерения (таблица 3.1) и участки определения напряженности электрического поля в электрофоретической камере СОМРАС-50

Ее преимущества – компактность и большая вместимость гель-слайдов (до 50 гель-слайдов). Измерения показали, что при рекомендуемом

производителем напряжении 21 В фактическое значение напряженности электрического поля возле поверхности слайдов составляет всего 0,6 В/см.

Анализ микропрепаратов ДНК-комет выявил высокую вариабельность в показателях как спонтанной, так и индуцированной поврежденности ДНК, оцененных для одного и того же образца клеток почек мышей при проведении электрофореза в различных камерах (таблица 3.1, рисунок 3.3). Наибольшие значения уровней поврежденности ДНК были получены при использовании камеры Sub-Cell 192 без платформы ($E=2,0$ В/см), наименьшие – для камеры СОМРАС-50 ($E=0,6$ В/см).

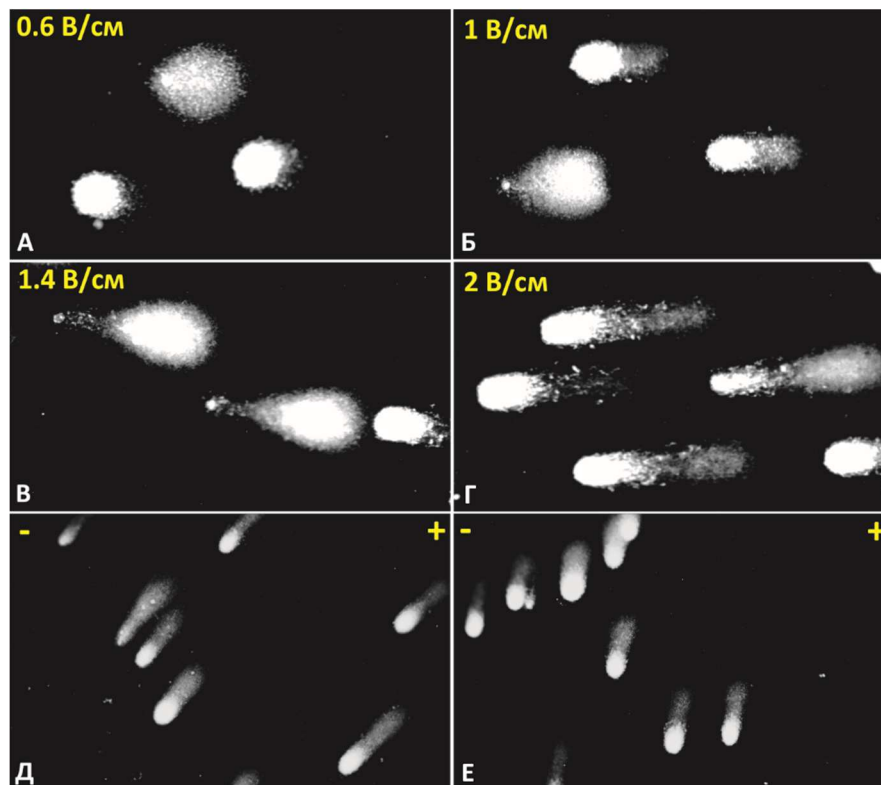


Рисунок 3.3 – Морфология ДНК-комет в зависимости от напряженности электрического поля (А, Б, В и Г – электрофорез 20 минут) и при увеличении скорости рециркуляции в 2 раза (Д и Е)

Эмпирически для каждой камеры было подобрано подаваемое напряжение, при котором напряженность электрического поля составляет 1 В/см (таблица 3.1) и эксперименты с клеточными суспензиями почек мышей были повторены. Унификация напряженности электрического поля в камерах позволила получить сходные уровни как спонтанных, так и индуцированных

повреждений ДНК. Для камеры СОМРАС-50 сходные с остальными камерами результаты удалось достичь только при увеличении времени электрофореза до 30 минут и повышении силы тока до 680–700 мА.

Обобщенный анализ данных выявил значительный разброс средних показателей поврежденности ДНК между идентичными слайдами, полученными в условиях одного электрофореза. Для камеры CSL-COM40 он оказался наибольшим – от 1,1 до 8,8% ДНК в хвосте для спонтанной поврежденности ДНК и от 4,1 до 17,9% ДНК в хвосте для индуцированной. Было выдвинуто предположение, что наблюдаемая вариабельность показателей может быть обусловлена неоднородностью напряженности поля и/или температуры по площадке камер. В описанных выше экспериментах напряженность поля определяли путем измерения разности потенциалов над слайдами на десятисантиметровом отрезке в серединной части площадки камер. Далее в камере CSL-COM40 провели определение напряженности на 12-ти участках площадки (рисунок 3.1) измерением разности потенциалов на 1-сантиметровом отрезке над гель-слайдами, в стандартных условиях и с рециркуляцией электрофорезного раствора. Одновременно на этих участках определяли температуру электрофорезного раствора.

Измерения выявили выраженные различия напряженности, которая варьировала от 0,8 до 1,5 В/см в начале электрофореза и от 1,0 до 1,3 В/см в конце (таблица 3.2). При этом наибольшие значения зафиксированы на участках возле катодного резервуара (точки 1, 4, 7 и 10), наименьшие – возле анодного резервуара (точки 3, 6, 9 и 12). Температура электрофорезного раствора в начале электрофореза варьировала от 8,0 до 12,6°C, а к концу значительно повышалась на всех участках до сходных значений. Рециркуляция электрофорезного раствора способствовала выравниванию напряженности электрического поля по площадке камеры до 0,9–1,1 В/см. Температура электрофорезного раствора в условиях рециркуляции в начале электрофореза также различалась между участками, однако к концу электрофореза не повышалась, а на некоторых участках снизилась.

Таблица 3.2 – Значения напряженности электрического поля (E) и температуры (t) электрофорезного раствора на 12 участках площадки камеры CSL-COM40

Номер участка измерения в камере	Без рециркуляции раствора		С рециркуляцией раствора	
	t_s/t_f (°C)*	E_s/E_f (В/см)	t_s/t_f (°C)	E_s/E_f (В/см)
1	8,0/18,7	1,4/1,3	9,4/9,4	1,0/1,0
2	9,4/18,2	1,2/1,1	11,1/10,8	1,0/1,0
3	9,8/17,0	0,9/1,1	14,1/10,3	1,1/1,1
4	10,0/19,1	1,4/1,2	9,7/9,5	1,0/1,0
5	11,3/16,7	1,1/1,1	12,2/9,9	1,0/1,0
6	11,7/17,5	0,8/1,0	13,3/10,5	1,1/1,0
7	10,4/18,0	1,5/1,3	10,5/10,0	1,1/1,0
8	10,1/18,3	1,3/1,1	12,1/11,0	1,0/1,1
9	10,6/17,3	0,8/1,0	14,1/11,7	1,1/1,0
10	12,6/17,6	1,5/1,3	10,8/9,5	0,9/1,0
11	11,2/17,0	1,2/1,1	11,1/10,2	1,0/1,0
12	10,0/17,6	0,9/1,0	12,2/10,4	1,0/1,0
<i>CV (%)</i>	<i>22,6/10,2</i>		<i>6,1/3,8</i>	

Примечание – * – указаны значения, полученные в начале t_s ; E_s (0–1 минута) и в конце t_f ; E_f (19–20 минута) электрофореза.

Такие же измерения были проведены в камерах Sub-Cell 192 и MultiSUB Screen 32 при проведении электрофореза препаратов ДНК-комет клеток костного мозга и почек интактных мышей и обработанных метилметансульфонатом в дозе 30 мг/кг.

В камере Sub-Cell 192 значения напряженности без рециркуляции раствора варьировали в пределах 0,8–1,1 В/см (таблица 3.3). При проведении рециркуляции напряженность на всех участках, за исключением 11-й, в начале электрофореза составляла 1,0 В/см, а к концу электрофореза повысилась до 1,2 В/см. Анализ микропрепаратов ДНК-комет показал высокую вариабельность показателя между идентичными слайдами интактных клеток костного мозга при проведении электрофореза без рециркуляции буфера – от 0,9 до 3,6 %ДНК

в хвосте (CV=41,9%). При проведении электрофореза с рециркуляцией раствора коэффициент вариации снизился до 14,3%.

Таблица 3.3 – Значения напряженности электрического поля (E) и температуры (t) электрофорезного раствора на 12 участках площадки камеры Sub-Cell 192 (с дополнительной платформой) и соответствующие показатели спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК в клетках костного мозга мышей

Номер участка измерения в камере/ слайда	Без рециркуляции раствора				С рециркуляцией раствора			
	t _s /t _f (°C)	E _s /E _f (В/см)	%ДНК в хвосте		t _s /t _f (°C)	E _s /E _f (В/см)	%ДНК в хвосте	
			контроль	ММС 30 мг/кг			контроль	ММС 30 мг/кг
1	8,6/17,0	1,0/1,0	0,9	7,3	6,5/10,1	1,0/1,2	1,4	6,3
2	8,5/17,2	1,0/0,9	1,4	6,2	8,0/10,9	1,0/1,2	1,3	6,0
3	8,5/17,2	1,1/0,9	2,9	7,5	8,6/11,3	1,0/1,2	1,7	6,9
4	9,9/16,1	1,0/1,0	1,3	6,8	7,3/10,8	1,0/1,2	1,5	6,6
5	8,8/19,5	1,0/0,9	1,8	6,8	9,5/11,5	1,0/1,2	1,3	6,5
6	8,3/18,8	1,0/0,9	2,0	6,8	9,3/11,6	1,0/1,2	1,2	6,5
7	9,2/18,5	1,0/0,8	2,0	6,1	9,2/10,4	1,0/1,2	1,4	7,0
8	9,2/19,1	0,9/0,8	1,7	6,6	9,0/11,1	1,0/1,2	1,4	6,1
9	6,6/18,5	1,0/0,9	1,3	5,5	9,4/11,4	1,0/1,2	1,8	6,5
10	9,6/19,3	0,9/0,8	3,6	6,0	7,7/10,2	1,0/1,2	1,2	6,3
11	8,7/19,4	0,8/0,8	1,7	6,9	8,3/11,2	0,9/1,1	1,7	6,5
12	6,1/14,7	0,8/0,8	1,2	6,5	9,4/11,8	1,0/1,2	1,7	6,2
<i>m±SD</i>			<i>1,8±0,5</i>	<i>6,6±0,4</i>			<i>1,5±0,2</i>	<i>6,5±0,3</i>
<i>CV (%)</i>		<i>9,4/8,6</i>	<i>41,9</i>	<i>8,6</i>		<i>2,9/2,4</i>	<i>14,3</i>	<i>4,6</i>

Примечание – * – указаны значения, полученные в начале t_s; E_s (0–1 минута) и в конце t_f; E_f (19–20 минута) электрофореза; ММС – метилметансульфонат.

Уменьшение вариабельности значений выявлено при анализе слайдов ДНК-комет клеток костного мозга животного, обработанного метилметансульфонатом. Коэффициент вариации при электрофорезе без рециркуляции раствора составил 8,6%, а в условиях с рециркуляцией – 4,6%. Аналогично камере CSL-COM40, без рециркуляции электрофорезного раствора его температура к концу электрофореза значительно повысилась, тогда как с рециркуляцией не превысила 11,8°C. При этом в обоих случаях разница температур раствора над слайдами и в резервуарах камер не превышала 3°C.

В камере MultiSUB Screen 32 напряженность электрического поля по площадке варьировала в пределах 0,8–1,2 В/см в начале электрофореза и 0,9–1,3 В/см в конце (таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Значения напряженности электрического поля (E) и температуры (t) электрофорезного раствора на 12 участках площадки камеры MultiSUB Screen 32 и соответствующие показатели спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК в клетках почек мышей

Номер участка измерения в камере/ слайда	Без рециркуляции раствора				С рециркуляцией раствора			
	t _s /t _f (°C)	E _s /E _f (В/см)	%ДНК в хвосте		t _s /t _f (°C)	E _s /E _f (В/см)	%ДНК в хвосте	
			контроль	ММС 30 мг/кг			контроль	ММС 30 мг/кг
1	8,9/20,6	0,8/1,0	1,9	9,6	8,3/13,7	1,0/1,0	1,3	9,2
2	9,2/20,8	0,8/0,9	1,2	10,4	8,7/13,5	0,9/0,9	1,4	11,1
3	9,0/15,8	1,2/1,2	2,3	9,9	8,6/14,2	1,2/1,0	1,7	13,5
4	7,9/18,8	0,8/1,0	2,6	13,3	9,3/12,1	1,0/1,0	1,8	12,2
5	9,3/20,5	0,8/0,9	1,1	13,8	8,8/14,8	0,9/0,9	0,9	10,3
6	8,8/10,6	1,2/1,2	2,1	14,7	7,0/12,1	1,2/0,9	2,3	12,0
7	9,1/18,7	0,9/1,0	1,9	15,1	8,8/13,4	1,0/1,0	1,6	13,1
8	8,7/20,4	0,9/0,9	1,4	11,4	8,0/14,3	0,9/1,0	1,1	8,8
9	8,1/15,2	1,2/1,3	0,7	10,4	7,8/17,7	1,1/0,8	2,1	10,4
10	8,9/21,7	0,9/1,0	2,1	11,5	6,2/13,3	1,0/1,0	2,1	10,8
11	9,0/21,5	0,9/0,9	1,3	10,8	7,8/17,8	0,9/0,9	1,7	8,7
12	8,5/15,0	1,0/1,1	2,8	10,8	7,7/16,8	1,0/0,8	1,8	12,1
<i>m±SD</i>			<i>1,8±0,5</i>	<i>11,8±1,6</i>			<i>1,7±0,4</i>	<i>11,0±1,3</i>
<i>CV (%)</i>			<i>36,1</i>	<i>16,2</i>			<i>25,4</i>	<i>14,6</i>

Примечание – * – указаны значения, полученные в начале t_s; E_s (0–1 минута) и в конце t_f; E_f (19–20 минута) электрофореза; ММС – метилметансульфонат.

Однако по сравнению с камерой CSL-COM40 наблюдалась обратная картина – высокие значения напряженности зарегистрированы на участках, расположенных возле анодного резервуара, низкие – возле катодного. Температура раствора в начале электрофореза была сходной по точкам и к концу электрофореза повысилась до 15,0–21,7°C. Значение показателя поврежденности ДНК для интактных клеток почек варьировало между геле-слайдами в пределах от 0,7 до 2,8% ДНК в хвосте (CV=36,1%). Коэффициент вариации для геле-слайдов с индуцированной метилметансульфонатом

поврежденностью ДНК оказался выше по сравнению с камерой Sub-Cell – 16,2%. Некоторое снижение неравномерности напряженности электрического поля по площадке наблюдалось при рециркуляции электрофорезного раствора. Снижение при рециркуляции коэффициентов вариации показателей спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК было не столь выраженным, как в случае с камерой Sub-Cell 192. В отличие от камер CSL-COM40 и Sub-Cell 192 рециркуляция раствора не предотвращала вариабельность температуры по площадке камеры и ее повышение к концу электрофореза. Двукратное увеличение скорости рециркуляции приводило к изменению направленности хвостов ДНК-комет на слайдах, что затрудняло проведение их программного анализа (рисунок 3.3), но не оказывало влияния на вариабельность напряженности и температуры (данные не представлены).

Проведение электрофореза в камере СОМРАС-50 имело свои особенности. При напряжении 21 В, которое рекомендовано производителем камеры, сила тока составила 420 мА, а фактическая напряженность поля – 0,6 В/см. Требуемой напряженности электрического поля в 1 В/см удалось достигнуть при подаче на камеру напряжения 28 В, однако при этом сила тока возросла до 680 мА, что находится в районе предела для использованного источника питания. Измерения локальной напряженности на девяти участках (рисунок 3.2) показали, что в начале электрофореза она составляла 1,0 В/см на всех участках (1,2 В/см на участке 3 между слайдами). К концу электрофореза возрастание силы тока до предельных 700 мА привело к падению напряжения на выходе источника питания до 25 В, автоматическому переходу от стабилизации по напряжению к стабилизации по току, с соответствующим снижением напряженности поля и ее вариации по участкам в пределах 0,7–0,9 В/см.

Таким образом, несоответствие при электрофорезе расчетной напряженности электрического поля фактической может служить причиной межлабораторной вариабельности результатов, получаемых методом ДНК-комет. Однако это один из технических факторов, которые могут различаться

между лабораториями. Предположительно, вклад в вариабельность результатов может вносить использование различных красителей для визуализации ДНК, а также используемые для получения и анализа цифровых изображений ДНК-комет аппаратные (тип ССD-камеры) и программные средства.

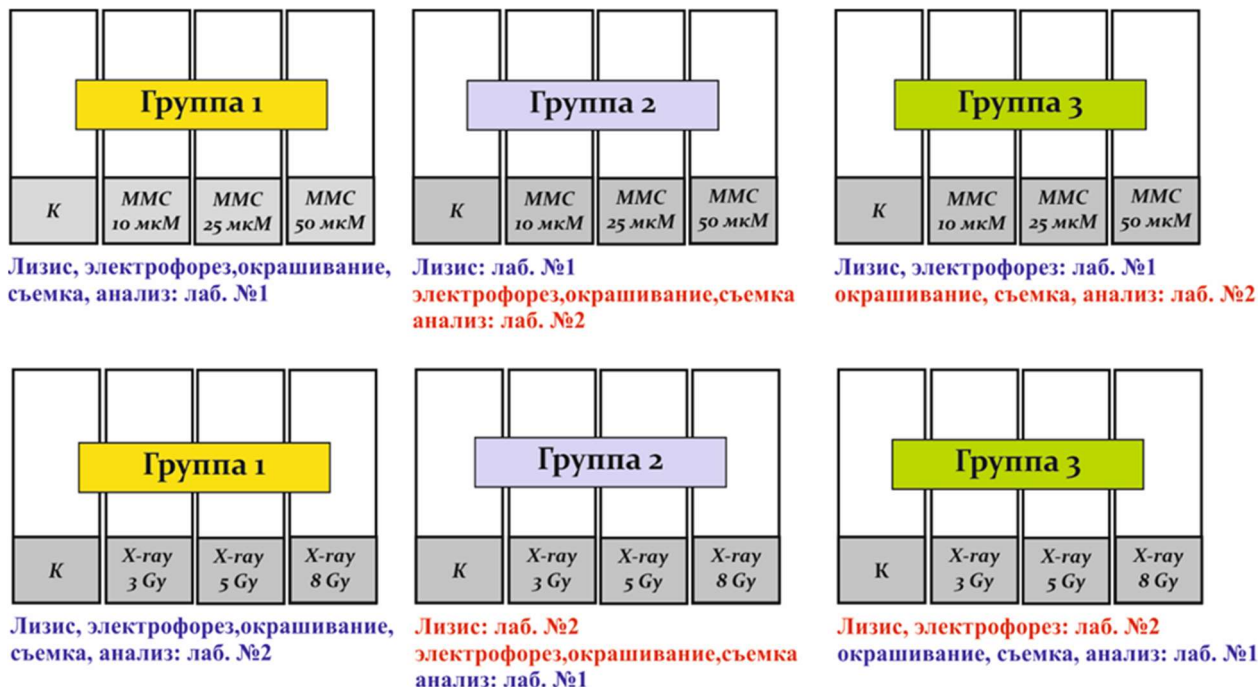
Согласно полученным данным причиной внутри-экспериментальной и меж-экспериментальной вариабельности результатов может служить неравномерность напряженности в электрофоретических камерах, которая может быть устранена рециркуляцией электрофорезного буфера в ходе электрофореза. Установление факта вариабельности температуры электрофоретического раствора позволяет предположить, что помимо напряженности поля она также может оказывать влияние на получаемые результаты.

Для проверки указанных выше предположений проведена вторая серия экспериментов.

Вторая серия экспериментов проведена совместно с ведущим научным сотрудником лаборатории радиационной молекулярной биологии института экспериментальной и теоретической биофизики РАН (ИТЭБ РАН) Сиротой Н.П. В экспериментах лаборатория радиационной молекулярной биологии далее обозначена как лаборатория №2.

Общая схема исследований приведена на рисунке 3.4. В работе использовали клетки костного мозга самцов мышей С57В1/6. После эвтаназии животных клетки костного мозга из бедренных костей вымывали предварительно охлажденной до 4°C средой RPMI-1640, содержащей 20 мМ EDTA-Na₂, 10% диметилсульфоксида и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (по 2 мл на кость). В лаборатории №1 клетки подвергали воздействию метилметансульфоната в концентрациях 10, 25 и 50 мкМ в течение 1 часа при 37°C. После инкубации из суспензии клеток готовили гель-слайды, как описано в разделе 2.4.1. В лаборатории №2 клетки, аналогичным образом нанесенные на гель-слайды, облучали рентгеновским излучением в

дозах 3, 5 и 8 Гр на установке РУТ-250-15-1 (Россия). В обеих лабораториях гель-слайды помещали в лизирующий буфер и инкубировали 24 часа при температуре 5–7°C.



Примечание – К – негативный контроль, ММС – метилметансульфонат. Каждая экспериментальная точка включала по две повторности.

Рисунок 3.4 – Общая схема исследований

В каждой лаборатории было подготовлено по 24 препарата, которые были разделены на три группы по 8 препаратов (две повторности) в каждой. Группа 1 – контрольная, для которой все процедуры протокола метода ДНК-комет выполнялись в лаборатории, где были подготовлены гель-слайды. По две группы гель-слайдов (группы 2 и 3) – после этапа лизиса и после этапа электрофореза – транспортировались между лабораториями. Транспортировка гель-слайдов после лизиса (3–4 часа) в обе лаборатории производилась в герметично закрытой влажной камере, чтобы избежать высыхания агарозного геля с иммобилизованными в него клетками. По прибытию гель-слайды подвергались щелочной денатурации, электрофорезу и дальнейшему анализу. Гель-слайды для окрашивания и анализа из лаборатории №1 в лабораторию №2 передавались в высушенном виде. Из лаборатории №2 в лабораторию №1

– во влажном виде в фосфатно-солевом буфере. Группа 2 использовалась для выявления межлабораторной вариабельности результатов, связанных с этапом электрофореза. Группа 3 использовалась для оценки возможного влияния различий в процедурах окрашивания препаратов, микроскопирования (получения цифровых изображений) и программного анализа на результаты ДНК-комет.

В лаборатории №1 использовали электрофоретическую камеру Sub Cell 192. Гель-слайды из лизирующего буфера помещали в камеру для электрофореза с охлажденным до 8°C раствором для электрофореза и проводили щелочную денатурацию в течение 20 минут. Далее проводили электрофорез в течение 20 минут при напряженности электрического поля 2 В/см. В процессе электрофореза регистрировали температуру электрофоретического раствора с использованием цифрового термометра MS6501. Фиксацию, окрашивание, микроскопирование и анализ изображений проводили как описано в разделе 2.4.1.

В лаборатории №2 использовали электрофоретическую камеру SE-1 (Хеликон, Россия). Электрофоретический раствор и камера предварительно охлаждались до температуры 4–6°C. Электрофорез проводился в холодильнике в течение 20 минут при напряженности электрического поля 2 В/см. Контроль температуры в центральной точке электрофоретической камеры, в верхнем слое (1–2 мм) электрофоретического раствора осуществляли непрерывно с помощью микротермистора конструкции В.Г. Карманова.

После электрофореза гель-слайды промывали в дистиллированной воде и помещали на 1 час в раствор этидиум бромид (2 мкг/мл) в фосфатно-солевом буфере. Перед анализом микропрепараты промывали дистиллированной водой в течение 5–10 минут для удаления не связавшегося красителя. Анализ изображений комет проводили с помощью микроскопа Люмам-И-3 (ЛОМО, Россия). Цифровые изображения ДНК-комет получали с помощью камеры CoolPix 995 (Nikon, Япония). Анализ изображений

проводили с помощью программного пакета, разработанного в Институте биофизики клетки РАН.

Эксперименты с клетками костного мозга, обработанными метилметансульфонатом. В лаборатории №1 были подготовлены гель-слайды с обработанными метилметансульфонатом клетками. Группа 1 была подвергнута процедурам лизиса, щелочной денатурации, электрофореза, окрашивания и последующего анализа там же. Результаты, полученные для этой группы, представлены в столбце 1 таблицы 3.5. Группа 2 была подвергнута только этапу лизиса, а затем гель-слайды переданы в лабораторию №2, где были выполнены все последующие процедуры метода ДНК-комет. Результаты для этой группы представлены в столбце 2 таблицы 3.5. Группа 3 была подвергнута этапам лизиса, щелочной денатурации, электрофореза и фиксации, после чего гель-слайды были переданы в лабораторию №2 для окрашивания, микроскопирования и анализа. Результаты, полученные для этой группы, представлены в столбце 3 таблицы 3.5.

Данные, представленные в таблице 3.5 демонстрируют значительные различия в показателях %ДНК в хвосте между группами. Для гель-слайдов, проходивших этап электрофореза в лаборатории №1 (столбцы 1 и 3), наблюдалось зависимое от концентрации метилметансульфоната увеличение поврежденности ДНК. Значения показателей для контрольных клеток и клеток, обработанных метилметансульфонатом в концентрации 50 мкМ, оказались практически идентичны для обеих групп. Для клеток, обработанных метилметансульфонатом в концентрациях 10 и 25 мкМ, наблюдалась значительная межлабораторная разница в средних значениях %ДНК в хвосте. Было предположено, что эти различия связаны с особенностями обработки цифровых изображений использованными программными пакетами. Для проверки данного предположения проанализировали идентичные изображения комет с помощью обоих пакетов. Существенных различий не было выявлено (данные не представлены).

Таблица 3.5 – Результаты оценки поврежденности ДНК, индуцируемой метилметансульфонатом

Эксперимент	Лизис, электрофорез, окрашивание, съемка, анализ: лаб. №1 (группа 1)	Лизис: лаб. №1 Электрофорез, окрашивание, съемка, анализ: лаб. №2 (группа 2)	Лизис, электрофорез: лаб. №1 Окрашивание, съемка, анализ: лаб. №2 (группа 3)
	% ДНК в хвосте		
Контроль	5,3±1,9*	9,3±1,3	5,3±1,1*
ММС 10 мкМ	11,0±0,5	9,4±1,0	20,5±1,2** (13,0±1,7)#
ММС 25 мкМ	21,7±0,5**	8,1±0,9	29,0±1,5**
ММС 50 мкМ	35,6±3,4**	15,4±1,1	36,3±1,2**

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с группой 2; ** – $p < 0,001$ по сравнению с группой 2 (критерий Краскела-Уоллиса); # – после исключения атипичных ДНК-комет из общего анализа.

Сравнение первичных данных по отдельным ДНК-кометам показало, что в лаборатории №2 в анализ были включены атипичные ДНК-кометы, которые не анализировались при обработке изображений в лаборатории №1, поскольку программное обеспечение CASP некорректно обрабатывает такие изображения ДНК-комет. Исключение из анализа атипичных ДНК-комет в лаборатории №2 привело к снижению показателя с 20,5% до 13,0% для 10 мкМ метилметансульфоната (таблица 3.5, столбец 3).

Сравнение данных, полученных для гель-слайдов, этап электрофореза которых проводился в разных лабораториях (группы 1 и 2), показывает, что, если для контрольных клеток показатель, полученный в лаборатории №1, почти в два раза ниже, чем в лаборатории №2 (5,3±1,9% против 9,3±1,3% ДНК в хвосте, соответственно), то для клеток, обработанных метилметансульфонатом в концентрациях 25 и 50 мкМ, наоборот – более чем в два раза выше.

Эксперименты с клетками костного мозга, обработанными рентгеновским излучением. В лаборатории №2 для индукции повреждений

ДНК клетки, иммобилизованные в агарозный гель, подвергали рентгеновскому излучению. Эксперименты с гель-слайдами, приготовленными в лаборатории №2, проводились по той же схеме, что и с гель-слайдами, обработанными метилметансульфонатом. Во всех случаях атипичные ДНК-кометы были исключены из анализа. Полученные данные представлены в таблице 3.6.

Для гель-слайдов, проходивших этап электрофореза в лаборатории №2 (столбцы 1 и 3), наблюдалось зависимое от дозы излучения увеличение поврежденности ДНК. Не выявлено значимых различий между этими группами. Однако для гель-слайдов, подвергнутых электрофорезу в лаборатории №1 (таблице 3.6, столбец 2), показатель %ДНК в хвосте оказался значимо выше, чем для гель-слайдов, подвергнутых электрофорезу в лаборатории №2 (таблице 3.6, столбцы 1 и 3).

Данные, полученные на моделях *in vivo* и *in vitro* индуцированного повреждения ДНК клеток костного мозга мышей, позволяют заключить, что транспортировка гель-слайдов после этапа лизиса и/или электрофореза, а также использование различных красителей для визуализации ДНК, CCD-камер для получения изображений ДНК-комет и компьютерных программ для их анализа не оказывают существенного влияния на получаемые результаты в методе ДНК-комет.

Поскольку в обоих случаях использовались идентичные гель-слайды, полученные из одних и тех же клеточных суспензий, была схожая фактически измеренная напряженность электрического поля (для лаборатории №1 – 2,1 В/см, для лаборатории №2 – 2,0 В/см) и одинаковая продолжительность этапов щелочной денатурации и электрофореза, предположено, что наблюдаемые межлабораторные различия результатов являются следствием различных температурных условий проведения электрофореза.

Таблица 3.6 – Результаты оценки поврежденности ДНК, индуцируемой рентгеновским излучением

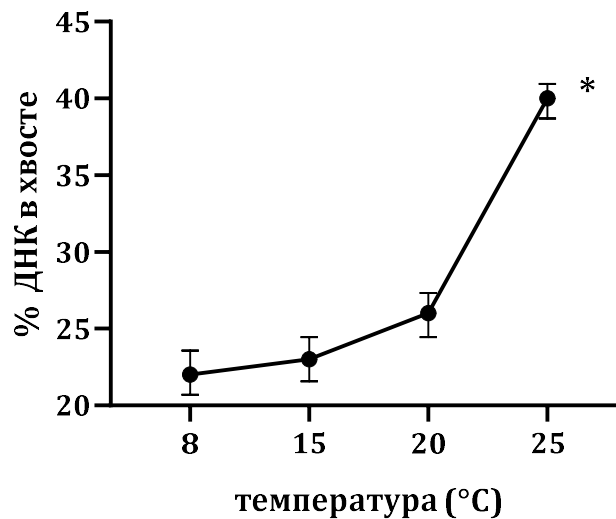
Эксперимент	Лизис, электрофорез, окрашивание, съемка, анализ: лаб. №2 (группа 1)	Лизис: лаб. №2 Электрофорез, окрашивание, съемка, анализ: лаб. №1 (группа 2)	Лизис, электрофорез: лаб. №2 Окрашивание, съемка, анализ: лаб. №1 (группа 3)
	% ДНК в хвосте		
Контроль	3,7±0,8	9,3±4,8*	1,7±0,7
X-ray 3 Гр	18,4±1,1	34,0±4,4*	13,6±2,4
X-ray 5 Гр	21,4±1,2	42,7±4,4*	19,0±2,4
X-ray 8 Гр	26,0±1,6	49,3±9,3*	24,7±1,9

Примечание – * – $p < 0,001$ по сравнению с группами 1 и 3 (критерий Краскела-Уоллиса).

Зависимость показателей от температуры электрофоретического раствора. В экспериментах, проведенных в лаборатории №2, температура электрофоретического буфера в ходе электрофореза повышалась в среднем на 8°C (с 4–6°C до 12–14°C). В экспериментах в лаборатории №1 это изменение составило 5°C (с 14–15°C до 19–20°C). Вместе с тем, общая температура электрофоретического раствора в начале и в конце электрофореза была выше в лаборатории №1. Это было обусловлено тем, что этапы щелочной денатурации и электрофореза проводились в электрофоретической камере при условиях комнатной температуры, тогда как в лаборатории №2 оба этапа проводили в холодильнике и на момент начала электрофореза раствор имел исходно более низкую температуру.

Далее изучили возможный вклад в оцениваемый показатель температурных условий щелочной денатурации. Для этого были подготовлены гель-слайды с лейкоцитами, которые облучали рентгеновскими лучами в дозе 4 Гр. Этап щелочной денатурации проводили вне электрофоретической камеры при различных контролируемых температурах (8, 15, 20 и 25°C) и далее проводили электрофорез с исходной температурой 8°C. Выявлена нелинейная зависимость показателя %ДНК в хвосте от

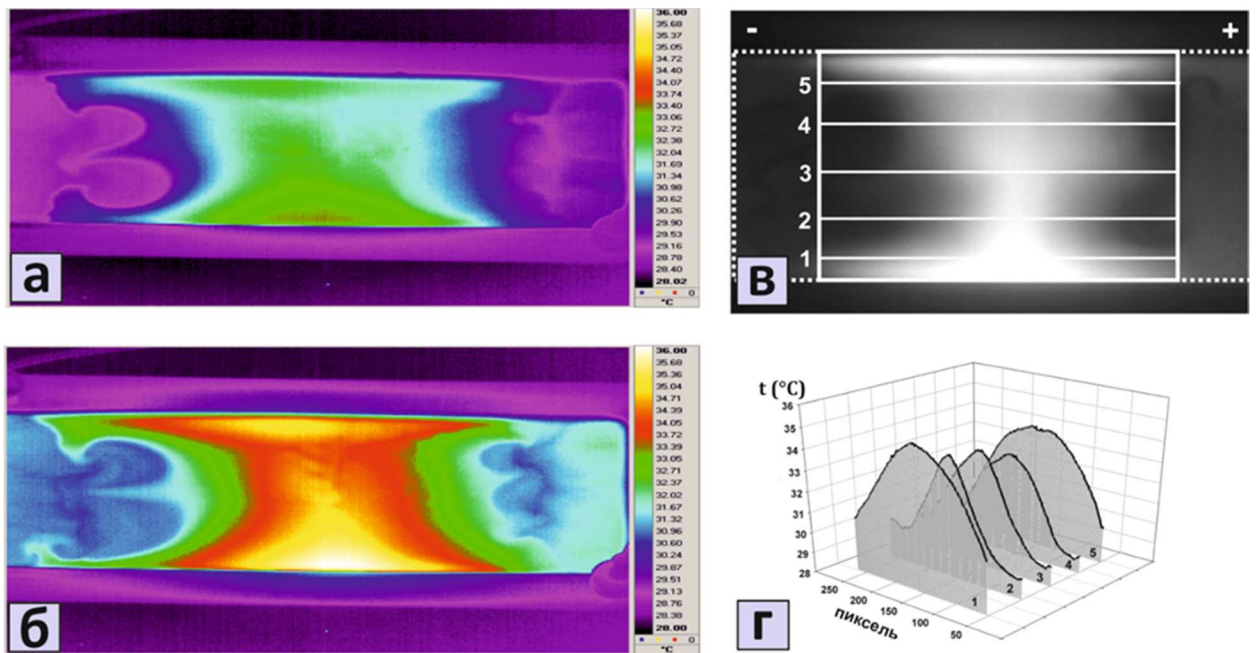
температуры (рисунок 3.5). Значения, полученные в диапазоне температур 8–20°C, статистически не отличались друг от друга, тогда как существенное, статистически значимое увеличение показателя %ДНК в хвосте, наблюдалось при 25°C.



Примечание – Представлены средние трех независимых экспериментов (mean ± SEM). * – $p < 0,001$ по сравнению с показателями для 8, 15 и 20°C (критерий Краскела-Уоллиса).

Рисунок 3.5 – Зависимость показателя поврежденности ДНК лейкоцитов, обработанных рентгеновским излучением (4 Гр), от температуры щелочной денатурации

В первой серии экспериментов оценивали температуру электрофоретического раствора в ходе электрофореза с помощью инфракрасного пирометра в отдельных точках различных камер. Далее провели эксперименты по измерению температуры в процессе электрофореза по всей поверхности электрофоретического раствора с помощью высокоразрешающего чувствительного инфракрасного термографа. Результаты температурного сканирования на поверхности раствора в камере SE-1 представлены на рисунке 3.6.



Примечание – Термограммы на 10-ю (а) и 20-ю (б) минуты электрофореза. Пунктирные и сплошные линии (в) обозначают границы электрофоретической камеры и платформы для гель-слайдов, соответственно (10-я минута электрофореза). Профили температуры на платформе (г) представлены для пяти различных областей, соответствующих линиям 1–5 на изображении (в).

Рисунок 3.6 – Результаты инфракрасного сканирования поверхности электрофорезного раствора

В начале электрофореза наблюдалась равномерная температура на поверхности электрофоретического буфера (данные не представлены). Однако в процессе электрофореза температура буфера повышалась, и, кроме того, к концу электрофореза наблюдалась выраженная неоднородность температуры в области платформы с максимумом в ее серединной части. Электрофорез и контроль температуры проводились в электрофоретической камере без крышки, что способствовало пассивному отводу тепла с поверхности раствора. В стандартных условиях отвод тепла затруднен из-за наличия крышки (используется в целях безопасности и для предотвращения испарения) и распределение температуры на поверхности электрофоретического раствора в камере может оказаться еще более сложным.

Обсуждение результатов

При горизонтальном агарозном гель-электрофорезе нуклеиновых кислот независимо от геометрических характеристик электрофоретической

камеры для расчета напряженности электрического поля используется отношение подаваемого напряжения к расстоянию между электродами [254, 255]. Поскольку в методе ДНК-комет стали использовать такие же по конструкции электрофоретические камеры, указанный принцип был принят по умолчанию для расчета рекомендуемой напряженности в 1 В/см, когда подаваемое напряжение (В) равно расстоянию между электродами (см). Из 5 электрофоретических камер, которые протестированы в настоящих экспериментах, только для одной фактическая напряженность совпала с расчетной, в то время как для остальных четырех она варьировала от 0,6 до 2,0 В/см. В итоге, оцененные в одних и тех же образцах клеток почек мышей показатели различались между камерами до 4,7 раза для индуцированной и до 10 раз для спонтанной поврежденности ДНК. Несоответствие фактических значений напряженности электрического поля расчетным (значения ниже расчетных) было показано в исследовании [34]. В настоящем исследовании напряженность ниже расчетной выявлена для имеющей нестандартную конфигурацию с вертикальной ориентацией слайдов камеры COMRAC-50.

На этапе разработки метода для получения оптимальных препаратов ДНК-комет было предложено проводить электрофорез в течение 20–25 минут при напряжении, равном произведению расстояния между электродами камеры на 0,6 [256]. Применительно к использованным камерам во всех случаях такой расчет дает значения напряжения значительно ниже определенных экспериментально для получения напряженности 1 В/см (таблица 3.1). Некоторые исследователи предлагают рассчитывать напряженность как отношение подаваемого напряжения к длине площадки камеры (измерение D , рисунок 3.1) [34]. Расчетные и фактические значения напряженности при таком принципе расчета совпадали только для камеры Sub-Cell 192 без дополнительной платформы и камеры MultiSUB Screen 32. Более того, установлено, что при константных межэлектродном расстоянии и напряжении напряженность электрического поля на площадке со слайдами зависит от ее размеров. Так, в камере Sub-Cell 192 напряженность 1 В/см

достигалось при подаваемом напряжении 24 В, тогда как при установке дополнительной платформы для получения указанной напряженности требовалось напряжение 30 В.

Полученные данные показывают, что общий принцип расчета напряженности электрического поля в случае щелочного электрофореза ДНК-комет неприменим и для каждой конкретной камеры следует экспериментально определять напряжение, обеспечивающее требуемую напряженность. Последнее позволит снизить или ликвидировать наблюдаемую межлабораторную вариабельность экспериментальных данных в методе ДНК-комет.

На сегодняшний день нет общепринятого значения напряженности электрического поля, при котором следует проводить электрофорез в методе ДНК-комет. В руководстве ОЭСР со ссылкой на результаты валидационных исследований по альтернативным методам (JaCVAM) рекомендовано проведение электрофореза в течение 20 минут при напряженности 0,7 В/см [257]. По мнению ряда авторитетных специалистов, оптимально проведение электрофореза при 1,15 В/см в течение 20 минут или при 0,7 В/см в течение 30 минут [34, 235, 254, 258, 259]. Анализ литературы показывает, что подавляющее большинство исследователей использует напряженность поля 1 В/см. Использование меньших значений снижает чувствительность метода, тогда как более высокие значения могут приводить к искажению результатов анализа в результате «отрыва» небольших фрагментов ДНК от хвоста ДНК-комет и/или их диффузии в геле.

Важной проблемой является внутрилабораторная вариабельность данных метода ДНК-комет, когда результаты могут различаться как между сериями экспериментов, так и внутри одной серии, и в условиях одного электрофореза. В зависимости от электрофоретической камеры коэффициент вариации показателя %ДНК в хвосте для одной и той же популяции клеток внутри одного электрофореза составил 36–42% для спонтанных повреждений ДНК и 8–16% для индуцированных (таблицы 3.2, 3.3 и 3.4). Аналогичные

результаты были получены в двух исследованиях [260, 261]. Коэффициент вариации в случае индуцированных повреждений ДНК составил ~14%, тогда как для спонтанных – до 52%. Последнее приобретает особое значение при применении метода ДНК-комет в исследованиях, направленных преимущественно на оценку низких уровней поврежденности ДНК, таких как генетический биомониторинг или клинические исследования.

Меж- и внутриэкспериментальная вариабельность результатов может быть связана с неоднородностью напряженности электрического поля по площадке камеры. Экспериментально установлено, что для трех электрофоретических камер напряженности поля значительно варьируют – CV 9,4–22,6%. Рециркуляция электрофоретического раствора в ходе электрофореза в камерах Sub-Cell 192 и CSL-COM40 значительно снижала неравномерность напряженности, в меньшей степени в камере Multi Sub Screen 32. Если в камере Sub-Cell 192 в условиях рециркуляции уменьшение неоднородности напряженности сопровождалось и снижением вариабельности показателей спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК, то в камере Multi Sub Screen 32 вариабельность показателей в обоих случаях оставалась на высоком уровне. В независимом исследовании было показано, что рециркуляция электрофорезного раствора снижает коэффициент вариации показателя поврежденности ДНК в облученных клетках с 26% до 7% [258].

Механизмы неоднородности напряженности поля не ясны. Предположительно они связаны с локальными изменениями в ходе электрофореза удельной электропроводности раствора вследствие возникновения в камере градиентов температуры и/или концентрации ионов [254, 262]. Для камеры MultiSUB Screen 32 в точках возле анодного резервуара (точки измерения 3, 6, 9, 12), в которых температура раствора была выше, чем в остальных, наблюдались и более высокие значения напряженности (таблица 3.4). Если температура раствора над слайдами к концу электрофореза возрастает значительно, то в резервуарах камеры она повышается не более чем

на 5°C, создавая температурные градиенты. Это предположение подтверждено с использованием высокоразрешающего чувствительного инфракрасного термографа. Установлено, что электрофорез сопровождается гетерогенным увеличением температуры раствора с более высокими значениями в срединной части площадки камеры (рисунок 3.6). Рециркуляция приводит к активной смене раствора над слайдами, способствуя выравниванию его температуры по камере (разница <3°C). Вероятно, аналогичным образом, рециркуляция позволяет предотвратить и возникновение градиентов концентрации ионов электролита. Значимое отличие камеры MultiSUB Screen 32 от камеры Sub-Cell 192 – меньший объем используемого электрофорезного раствора (1280 мл против 2150 мл). Очевидно, чем меньше объем электрофорезного раствора при сходных размерах площадки камер, тем меньший стабилизирующий эффект может иметь рециркуляция. Локальные изменения pH раствора также могут оказывать влияние на оцениваемый показатель, однако принимая во внимание высокую ионную силу раствора и короткое время электрофореза, вклад изменений pH маловероятен.

Проведенные межлабораторные сравнительные эксперименты показывают, что различия в используемых для флуоресцентной визуализации ДНК красителях, оборудовании для получения изображений ДНК-комет (тип CCD-камеры, источник света в микроскопе) и программном обеспечении для их анализа не оказывают значимого влияния на результаты. Полученные данные подтверждены в недавнем независимом исследовании [263].

Заключение

Суммируя результаты проведенных исследований, можно констатировать, что основной вклад в вариабельность данных, получаемых методом ДНК-комет, вносят различия в двух технических параметрах – температурных условиях проведения этапа щелочной денатурации/электрофореза и напряженности электрического поля в ходе электрофореза. Перед проведением экспериментов для конкретной электрофоретической камеры следует эмпирически определить напряжение,

обеспечивающее заданные значения напряженности электрического поля и силы тока. Для снижения внутрилабораторной вариабельности данных необходимо строго унифицировать температурные условия проведения этапов щелочной денатурации и электрофореза, в том числе с помощью рециркуляции электрофорезного раствора. В совокупности с унификацией остальных экспериментальных условий (концентрация агарозного геля, длительность лизиса, щелочной денатурации и электрофореза) указанное позволит обеспечить меж- и внутрилабораторную сходимость и воспроизводимость данных, полученных с использованием метода ДНК-комет.

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

Экспериментальные данные, полученные в ходе исследований на животных, однозначно свидетельствуют о том, что индуцированные в половых клетках повреждения ДНК могут передаваться потомству, приводя к развитию широкого спектра патологических нарушений [3]. К ним относятся внутриутробная гибель плода, врожденные аномалии развития, рождение потомства с хромосомными нарушениями и развитие различных генетически-обусловленных патологий. В связи с этим, выявление механизмов индукции и анализ трансгенерационной передачи повреждений ДНК являются критически важными для адекватной оценки генетического риска при воздействии генотоксических факторов на половые клетки [3, 15]. В настоящее время для этой цели применяются ряд валидированных методов, однако каждый из них имеет определенные недостатки, главным из которых является ограниченность экспериментальных тест-объектов только самцами (раздел 1.5). Это актуализирует необходимость внедрения новых высокочувствительных методик к оценке генотоксических повреждений в половых клетках, как самцов, так и самок, и наиболее перспективным

подходом для этих целей является регистрация повреждений ДНК методом ДНК-комет.

Проведение метода ДНК-комет на ооцитах и одно- и двухклеточных эмбрионах мышей. Поскольку основной из методических сложностей исследований на ооцитах и одно- и двухклеточных эмбрионах является их малое количество, доступное для анализа, одной из задач исследования было минимизировать потери ооцитов и эмбрионов на этапе получения гель-слайдов ДНК-комет. Стандартная процедура получения гель-слайдов предусматривает два слоя агарозы – нижний слой из агарозы (подложка) и второй слой с клетками. Использование стандартного подхода приводило к потере до 90% ооцитов (данные не представлены) и до 60% эмбрионов (таблица 3.7). При распределении агарозного раствора по подложке наложением покровного стекла значительная часть ооцитов и эмбрионов, в виду значительно больших по сравнению с соматическими клетками размеров, вероятно соприкасается непосредственно с покровным стеклом и удаляется вместе с ним. Нанесение второго слоя агарозы кончиком наконечника пипетки и использование третьего слоя агарозы поверх второго позволило снизить количественные потери до приемлемых 10%. Исходя из этого для дальнейших экспериментов был отобран вариант с 3 слоями агарозы.

Таблица 3.7 – Влияние количества слоев агарозы на потери эмбрионов мыши при получении гель-слайдов ДНК-комет

Количество слоев агарозы на гель-слайде	Количество внесенных в гель эмбрионов	Количество доступных для анализа эмбрионов	Потери (%)
2 слоя агарозы	150	60	60
	164	69	58
	142	65	54
3 слоя агарозы	130	120	8
	128	119	7
	144	130	10

Ооциты и ранние эмбрионы мышей имеют так называемую зону пеллюцида – специализированную внеклеточную гликопротеиновую оболочку, выполняющую барьерные функции. Для оценки ее возможного вклада в качество микропрепаратов ДНК-комет и анализируемые показатели в исследованиях *in vitro* получали гель-слайды как с сохраненной, так и с предварительно удаленной зоной пеллюцида.

Удаление зоны пеллюцида у ооцитов приводило к полной диффузии их хроматина в геле и получению микропрепаратов ДНК-комет, не пригодных для анализа (рисунок 3.7, А).

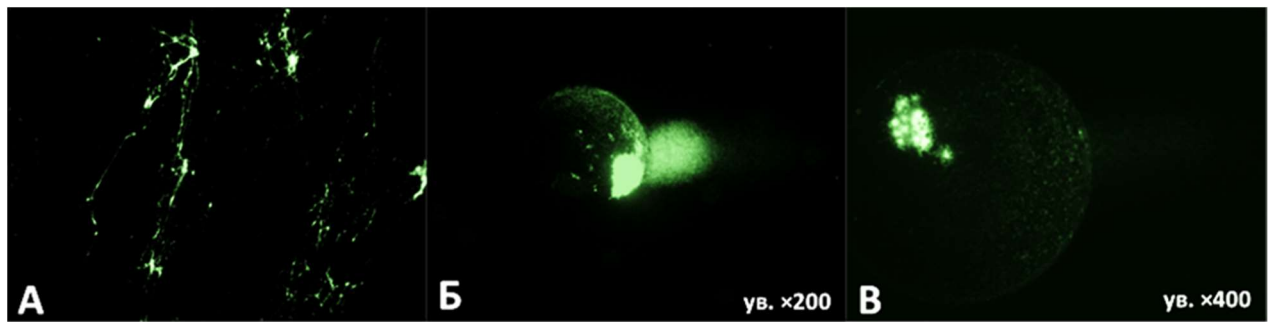


Рисунок 3.7 – Цифровое изображение с микропрепарата ДНК-комет ооцитов с удаленной (А) и сохраненной (Б и В) зоной пеллюцида

Сохранение зоны пеллюцида ограничивало полную диффузию хроматина в агарозный гель, приводя к формированию периклеточной полости в агарозном геле, позволяющей дифференцировать «хвост» ДНК-комет (рисунок 3.7, 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 (рисунок 3.8).

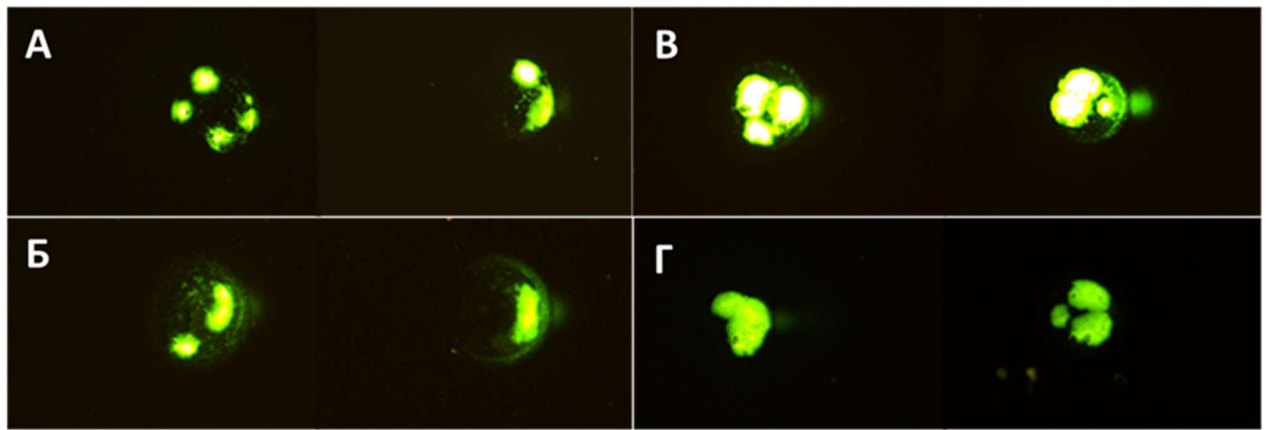


Рисунок 3.8 – Цифровое изображение с микропрепарата ДНК-комет одноклеточных эмбрионов мыши с сохраненной (А) и удаленной (Б) зоной пеллюцида, и двухклеточных эмбрионов с сохраненной (В) и удаленной (Г) зоной пеллюцида

Алгоритм цифровой обработки изображений ДНК-комет с помощью специализированных программных продуктов предполагает дифференциацию ДНК-комет на изображении на «голову» и «хвост» с последующим анализом различных параметров, таких как длина хвоста, %ДНК в хвосте или их произведение – момента хвоста (рисунок 2.1). Специфическая морфология ДНК-комет ооцитов и одно- и двухклеточных эмбрионов не позволяет использовать эти программные пакеты напрямую. На рисунке 3.9 представлены два изображения ДНК-комет двухклеточных эмбрионов, проанализированных с помощью трех программных продуктов для анализа изображений ДНК-комет – CASP, CometScore и OpenComet. Только одно изображение корректно проанализировано в программной среде CometScore (рисунок 3.9, Д), в остальных случаях изображения либо анализировались некорректно ввиду ошибочного определения границ головы/хвоста ДНК-комет (рисунок 3.9, Г, Б, Е), либо не поддавались анализу (рисунок 3.9, А, В). Аналогичные данные получены для пула других изображений ДНК-комет одно- и двухклеточных эмбрионов.

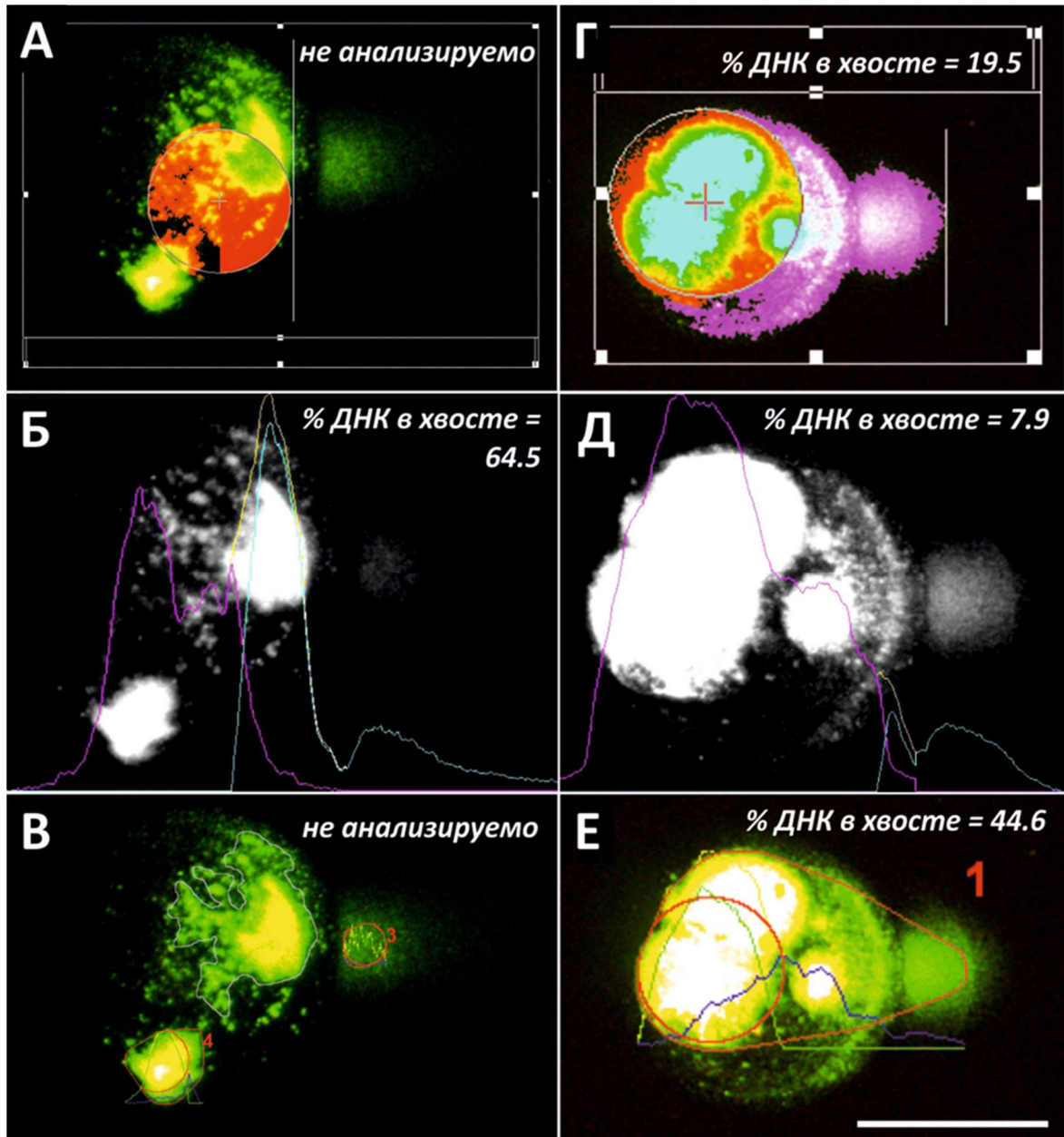
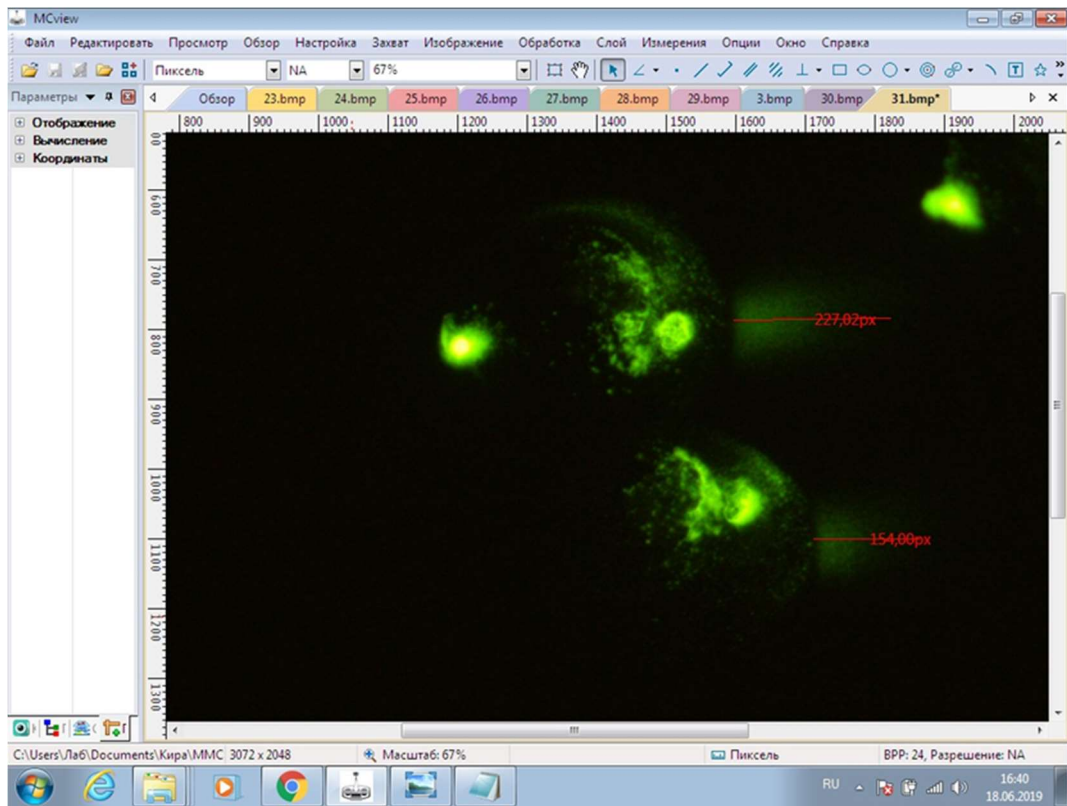


Рисунок 3.9 – Анализ изображений ДНК-комет двухклеточных эмбрионов мыши в программной среде CASP (А и Г), CometScore (Б и Д) и OpenComet (В и Е) (шкала – 50 мкм)

Поскольку граница полости, образуемой эмбрионами в агарозном геле, отчетливо различима, возможно определение положения начальной точки для измерения длины хвоста кометы и, соответственно, анализ поврежденности ДНК с использованием показателя «длина хвоста ДНК-комет» (длина хвоста). Для этого изображения ДНК-комет, полученные на совмещенном с цифровой камерой высокого разрешения МС-6.3 эпифлуоресцентном микроскопе

Микмед-6 (Ломо, Россия), анализировали с использованием программного обеспечения MCview в режиме ручного измерения (рисунок 3.10).



Примечание – Длину хвоста измеряли в пикселях, которые затем переводили в мкм с использованием калибровочного слайда.

Рисунок 3.10 – Анализ изображений ДНК-комет эмбрионов мыши в программной среде MCview

В экспериментах *in vitro* в качестве индуктора повреждений ДНК использовали диоксидин в конечной концентрации 1 мг/мл или митомицин С в конечной концентрации 0,25 мг/мл. Инкубацию проводили в течение 90 минут при 37°C.

В одноклеточных эмбрионах с сохраненной и удаленной зоной пеллюцида для негативного контроля показатель длины хвоста кометы значительно различался и составил 14,16 и 0,29 мкм, соответственно (таблица 3.8). Для обоих вариантов после воздействия диоксидина выявлено сходное увеличение показателя длины хвоста.

Таблица 3.8 – Влияние диоксидина 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 1 мг/мл	124	31,21 [16,55; 43,42]	<0,01
<i>с удаленной зоной пеллюцида</i>			
Контроль	121	0,29 [0; 10,98]	
Диоксидин 1 мг/мл	120	24,57 [16,76; 31,94]	<0,001

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

Аналогично для двухклеточных эмбрионов наблюдались выраженные различия в спонтанных показателях длины хвоста при удалении или сохранении зоны пеллюцида и сходные показатели для эмбрионов, подвергнутых воздействию митомицина С (таблица 3.9). В результате в экспериментах с сохраненной зоной пеллюцида статистически значимых эффектов митомицина С не выявлено.

Далее проведены эксперименты *in vivo* с экспозицией самок перед спариванием модельными генотоксикантами метилметансульфонатом, этопозидом и циклофосфамидом и оценкой поврежденности ДНК в полученных от них одноклеточных эмбрионах.

В эмбрионах негативного контроля показатель длины хвоста ДНК-комет составил 0,9 мкм (таблица 3.10). В эмбрионах от самок мышей, обработанных метилметансульфонатом в дозах 10, 20 и 30 мг/кг, уровень поврежденности ДНК зарегистрирован на уровне 0,6; 6,5 и 33,1 мкм, соответственно. Сравнение полученных данных с показателем в контрольной группе выявило статистически значимые различия для доз генотоксиканта 20 и 30 мг/кг.

Таблица 3.9 – Влияние митомицина С 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 0,25 мг/мл	114	13,29 [9,97; 18,64]	0,48
<i>с удаленной зоной пеллюцида</i>			
Контроль	124	0,29 [0; 11,56]	
Митомицин С 0,25 мг/мл	123	12,72 [0; 18,64]	<0,001

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

В экспериментах с введением самкам этопозида в дозах 10 и 20 мг/кг, показатель поврежденности составил 13,0 и 40,8 мкм, соответственно, что также статистически значимо отличалось от показателя в контрольной группе.

Выявлено повышение показателя длины хвоста ДНК-комет в эмбрионах, полученных от животных, обработанных циклофосфамидом в дозе 40 мг/кг, который составил 6,1 мкм. Однако статистически значимых различий с показателем в контрольной группе выявлено не было.

Предполагая, что важный вклад в качество получаемых микропрепаратов ДНК-комет ранних эмбрионов может вносить процедура лизиса клеточных мембран и экстракции белков, зависящая от состава лизирующего буфера, были опробованы различные варианты лизирующего буфера с анионными поверхностно-активными веществами:

- стандартный лизирующий буфер (раздел 2.4.1), инкубация 90 минут при 4°C – (ЛБ);
- стандартный лизирующий буфер, содержащий 2% натрия додецилсульфат (SDS), инкубация 90 минут при 22°C – (ЛБ+SDS);
- стандартный лизирующий буфер, содержащий 1% натрия лаурилсаркозинат (SLS), инкубация 90 минут при 4°C – (ЛБ+SLS).

Таблица 3.10 – Поврежденность ДНК в одноклеточных эмбрионах самок, экспонированных модельными генотоксикантами *in vivo*

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

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

Результаты экспериментов, представленные в таблице 3.11, показывают, что добавление натрия додецилсульфата или натрия лаурилсаркозината в состав лизирующего буфера не оказывает влияния на лизис клеточных мембран одноклеточных и/или релаксацию и миграцию ДНК. Не было выявлено статистически значимой разницы показателя уровня повреждений ДНК как между контрольными группами, так и между группами животных, обработанных циклофосфамидом в дозе 40 мг/кг.

Таблица 3.11 – Зависимость показателя длины хвоста ДНК-комет в одноклеточных эмбрионах от состава лизирующего буфера

Условия эксперимента	Вариант лизирующего буфера	Анализировано эмбрионов	Длина хвоста ДНК-комет (медиана [Q25%; Q75%], мкм)
Контроль	ЛБ	124	0,87 [0; 11,45]
	ЛБ+SDS	120	0,87 [0; 10,55]
	ЛБ+SLS	119	1,45 [0; 16,76]
Циклофосфамид 40 мг/кг	ЛБ	125	6,07 [0; 10,40]
	ЛБ+SDS	123	7,23 [0; 10,40]
	ЛБ+SLS	124	7,37 [0; 13,95]

Проведение метода ДНК-комет на сперматозоидах мышей.

Сперматозоиды характеризуются отличной от соматических клеток структурной организацией хроматина. В соматических клетках ДНК упакована вокруг гистоновых белков (октамеров) с формированием нуклеосом, которые далее укладываются в хроматин различной степени плотности в зависимости от клеточного цикла (наибольшая в метафазных хромосомах). В процессе сперматогенеза у большинства эукариотических организмов нуклеогистоновая организация хроматина подвергается полному ремоделированию: большая часть гистонов (90–95% у человека) замещается небольшими, богатыми аргинином и цистеином белками – протаминами, с последующей укладкой ДНК в тороидальные (кольцеобразные) петли [264]. Такая структура обеспечивает сверхкомпактизацию и высокую степень стабилизации хроматина сперматозоидов. Стандартно используемый в методе ДНК-комет лизирующий буфер не содержит компонентов, способных удалять протаминовые белки из хроматина. Исходя из этого, для депротеинизации хроматина сперматозоидов в состав лизирующих буферов включают агенты, способные ферментативно расщеплять белки (протеиназа К), разрушать образуемые между цистеинами протаминов ковалентные S-S связи (меркаптоэтанол, дитиотреитол), либо их сочетание.

Для экспериментов использовали сперматозоиды, полученные от интактных самцов мышей F₁ CBA×C57Bl/6. Гель-слайды получали как описано в разделе 2.6. По окончании лизиса проводили деконденсацию хроматина различными способами и электрофорез при различных значениях pH. Полученные данные представлены в таблице 3.12.

При стандартных условиях метода с проведением щелочной денатурации и электрофореза при pH >13 средний показатель поврежденности %ДНК в хвосте оказался сходным для всех вариантов деконденсации хроматина и варьировался в пределах 32–36%. При этом, если для органов/тканей индивидуальные показатели поврежденности ДНК для соматических клеток варьируются в широком диапазоне (от 0 до 75% ДНК в

хвосте), в случае со сперматозоидами наблюдается относительное гомогенное распределение ДНК-комет по степени поврежденности ДНК – от 25 до 44% ДНК в хвосте (рисунок 3.11).

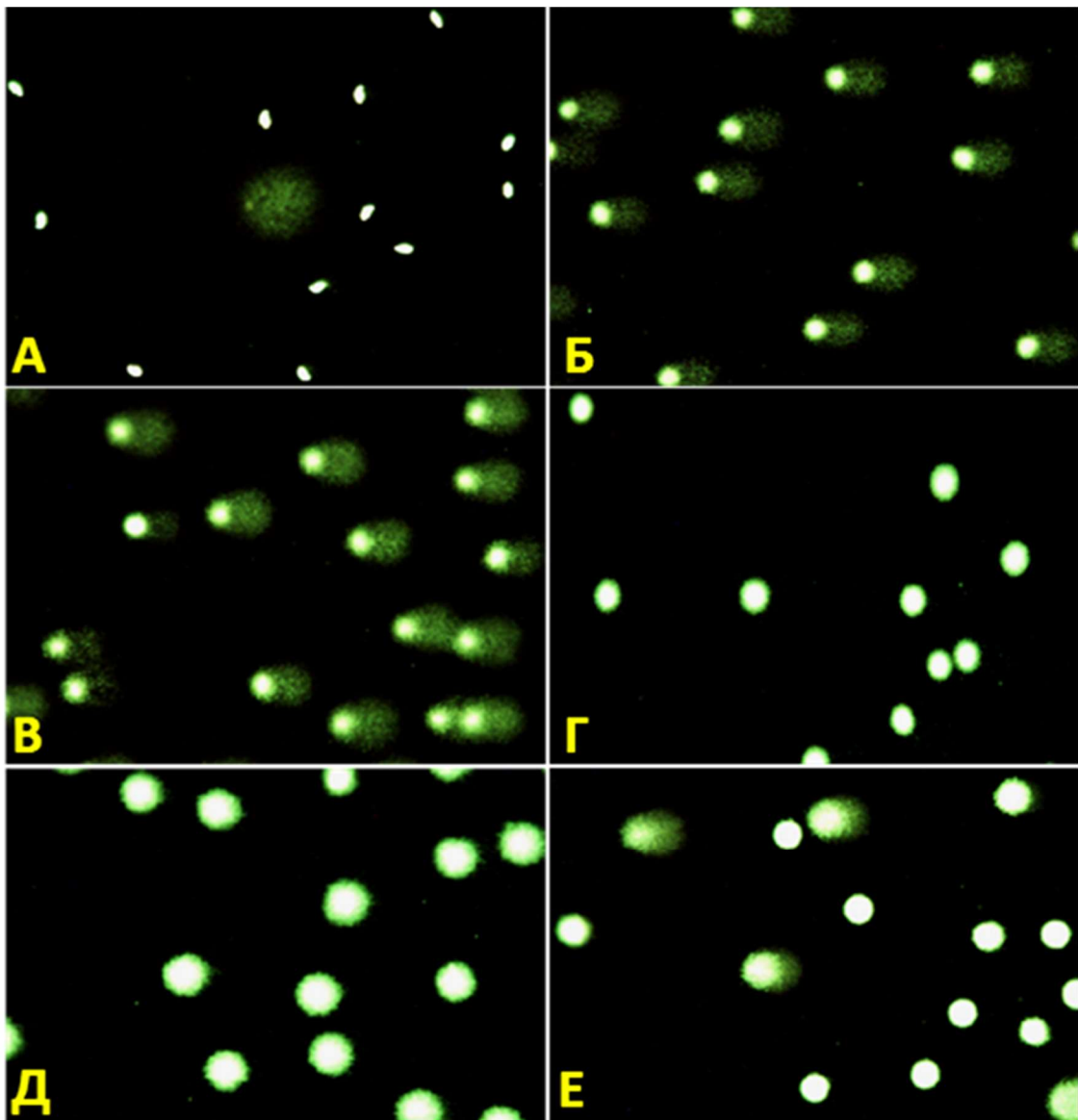
Таблица 3.12 – Показатели поврежденности ДНК сперматозоидов интактных мышей при различных условиях деконденсации хроматина и электрофореза

Условия деконденсации	Значение рН при электрофорезе	% ДНК в хвосте (min-max)
Только дитиотреитол (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 + этопозид 25 мкг/мл	>13	36,4 (21–44)
ДТТ → дииодсалицилат лития + этопозид 25 мкг/мл	>13	32,8 (24–35)
ДТТ → дииодсалицилат лития + ауриINTRикарбоновая кислота 10 мкМ	>13	35,8 (21–39)
ДТТ → дииодсалицилат лития + ауриINTRикарбоновая кислота 50 мкМ	>13	32,5 (31–39)
ДТТ → дииодсалицилат лития	12,6	32,5 (31–34)
	12,1	3,4 (2–5)
	7,5	2,2 (2–4)

Для исключения возможного влияния на целостность ДНК, ассоциированной с ядерным матриксом сперматозоидов топоизомеразы II и эндогенных нуклеаз, провели эксперименты с использованием соответствующих ингибиторов – этопозиды и ауриINTRикарбоновой кислоты. Значимых различий не выявлено.

Далее провели эксперименты с электрофорезом при различных значениях рН. Показатели, полученные при проведении щелочной денатурации и электрофореза при рН=12,6, не различались значимо от таковых, полученных для рН>13, тогда как при рН=12,1 и в условиях нейтрального электрофореза (рН=7,5) средние значения %ДНК в хвосте снизились до 3,4 и 2,2 соответственно. Поскольку переход щелочно-

лабильных сайтов ДНК в однонитевые разрывы начинает происходить при значениях $\text{pH} \geq 12,6$ и достигает оптимума при $\text{pH} > 13,0$ [265], полученные данные позволяют утверждать, что ДНК сперматозоидов изначально содержит физиологически обусловленный высокий уровень щелочно-лабильных сайтов. В пользу этого свидетельствует и относительная гомогенность распределения показателя на микропрепаратах.



Примечание – А – без деконденсации хроматина (в середине кадра – ДНК-комета соматической клетки); Б – электрофорез при $\text{pH} > 13$; В – электрофорез при $\text{pH} = 12,6$; Г – электрофорез при $\text{pH} = 12,1$; Д – электрофорез в нейтральных условиях ($\text{pH} = 7,5$); Е – ДНК-кометы клеток селезенки ($\text{pH} > 13$).

Рисунок 3.11 – Цифровые изображения с микропрепаратов ДНК-комет сперматозоидов мыши

Обсуждение результатов

Одним из преимуществ метода ДНК-комет является возможность проведения анализа на ограниченном количестве экспериментального материала, что позволяет применить его для оценки поврежденности ДНК в ооцитах и ранних (предимплантационных) эмбрионах экспериментальных животных. В имеющихся немногочисленных исследованиях, посвященных оценке повреждений ДНК в одно- и двухклеточных эмбрионах, при получении гель-слайдов использовался стандартный подход с двумя слоями агарозы, что приводило к потере и без того небольшого количества материала [266–269]. Поскольку в этих исследованиях использовались замороженные эмбрионы, авторы предположили, что замораживание-размораживание эмбрионов может приводить к истончению у них зоны пеллюцида и, как результат, к разрушению эмбрионов при их переносе в агарозный гель. В настоящем исследовании на свежеизолированных эмбрионах с неповрежденной зоной пеллюцида при использовании протокола с двумя слоями также наблюдалась значительная потеря. Предположительно она происходит на этапе удаления покровных стекол с гель-слайдов. При выравнивании агарозного геля с клетками с помощью покровных стекол образуется тонкий плоский слой геля, и ввиду больших размеров эмбрионы могут располагаться вплотную к покровному стеклу или соприкасаться с ним. Поэтому большая часть клеток может удаляться при снятии покровного стекла. Нанесение второго слоя агарозы кончиком наконечника пипетки и использование третьего слоя агарозы поверх второго позволило решить данную методическую проблему.

В исследовании на двухклеточных эмбрионах мыши было показано, что наличие/отсутствие зоны пеллюцида не оказывает значимого влияния на спонтанную и индуцированную поврежденность ДНК, оцениваемую методом ДНК-комет [269]. В настоящих экспериментах выявлены существенные различия в показателе длины хвоста ДНК-комет у контрольных эмбрионов с удаленной и сохраненной зоной пеллюцида. Причины того, почему при удалении зоны пеллюцида наблюдается значительно меньшая спонтанная, но

не индуцированная поврежденность ДНК, не ясны. Высокий спонтанный уровень повреждений ДНК значительно снижает чувствительность метода, поскольку не позволяет достоверно выявить значимые различия при невысоких уровнях воздействия, как показано на примере митомицина С в настоящем исследовании. Исходя из этого, методически оправдано проведение метода ДНК-комет на эмбрионах с удаленной зоной пеллюцида. Проведенные эксперименты показывают, что данный методический прием не применим для ооцитов, поскольку в их случае удаление зоны пеллюцида приводит к полной диффузии хроматина клеток в агарозный гель и невозможности проведения анализа.

Метод ДНК-комет сегодня рассматривается как высокочувствительный инструмент для оценки целостности ДНК сперматозоидов [270]. Накоплен опыт его применения в экспериментальных и клинических исследованиях механизмов мужского бесплодия, во вспомогательных репродуктивных технологиях. Так, установлена обратная зависимость между уровнем поврежденности ДНК сперматозоидов, выявляемой методом ДНК-комет, и эффективностью экстракорпорального оплодотворения, а также прямая корреляция с частотой спонтанных аборт [271]. Методом ДНК-комет в сперматозоидах показаны генотоксические эффекты ионизирующих излучений и широкого ряда химических генотоксикантов, выявлены антимуtagenные эффекты некоторых природных соединений [270].

Вместе с этим анализ экспериментальных данных этих работ демонстрирует не находящий на сегодня объяснение феномен – значительно высокие по сравнению с соматическими клетками показатели спонтанного уровня поврежденности ДНК в сперматозоидах у всех исследованных эукариот, в том числе у человека [270, 272]. Так, если для соматических клеток, в зависимости от их типа, показатель %ДНК в хвосте варьируется в среднем в пределах 0–10%, то по данным большинства исследований для сперматозоидов этот показатель варьирует от 25 до 50% ДНК в хвосте (32–36% в настоящем исследовании). Как и в случае с эмбрионами с сохраненной

зоной пеллюцида, высокий спонтанный уровень повреждений ДНК не позволяет достоверно выявить значимые различия при невысоких уровнях генотоксических воздействий.

В настоящих экспериментах установлено, что способ деконденсации хроматина не оказывает значимого влияния на оцениваемый показатель и наблюдаемый высокий уровень поврежденности ДНК не связан с артефактной фрагментацией ДНК под действием эндогенных факторов. Данные экспериментов с проведением электрофореза при различных рН свидетельствуют о том, что ДНК сперматозоидов *per se* содержит высокие уровни щелочно-лабильных сайтов, обуславливающих, в свою очередь, высокие показатели поврежденности ДНК при оценке методом ДНК-комет в стандартной щелочной версии (рН>13). Природа высокого уровня щелочно-лабильных сайтов в ДНК сперматозоидов не ясна. Так, сверхкомпактизированная ДНК эритроцитов курицы также содержит высокие уровни щелочно-лабильных сайтов, что позволяет предположить их важную роль в компактизации хроматина [273]. Проведение метода с щелочной денатурацией и электрофорезом при рН<12,6 позволяет исключить реализацию щелочно-лабильных сайтов в одностранные разрывы и снизить таким образом показатель спонтанного уровня, однако это значимо снижает и чувствительность метода.

Эксперименты *in vivo* показывают, что повреждения ДНК, индуцированные в ооцитах, сохраняются и могут быть выявлены методом ДНК-комет в одноклеточных эмбрионах, полученных от экспонированных животных. Из трех использованных модельных генотоксикантов два продемонстрировали выраженный генотоксический эффект. Обработка самок циклофосфамидом также приводила к увеличению показателя поврежденности ДНК в одноклеточных эмбрионах. Хотя статистически значимых различий не выявлено, их логично ожидать при увеличении экспериментальной выборки. В двух исследованиях было показано, что обработка самцов крыс циклофосфамидом приводит к увеличению

поврежденности ДНК и экспрессии генов репарации в полученных от них эмбрионах [274, 275]. Таким образом повреждения ДНК, индуцируемые в половых клетках как самцов, так и самок, могут быть успешно выявлены в полученных от них предимплантационных эмбрионах. Такой подход, помимо «обхода» проблемы выявленных методических сложностей оценки повреждений ДНК непосредственно в ооцитах и сперматозоидах, имеет одно важное преимущество. Согласно текущим регуляторным требованиям, в случае выявления у лекарственных средств генотоксичности стандартных *in vivo* тестах целесообразность их дальнейшей разработки и применения определяется на основе оценки «польза-риск», включающей изучение в том числе потенциальные генотоксические риски для потомства [3, 7, 221]. Использование для этих целей предимплантационных эмбрионов экспонированных животных позволяет более точно охарактеризовать такие риски, поскольку регистрирует генотоксические поражения, прошедшие «мейотический» фильтр.

Заключение

По результатам проведенных исследований предложены методические приемы регистрации повреждений ДНК методом ДНК-комет в половых и эмбриональных клетках экспериментальных животных. Наиболее целесообразным для оценки генотоксических рисков в половых клетках определен подход, предусматривающий регистрацию повреждений ДНК в одно- и двухклеточных эмбрионах, полученных от экспонированных животных.

3.3 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

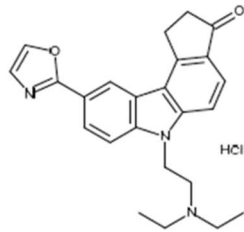
биомедицинских и фармацевтических технологий». Генотоксическая активность выявлена для 3 средств-кандидатов. В одном случае полученные экспериментальные данные с согласия спонсора (заказчика) исследования опубликованы в виде научной статьи. Также методом ДНК-комет проведена оценка генотоксичности двух широко применяемых лекарственных средств с неоднозначными данными об их генотоксическом потенциале.

Оценка генотоксичности производного карбазола

Производные карбазола обладают широким спектром биологической активности, включая нейропротекторную, противовирусную и антибактериальную. Компанией Cleveland Biolabs Inc. был синтезирован ряд производных карбазола, обладающих противогрибковой активностью, среди которых высокий потенциал *in vitro* продемонстрировали два соединения из подкласса ксеномицинов – PLX01107 и PLX01008 (рисунок 3.12). Наличие у карбазола и некоторых его производных генотоксичности, связанной предположительно со способностью интеркалировать ДНК, вызывает обоснованные опасения относительно генетической безопасности этих соединений [276]. В рамках доклинических исследований генотоксическая активность PLX01107 оценена в батарее тестов, в том числе методом ДНК-комет.

Эксперименты проведены на самцах мышей F₁ CBA×C57Bl/6. Во всех экспериментах соединение вводили внутривенно в 30% растворе 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина в 50 мМ ацетатном буфере (pH 4,5). Мышам групп негативного контроля вводили эквивалентные объемы растворителя. В качестве позитивного контроля использовали мышей, которым внутривенно однократно вводили генотоксиканты циклофосфамид в дозе 20 мг/кг на срок 24 часа (тест на индукцию хромосомных aberrаций) или метилметансульфонат в дозе 40 мг/кг на срок 3 часа (метод ДНК-комет).

PLX01107



PLX01008

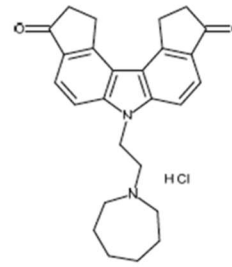


Рисунок 3.12 – Химическая структура ксеномицинов PLX01107 и PLX01008

В тесте Эймса на штаммах *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 и штаммах *E. coli* uvrA и pKM101 соединение не продемонстрировало мутагенной активности (данные не представлены). В цитогенетическом тесте *in vivo* соединение при однократном введении на срок 24 часа в диапазоне доз 15–75 мг/кг дозозависимо индуцировало выход клеток с хромосомными aberrациями (таблица 3.13). При многократном введении в наименьшей из использованных доз 15 мг/кг цитогенетическая активность у соединения не выявлена.

Таблица 3.13 – Цитогенетические эффекты соединения PLX01107 в клетках костного мозга мышей *in vivo*

Группа	на 100 клеток					Метафаз с aberrациями (M±SE, %)
	гепов	хроматидных фрагментов	хромосомных фрагментов	обменов	метафаз с МП ^а	
Контроль	0	0,4	0	0	0	0,4±0,3
Циклофосфамид 20 мг/кг	1,0	6,5	0	10,5	1,3	16,8±1,7**
PLX01107						
15 мг/кг	0,2	1,6	0	0	0	1,8±0,8
30 мг/кг	0,6	3,0	0	0	0,2	3,4±1,1*
60 мг/кг	0,2	7,0	0	0,2	0	6,2±2,2**
68 мг/кг	2,0	18,6	0,8	0	0,8	15,5±4,2**
75 мг/кг	2,6	36,2	2,4	1,4	12,2	35,4±13,6**
15 мг/кг (5-кратно)	0,2	1,4	0	0	0	1,6±0,6

Примечание – ^а – метафаз с множественными (≥5) повреждениями хромосом; * – p<0,05 и ** – p<0,001 по сравнению с контролем (φ – критерий Фишера).

Далее оценен генотоксический потенциал PLX01107 методом ДНК-комет. В тесте на хромосомные aberrации PLX01107 в дозе 75 мг/кг более чем на 50% снижал митотический индекс. Поскольку цитотоксичность может быть фактором, искажающим результаты метода ДНК-комет, во избежание ложноположительных эффектов максимальная исследованная доза соединения составила 60 мг/кг. В эксперименте с 3-часовой экспозицией не выявлено увеличение уровней повреждений ДНК под действием PLX01107 (таблица 3.14). В условиях 24-часовой экспозиции зарегистрировано увеличение поврежденности ДНК в клетках печени в дозах соединения 30 и 60 мг/кг.

Таблица 3.14 – Влияние соединения PLX01107 на уровень повреждений ДНК в органах/тканях мышей *in vivo*

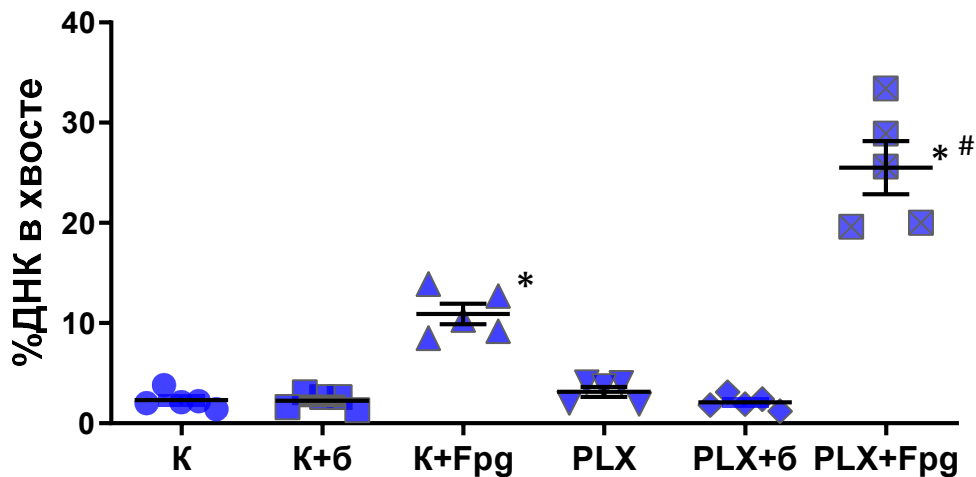
Орган/срок экспозиции		%ДНК в хвосте				
		Контроль	ММС 40 мг/кг	PLX01107		
				15 мг/кг	30 мг/кг	60 мг/кг
Костный мозг	3 ч	1,3±0,5	19,9±5,5*	1,4±0,5	1,1±0,4	0,8±0,3
	24 ч	1,1±0,3		2,1±1,7	2,1±1,6	0,7±0,4
Печень	3 ч	2,0±0,6	25,5±7,6*	1,0±0,3	1,9±1,2	2,1±0,7
	24 ч	1,8±0,2		2,4±0,8	6,0±1,5**	5,3±1,7**
Почки	3 ч	2,0±0,8	34,2±5,0*	3,3±1,5	3,0±2,0	1,9±0,9
	24 ч	3,2±0,6		2,9±0,5	3,9±1,0	2,9±1,2
Селезенка	3 ч	1,0±0,3	16,9±4,3*	0,9±0,3	1,0±0,2	0,8±0,4
	24 ч	0,8±0,5		1,4±1,2	0,8±0,3	0,5±0,1

Примечание – ММС – метилметансульфонат; * – $p < 0,001$ по сравнению с контролем (U-критерий Манна-Уитни); ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем (критерий Даннета).

Для повышения чувствительности детекции повреждений ДНК методом ДНК-комет образцы клеток костного мозга, полученные от животных, обработанных соединением в дозе 30 мг/кг на срок 3 часа, дополнительно исследованы в модификации метода с использованием фермента

формами допириимидин-ДНК-гликозилазы (Fpg), позволяющей специфически выявлять поврежденные пуриновые основания (раздел 2.4.3).

Обработка клеток костного мозга контрольных животных ферментом Fpg привела к увеличению фонового показателя %ДНК в хвосте в 4,9 раза, что свидетельствует о присутствии в ДНК в норме определенного уровня поврежденных пуриновых оснований (рисунок 3.13). Обработка ферментом Fpg клеток костного мозга животных, получивших PLX01107 в дозе 30 мг/кг на 3 часа, приводила к возрастанию фонового показателя %ДНК в хвосте в 12,3 раза. Полученные данные показывают, что PLX01107 в указанной дозе и сроке экспозиции увеличивает в ДНК клеток костного мозга количество Fpg-чувствительных сайтов.



Примечание – К – клетки контрольных животных; К+б – те же клетки после обработки буфером для фермента; К+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 К+б; # – $p < 0,001$ по сравнению с группой PLX+б (U-критерий Манна-Уитни).

Рисунок 3.13 – Специфическая детекция поврежденных пуриновых оснований в ДНК клеток костного мозга мышей

Таким образом, производное карбазола, соединение PLX01107, не проявляя мутагенности в тесте Эймса, демонстрирует выраженную цитогенетическую активность *in vivo*. Сходные генотоксические эффекты

были ранее показаны и в отношении самого карбазола [277]. Предположительно наблюдаемые эффекты PLX01107 могут быть объяснены его способностью вызывать меж- и внутринитевые сшивки ДНК. Такие агенты вызывают крупные хромосомные aberrации (делеции, транслокации и т.д.), приводящие в первую очередь к кластогенным, но не мутагенным эффектам. При использовании метода ДНК-комет в стандартной версии получены неоднозначные результаты: соединение PLX01107 приводит к слабовыраженному увеличению поврежденности ДНК только в клетках печени в условиях 24-часовой экспозиции, тогда как в костном мозге, в котором оно продемонстрировало выраженный дозозависимый кластогенный эффект, увеличение поврежденности ДНК не зарегистрировано. Применение модификации метода с использованием фермента формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы позволило зарегистрировать повреждающую ДНК активность в клетках костного мозга. Полученные данные позволяют заключить, что соединение PLX01107 вызывает повреждение пуриновых оснований ДНК, приводящее к возникновению продуктов с открытыми имидазольными кольцами – формамидопиримидинов [42]. Установлено, что многие индукторы сшивок ДНК-ДНК (например митомицин С) алкилируют гуанин в положении N⁷ с последующим гидролизом основания и образованием Фару-Gua [278]. Таким образом результаты настоящего исследования показывают, что модификация метода ДНК-комет с применением ферментов репарации ДНК значительно повышает чувствительность метода [279].

Оценка генотоксичности парацетамола методом ДНК-комет

Парацетамол представляет собой безрецептурное анальгезирующее и жаропонижающее средство, широко применяемое в клинической практике [280]. В педиатрии его назначают, начиная с трехмесячного возраста, в дозах 10–15 мг/кг, тогда как для взрослых максимальная суточная доза достигает 4 г [280, 281]. Несмотря на наличие нескольких десятков исследований, посвященных оценке генотоксичности парацетамола с использованием

широкого спектра методов и тест-систем, их результаты остаются противоречивыми.

Эксперименты проведены на самцах мышей F₁ СВА×С57В1/6. Парацетамол в дозах 30, 60 и 300 мг/кг на срок 3 часа и дозах 30 и 60 мг/кг на срок 24 часа вводили перорально, в виде суспензии в 0,5% растворе Twin-80. Мышам группы негативного контроля вводили эквивалентные объемы растворителя. В качестве позитивного контроля использовали мышей, которым вводили генотоксикант метилметансульфонат в дозе 40 мг/кг, внутрибрюшинно, на срок 3 часа.

В дозах 30 и 60 мг/кг в условиях 3 и 24-часовой экспозиции парацетамол не индуцировал повреждений ДНК в исследуемых органах/тканях (таблица 3.15). Ранее с использованием метода ДНК-комет было показано, что в дозах 12 и 60 мг/кг парацетамол не обладает повреждающей ДНК активностью, тогда как в дозе 300 мг/кг демонстрирует генотоксический эффект в клетках печени в условиях 4-часовой экспозиции [282]. Далее проведены эксперименты по оценке активности парацетамола в указанной дозе в условиях 3-часовой экспозиции. Препарат не индуцировал повреждений ДНК ни в одном из исследованных органов/тканей, однако при этом в печени значимо увеличивал уровень атипичных ДНК-комет до 14,4% против 1,2% в контроле.

Считается, что появление атипичных ДНК-комет при коротких сроках экспозиции является свидетельством цитотоксического воздействия [238]. При этом наблюдается бимодальное распределение клеток по степени поврежденности ДНК, в отличие от генотоксического эффекта, когда ДНК-повреждения выявляются в основном пуле клеток (рисунок 3.14).

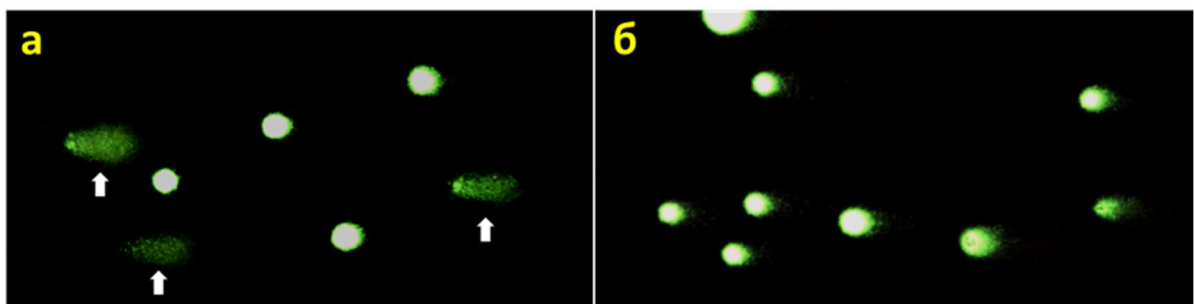
В работе [282] в качестве показателя поврежденности ДНК была использована доля ДНК-комет, имеющих хвосты (tailed comets). Вероятно, авторы включили атипичные ДНК-кометы в общий анализ, что и позволило им интерпретировать выявленный эффект как генотоксический. Заслуживают внимания данные исследования, в котором методом щелочной элюции

показана способность парацетамола в дозе 600 мг/кг индуцировать однонитевые разрывы ДНК в клетках печени мышей [283]. Наблюдавшийся при этом бифазный профиль элюции, по мнению авторов, свидетельствовал о том, что разрывы ДНК индуцировались в определенной субпопуляции гепатоцитов.

Таблица 3.15 – Влияние парацетамола на уровень повреждений ДНК в органах/тканях мышей *in vivo*

Группа	%ДНК в хвосте (m±SD)				
	костный мозг	печень	почки	селезенка	головой мозг
<u>экспозиция 3 часа</u>					
Негативный контроль	1,4±0,4	1,6±0,3	1,4±0,5	1,0±0,4	0,9±0,5
ММС 40 мг/кг	20,4±0,2*	21,1±0,6*	20,6±0,2*	16,1±0,3*	15,0±2,4*
ПЛ 30 мг/кг	2,4±0,7	1,3±0,4	2,3±2,2	1,1±0,4	1,2±0,3
ПЛ 60 мг/кг	2,0±0,6	1,6±0,6	2,4±0,7	1,1±0,5	1,2±0,5
<u>экспозиция 24 часа</u>					
Негативный контроль	0,6±0,4	0,5±0,3 (1,2%) ^a	0,6±0,3	0,5±0,3	0,3±0,2
ПЛ 300 мг/кг	0,6±0,3	0,5±0,3 (14,4%) ^a	0,8±0,4	0,4±0,3	0,4±0,3
Негативный контроль	1,4±0,5	1,5±0,9	1,1±0,2	0,8±0,2	1,0±0,4
ПЛ 30 мг/кг	1,7±0,3	1,5±0,4	1,4±0,6	1,2±0,6	1,0±0,3
ПЛ 60 мг/кг	2,0±0,7	1,5±0,6	1,3±0,4	1,1±0,2	0,9±0,4

Примечание – ММС – метилметансульфонат; ПЛ – парацетамол; * – $p < 0,001$ по сравнению с контролем (U-критерий Манна-Уитни); ^a – уровень атипичных ДНК-комет.



Примечание – Стрелками указаны атипичные ДНК-кометы.

Рисунок 3.14 – Изображения ДНК-комет микропрепаратов печени мышей, обработанных парацетамолом 300 мг/кг (а) и метилметансульфонатом 40 мг/кг (б)

Таким образом, в дозах 30 и 60 мг/кг парацетамол не индуцирует повреждения ДНК в клетках печени, почек, селезенки, костного и головного мозга. Выявление под действием парацетамола в дозе 300 мг/кг в печени атипичных ДНК-комет расценивается как свидетельство его гепатотоксического, но не генотоксического действия.

Оценка генотоксичности морфина

Сегодня морфин широко применяется 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 [284]. Для морфина показана способность ингибировать репликацию или репарацию ДНК, что предполагает наличие у него генотоксического потенциала [284]. В 2020 г. употребление продуктов опиума отнесено к группе 1 канцерогенов по классификации МАИР. Указанное актуализирует изучение генотоксичности опиатов с применением современной методологии тестирования. Перед проведением масштабных исследований с целью определения их целесообразности выполнено пилотное исследование с использованием двух *in vivo* тестов.

Эксперименты выполнены на самцах мышей-гибридов F₁ СВА×С57В1/6. Морфин растворяли в воде для инъекций и вводили в дозе 50 мг/кг внутривбрюшинно однократно или многократно в течение 5 дней (один раз в день). При выборе дозы морфина основывались на литературных данных о его фармакокинетического и токсикологического профилях [285]. Животным контрольных групп вводили эквивалентные объемы воды для инъекций.

Результаты цитогенетического анализа показали, что в используемой дозе и режимах введения морфин не индуцирует хромосомные aberrации в клетках костного мозга мышей *in vivo* (таблица 3.16).

При однократном введении морфина зарегистрирован слабовыраженный генотоксический эффект в клетках печени (таблица 3.17).

Таблица 3.16 – Цитогенетические эффекты морфина в клетках костного мозга мышей *in vivo*

Условия эксперимента	на 100 клеток					Метафаз с абберациями (M±SE, %)
	гепов	хроматидных фрагментов	хромосомных фрагментов	обменов	метафаз с МП ^а	
Контроль	0,4	0,8	0	0	0	1,2±0,5
Морфин 50 мг/кг, однократно	0,2	1,4	0	0	0	1,6 ± 0,6
Морфин 50 мг/кг, 5-кратно	0	0,8	0	0	0	0,8 ± 0,4
Митомизин С 2,5 мг/кг	2,4	27,6	0,2	1,4	4,2	24,2±1,9*

Примечание – ^а – метафаз с множественными (≥5) повреждениями хромосом; * – p<0,001 по сравнению с контролем (φ – критерий Фишера).

Таблица 3.17 – Влияние морфина на уровень повреждений ДНК в органах/тканях мышей *in vivo* в условиях однократного введения

Условия эксперимента	%ДНК в хвосте				
	костный мозг	кровь	кора головного мозга	печень	селезенка
Контроль					
1	1,5	0,6	1,1	0,8	0,6
2	2,0	1,0	0,7	0,6	0,5
3	1,4	0,9	0,8	1,3	0,7
4	1,7	0,5	0,9	0,8	0,3
5	1,1	0,6	0,5	1,1	0,4
m±SD	1,5±0,6	0,7±0,4	0,8±0,4	0,9±0,4	0,5±0,3
Морфин 50 мг/кг					
1	3,2	0,7	0,9	5,7	0,3
2	1,6	1,0	0,4	2,4	0,3
3	2,7	0,7	1,5	3,8	0,3
4	1,4	0,6	0,8	3,9	0,6
5	1,4	0,8	1,0	3,5	0,5
m±SD	2,1±0,6	0,8±0,4	0,91±0,42	3,9±0,9*	0,4±0,3
Метилметансульфонат 30 мг/кг					
1	13,4	7,4	4,2	14,3	5,9
2	7,1	7,7	5,3	12,9	6,2
3	10,9	5,9	6,1	12,0	12,1
4	14,6	7,8	17,4	14,1	12,2
5	9,1	5,1	13,2	11,2	5,7
m±SD	11,0±3,1**	6,8±1,2**	9,2±5,8**	12,9±1,3**	8,4±3,4**

Примечание – * – p < 0,01 по сравнению с контролем и ** – p < 0,001 по сравнению с контролем (U-критерий Манна-Уитни).

Эксперименты с 5-кратным введением морфина и расширенным набором анализируемых органов/тканей выявили повреждающий ДНК эффект морфина только в клетках коры головного мозга (таблица 3.18).

Таблица 3.18 – Влияние морфина на уровень повреждений ДНК в органах/тканях мышей *in vivo* в условиях многократного введения

Условия эксперимента	%ДНК в хвосте						
	костный мозг	кровь	кора головного мозга	печень	селезенка	спинной мозг	таламус
Негативный контроль							
1	2,5	1,0	1,5	1,4	1,9	3,9	2,7
2	2,7	0,9	1,1	1,6	1,7	1,4	1,3
3	1,6	1,2	1,4	2,1	1,7	5,0	1,4
4	0,9	0,7	2,1	1,1	1,0	2,5	1,3
5	1,5	0,9	1,6	2,4	1,0	3,0	1,5
<i>m</i> ±SD	1,8±0,6	0,9±0,4	1,5±0,5	1,7±0,6	1,5±0,5	3,2±0,8	1,6±0,6
Морфин 50 мг/кг							
1	1,9	1,1	5,6	3,4	1,3	5,5	2,3
2	1,5	0,8	3,8	1,9	0,6	4,1	3,5
3	1,3	1,3	2,9	2,3	2,0	5,0	1,0
4	1,8	0,7	3,6	5,1	1,5	3,1	3,8
5	0,8	0,7	2,4	3,2	1,1	2,8	3,3
<i>m</i> ±SD	1,5±0,5	0,9±0,4	3,7±0,8*	3,2±0,8	1,3±0,5	4,1±0,9	2,8±0,7

Примечание – * – $p < 0,01$ по сравнению с контролем (U-критерий Манна-Уитни).

Заключение

В результате исследований выявлены ранее неизвестные, регистрируемые на уровне первичных повреждений ДНК генотоксические эффекты морфина, характеризующиеся тканеспецифичностью и зависимостью от режима применения. Это указывает на необходимость дальнейшего развернутого исследования морфина и других опиатов на генотоксическую активность. Имеющиеся в литературе сведения о генотоксичности парацетамола не подтверждены в настоящем исследовании.

На основе опыта доклинической оценки 34 лекарственных средств-кандидатов и экспериментальных исследований с применением метода ДНК-комет разработана серия методических рекомендаций и методические

указания по оценке генотоксичности *in vitro* и *in vivo* методом ДНК-комет в щелочной версии.

3.4 Оценка генотоксичности нанокристаллов кремния и катионных липосомальных наночастиц

Уникальные свойства наночастиц, определяющие их эффективность, могут одновременно являться источником непредсказуемых биологических эффектов. Токсичность наночастиц хорошо изучена в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, в то время как сведения о их генотоксическом потенциале находятся на этапе накопления экспериментальных данных. Отличительные особенности проявления генотоксических эффектов наночастиц определяют необходимость оптимизации существующей методологии оценки генотоксичности, в частности применения высокочувствительных тестов оценки повреждений ДНК, такого как метод ДНК-комет.

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 [286]. Катионные липосомальные наночастицы рассматриваются как эффективные носители для адресной доставки терапевтических нуклеиновых кислот (ДНК, siРНК, мРНК и других) [287].

Оценка генотоксичности нанокристаллов кремния

Исследования проведены совместно с сотрудниками кафедры физики низких температур и сверхпроводимости физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова под руководством д.ф.-м.н, профессора Тимошенко В.Ю.

Получение и характеристика нанокристаллов кремния. Образцы нанокристаллического кремния (нк-Si) были получены методом электрохимического травления пластин монокристаллического кремния р-типа (удельное сопротивление 10–15 Ом×см). Травление проводили в течение

1 часа в электролите на основе плавиковой кислоты и этанола (1:1) при плотности тока 60 mA/cm^2 . В результате был сформирован слой пористого кремния, состоящий из нанокристаллов размером 2–5 нм [288]. После травления этот слой отделяли от подложки, высушивали и механически измельчали в соответствии с методиками, описанными ранее [289]. Конечным продуктом являлся порошок, содержащий как отдельные нанокристаллы, так и их агломераты (гранулы) размером до 1–5 мкм (рисунок 3.15). Срок хранения полученных порошков до их использования не превышал 30 суток.

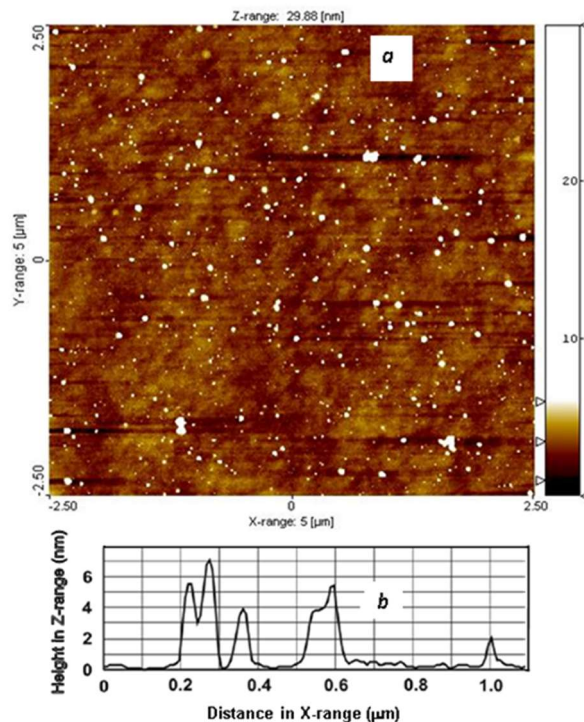


Рисунок 3.15 – Атомно-силовая микроскопия частиц нк-Si, осажденных из разбавленной суспензии на плоскую поверхность пластины монокристаллического кремния (а) и типичный профиль высоты образца, измеренный в вертикальном направлении (b) (диапазон Z)

Обработка животных. Эксперименты проведены на самцах мышей F₁ СВА×С57В1/6. Аликвоты порошка нк-Si тщательно растирались в агатовой ступке и полученные водные взвеси из расчета доз нк-Si 5, 25 и 50 мг/кг вводили внутривентриально. Выбор доз и сроков экспозиции определялся опытом, полученным при исследовании генотоксичности волокон хризотил-асбеста [290].

Мышам группы негативного контроля вводили эквивалентные объемы 5% раствора глюкозы. В качестве позитивного контроля использовали мышей, которым внутрибрюшинно вводили генотоксиканты циклофосфамид в дозе 20 мг/кг на срок 24 часа (тест на индукцию хромосомных aberrаций) или метилметансульфонат в дозе 40 мг/кг на срок 3 часа (метод ДНК-комет).

Результаты. Цитогенетический анализ клеток костного мозга мышей, обработанных нк-Si в дозах 5, 25 и 50 мг/кг, ни в одном варианте эксперимента не выявил увеличения уровней поврежденных метафаз. Спектр хромосомных aberrаций в контрольной и опытных группах представлен только ахроматическими пробелами (гепами) и хроматидными фрагментами. Повреждений более сложного типа не выявлено (таблица 3.19). нк-Si в дозе 50 мг/кг вызывали гибель 60–80 % животных на 2–3 день экспозиции, что сделало невозможной оценку генотоксического потенциала частиц в этой дозе при длительных сроках экспозиции. Патоморфологическое исследование показало, что предположительно гибель мышей связана с поражением почек.

Таблица 3.19 – Цитогенетические эффекты нанокристаллов кремния в клетках костного мозга мышей *in vivo*

Условия эксперимента	на 100 клеток					Метафаз с aberrациями (M±SE, %)
	гепов	хроматидных фрагментов	хромосомных фрагментов	обменов	метафаз с МП ^а	
Контроль	0,4	0,6	0	0	0	1,0±0,4
Циклофосфамид 20 мг/кг	0,6	4,8	0	9,8	1,8	13,8±1,6*
нк-Si						
5 мг/кг, 24 ч	0,4	0,8	0	0	0	1,2±0,5
50 мг/кг, 24 ч	0	0,8	0	0	0	0,8±0,4
5 мг/кг, 7 д	0,6	0,6	0	0	0	1,2±0,5
25 мг/кг, 7 д	0,2	1,2	0	0	0	1,0±0,4
5 мг/кг, 14 д	0,6	0,2	0	0	0	0,8±0,4
25 мг/кг, 14 д	0,2	1,2	0	0	0	1,4±0,5

Примечание – ^а – метафаз с множественными (≥ 5) повреждениями хромосом; * – $p < 0,001$ по сравнению с контролем (φ – критерий Фишера).

Анализ поврежденности ДНК методом ДНК-комет не выявил статистически значимых различий между контрольной и опытными группами в эксперименте с 3-часовой экспозицией нк-Si (таблица 3.20). В условиях 24-часовой экспозиции отмечено значимое увеличение поврежденности ДНК в клетках костного мозга животных, получавших нк-Si в дозе 5 мг/кг. При использовании нк-Si в дозе 50 мг/кг уровни повреждений ДНК значительно увеличились в клетках костного мозга, менее выражено в клетках головного мозга. Недельная экспозиция нк-Si в дозе 5 мг/кг не приводила к увеличению поврежденности ДНК.

Таблица 3.20 – Влияние нанокристаллов кремния на уровень повреждений ДНК в органах/тканях мышей *in vivo*

Условия эксперимента	% ДНК в хвосте	
	костный мозг	головной мозг
<u>3 часа экспозиции</u>		
Контроль	2,7±0,6	3,6±0,7
Метилметансульфонат 40 мг/кг	12,7±2,9*	8,8±1,7**
нк-Si 5 мг/кг	3,7±0,6	3,7±1,2
нк-Si 50 мг/кг	4,2±1,1	3,5±0,9
<u>24 часа экспозиции</u>		
Контроль	4,9±0,7	2,8±1,1
нк-Si 5 мг/кг	22,1±0,9*	3,5±0,8
нк-Si 50 мг/кг	24,2±1,3*	6,5±0,6**
<u>7 дней экспозиции[#]</u>		
Контроль	7,7±1,3	3,6±0,9
нк-Si 5 мг/кг	7,3±1,3	3,8±1,0

Примечание – * – $p < 0,001$ по сравнению с контролем; ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем (U-критерий Манна-Уитни).

Оценка генотоксичности катионных липосомальных наночастиц

Исследования проведены совместно с сотрудниками лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России под руководством к.б.н. Шиловского И.П.

Получение и характеристика катионных липосомальных наночастиц.

Катионные липосомальные наночастицы (кЛН) получали по стандартной методике гидратации липидной пленки [287]. Для этого катионный липопептид OrnGlu(C₁₆H₃₃)₂ растворяли в хлороформе и центрифугировали с последующим удалением растворителя под вакуумом. Образовавшуюся пленку высушивали в вакууме в течение 3 ч, после чего проводили ее гидратацию при комнатной температуре. Гидратированную пленку встряхивали и обрабатывали ультразвуком (3 раза по 15 минут) при 40°C. Физико-химические характеристики кЛН описаны в работе [291].

Обработка животных. Эксперименты проведены на самцах мышей F₁ СВА×С57В1/6. кЛН диспергировали в 5% растворе глюкозы и подвергали ультразвуковой обработке в течение 15 мин. Для получения гомогенной суспензии дисперсию кЛН перед использованием встряхивали на вортексе. кЛН в дозах 8, 20 и 40 мг/кг вводили однократно или 5-кратно (один раз в день) подкожно в область холки животных.

Мышам группы негативного контроля вводили эквивалентные объемы 5% раствора глюкозы. В качестве позитивного контроля использовали мышей, которым внутрибрюшинно вводили генотоксиканты этопозид в дозе 20 мг/кг на срок 24 часа (тест на индукцию хромосомных aberrаций) или метилметансульфонат в дозе 40 мг/кг на срок 3 часа (метод ДНК-комет).

Результаты. В ходе проведения экспериментов не было выявлено симптомов аномального поведения или существенных изменений массы тела у подопытных мышей.

В исследованных дозах и режимах введения кЛН не индуцировали хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей (таблица 3.21).

Экспозиция мышей кЛН во всех исследованных дозах в течение 3 часов не приводила к изменению показателя поврежденности ДНК в анализируемых тканях (рисунок 3.16). После введения кЛН в дозе 40 мг/кг увеличение поврежденности ДНК в 3,4 и 2,5 раза наблюдалось в клетках легких через 24 часа и на 3 день, соответственно (рисунок 3.16, А).

Таблица 3.21 – Цитогенетические эффекты катионных липосомальных наночастиц в клетках костного мозга мышей *in vivo*

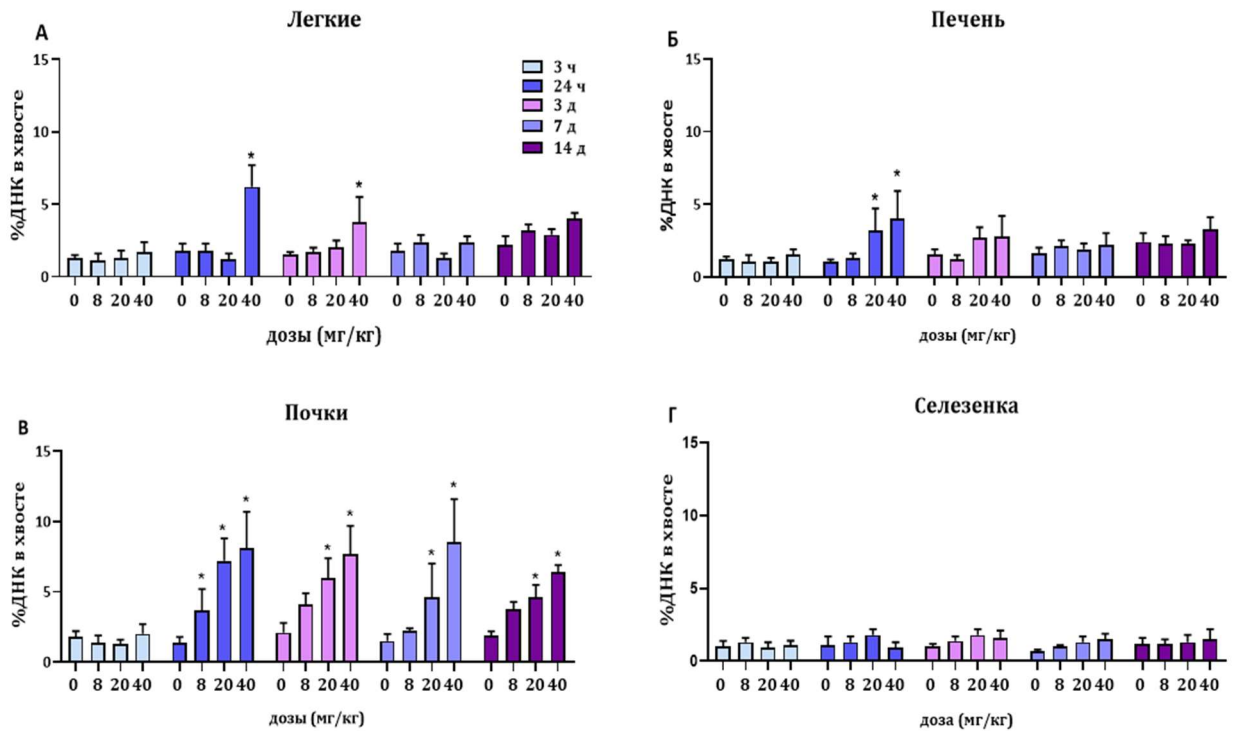
Условия эксперимента	на 100 клеток					Метафаз с абберациями (M±SE, %)
	гепов	хроматидных фрагментов	хромосомных фрагментов	обменов	метафаз с МП ^а	
Однократное введение						
Контроль	0,2	0,8	0	0	0	1,0±0,5
кЛН 8 мг/кг	0,2	0,8	0	0	0	1,0±0,4
кЛН 20 мг/кг	0	0,2	0	0	0	1,2±0,5
кЛН 40 мг/кг	0	1,0	0	0	0	1,0±0,4
Многократное введение						
Контроль	0	1,2	0	0	0	1,2±0,5
кЛН 8 мг/кг	0	0,8	0	0	0	0,8±0,4
кЛН 20 мг/кг	0,4	1,0	0	0	0	1,4±0,5
кЛН 40 мг/кг	0,2	0,8	0	0	0	1,0±0,4
Этопозид 20 мг/кг	0,4	6,8	0,4	2,8	11,0	19,0±1,8*

Примечание – кЛН – катионные липосомальные наночастицы; ^а – метафаз с множественными (≥5) повреждениями хромосом; * – p<0,001 по сравнению с контролем (φ – критерий Фишера).

Анализ повреждений ДНК в клетках печени (рисунок 3.16, Б) показал увеличение показателя %ДНК в хвосте через 24 ч после воздействия доз кЛН 20 и 40 мг/кг (в 3,2 и 4 раза соответственно). кЛН в дозах 20 и 40 мг/кг значимо (в 2,4–5,7 раза) увеличивали поврежденность ДНК в клетках почек через 24 часа и на 3, 7 и 14 сутки после введения (рисунок 3.16, В). Уровень повреждений ДНК также увеличился в 2,6 раза в клетках почек через 24 ч после воздействия кЛН в дозе 8 мг/кг. Ни на одном из сроков кЛН не индуцировали повреждений ДНК в клетках селезенки (рисунок 3.16, Г).

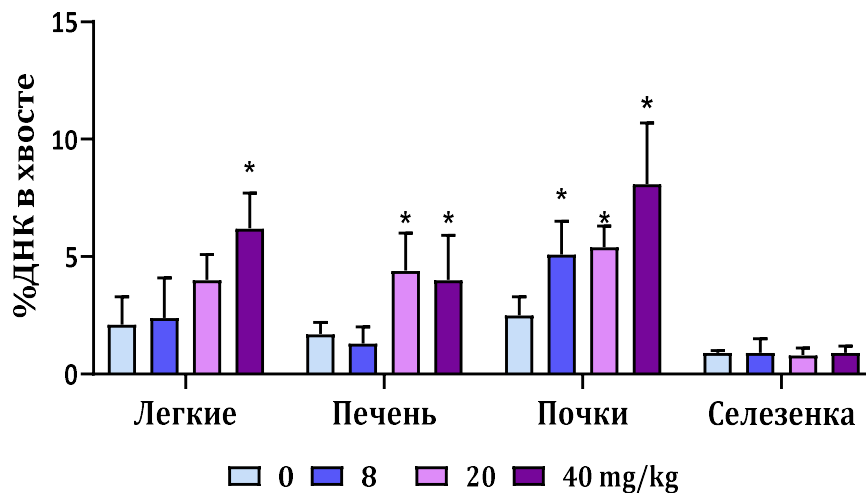
Введение кЛН в максимальной исследованной дозе 40 мг/кг в течение пяти дней привело к 3-кратному увеличению уровней повреждений ДНК в клетках легких (рисунок 3.17).

В клетках печени наблюдалось значительное увеличение показателя при введении кЛН в дозах 20 и 40 мг/кг (в 2,6 и 2,4 раза соответственно). В почках кЛН вызывали значительное увеличение повреждений ДНК (в 2,1–3,2 раза) во всех использованных дозах. Как и в экспериментах с однократным введением, кЛН не индуцировали повреждений ДНК в клетках селезенки.



Примечание –* – $p < 0,01$ по сравнению с контролем (критерий Даннета).

Рисунок 3.16 – Влияние однократного введения катионных липосомальных наночастиц на уровень повреждений ДНК в клетках легких (А), печени (Б), почек (В) и селезенки (Г) мышей

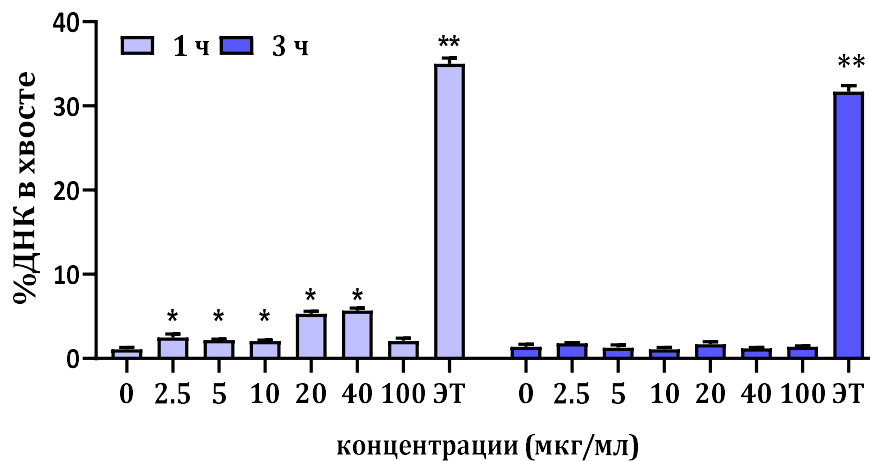


Примечание –* – $p < 0,01$ по сравнению с контролем (критерий Даннета).

Рисунок 3.17 – Влияние 5-кратного введения катионных липосомальных наночастиц на уровень повреждений ДНК в органах мышей

Дополнительно провели эксперименты *in vitro* на клетках периферической крови человека. Двойное окрашивание акридиновым

оранжевым/этидиум бромидом не выявило цитотоксичности в клетках крови, обработанных кЛН в диапазоне концентраций 2,5–100 мкг/мл (данные не представлены). Статистически значимое увеличение поврежденности ДНК (до 2,3 раз) клеток крови наблюдалось через 1 час после воздействия на них кЛН в концентрациях 2,5, 5 и 10 мкг/мл (рисунок 3.18). В концентрациях 20 и 40 мкг/мл кЛН более выражено, до 5,2 раз, увеличивали поврежденность ДНК. При этом не выявлено эффекта при наивысшей тестируемой концентрации 100 мкг/мл. Не выявлено статистически значимых эффектов в условиях 3-часовой экспозиции.



Примечание – ЭТ – этопозид; * – $p < 0,01$ и ** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем (критерий Краскела-Уоллиса).

Рисунок 3.18 – Влияние катионных липосомальных наночастиц на уровень повреждений ДНК в клетках периферической крови человека *in vitro*

Обсуждение результатов

В рамках настоящего исследования проведена оценка генотоксического потенциала кЛН и нк-Si с применением метода ДНК-комет *in vivo* и теста на хромосомные aberrации *in vivo*.

Установлено, что как однократное, так и повторное введение кЛН индуцирует повреждение ДНК в тканях печени, легких и почек у мышей. При этом в почках данный эффект сохраняется на протяжении до 14 суток после

однократного введения. Фармакокинетические исследования кЛН показали, что они способны накапливаться в тканях печени, почек и легких, но быстро выводятся из ткани селезенки [292]. Это, вероятно, объясняет отсутствие генотоксических эффектов кЛН в этой ткани.

Не зафиксировано достоверного повышения уровня хромосомных aberrаций ни после однократного, ни после повторного введения кЛН. В доклинических исследованиях лекарственного препарата на основе изученных кЛН не было выявлено увеличения поврежденности ДНК в клетках костного мозга (данные не представлены). При этом результаты независимых исследований свидетельствуют о том, что кЛН способны достигать костного мозга [293]. Совокупность этих данных показывает, что кЛН не оказывают генотоксического эффекта в костном мозге. Иная картина наблюдается при исследовании нк-Si. Они в условиях 24-часовой экспозиции проявляют выраженное повреждающее ДНК действие в клетках костного мозга, однако хромосомные aberrации не регистрируются ни на одном из сроков наблюдения. Несовпадение данных двух широко используемых тестов согласуется с общей неоднозначностью данных, получаемых при испытании генотоксичности наночастиц [294].

В качестве основного механизма генотоксического действия наночастиц сегодня рассматривается окислительное повреждение ДНК [295]. Наночастицы распознаются иммунной системой как чужеродный материал, что приводит к их поглощению тканевыми макрофагами. Особенности строения (размер, заряд, химический состав) наночастиц способствуют их персистенции внутри макрофага, его активации по «классическому» M1 пути и запуску хронических локальных воспалительных реакций с гиперпродукцией АФК или АФА [296]. Очевидно, что длительный период выведения кЛН почками и способствует персистенции их генотоксических эффектов. Для нк-Si была показана способность повреждать гематоэнцефалический барьер и индуцировать окислительный стресс и

воспаление в головном мозге [297]. В настоящем исследовании для нк-Si выявлен генотоксический эффект в головном мозге.

кЛН в экспериментах методом ДНК-комет *in vitro* на клетках HepG2 и A549 не показали генотоксического действия [298, 299]. В настоящих экспериментах кЛН индуцировали повреждения ДНК в клетках цельной крови человека. Присутствие в цельной крови ключевых иммунных клеток – нейтрофилов, моноцитов/макрофагов и НК-клеток очевидно позволяет воспроизвести иммунный ответ, индукцию окислительного стресса и повреждение ДНК на уровне достаточном для регистрации методом ДНК-комет. Таким образом метод ДНК-комет на клетках цельной периферической крови можно рассматривать как чувствительную тест-систему для оценки генотоксических эффектов, реализуемых посредством активации иммунных и воспалительных процессов. Ранее ее чувствительность для детекции радиационно- и химически индуцированной генотоксичности была отмечена другими авторами [300].

Заключение

Полученные данные свидетельствуют в пользу стратегии, предусматривающей оценку генотоксичности 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. Результаты экспериментов также обосновывают целесообразность исследования генотоксических свойств наноматериалов в экспериментах *in vitro* на цельной периферической крови.

3.5 Оценка эндогенно-индуцированной генотоксичности

Эндогенная генотоксичность выявлена при многих патологиях и патологических состояниях человека (раздел 1.4). Для ее оценки в клинических исследованиях проводят оценку различных генотоксических событий в доступных для получения не инвазивными или малоинвазивными методами клетках – клетках периферической крови, реже в клетках

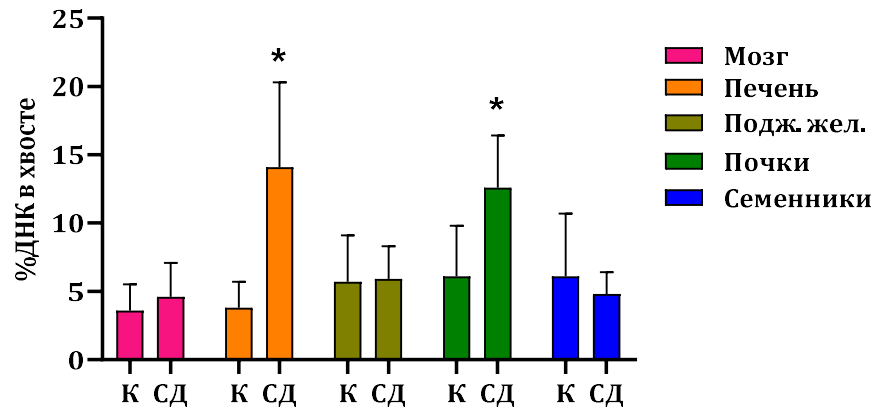
буккального и уротелиального эпителия. Хотя уровень биомаркеров генотоксичности в указанных клетках и является ценным индикатором системной генотоксической нагрузки на организм, он не отражает реальные уровни повреждений ДНК в различных органах/тканях. Очевидно, как и при экзогенном генотоксическом воздействии, эндогенная генотоксичность характеризуется органо- и тканеспецифичностью, в зависимости от патологии и патологического состояния. Сведения о последней важны для поиска и разработки эффективных антигенотоксикантов.

3.5.1 Поврежденность ДНК на моделях стрептозоцин-индуцированного диабета и ее антигенотоксическая коррекция

Эксперименты выполнены на самцах мышей BALB/c. Схемы обработки животных с однократным и многократным введением стрептозоцина описаны в разделе 2.9.

Однократное введение стрептозоцина в дозе 200 мг/кг индуцировало развитие диабета у экспериментальных мышей, о чем свидетельствовало увеличение уровней глюкозы до $21,9 \pm 5,8$ ммоль/л на 10 день, до $29,1 \pm 6,5$ на 21 день после введения стрептозоцина против $8,5 \pm 1,1$ ммоль/л у контрольных мышей. Пятикратное введение стрептозоцина в дозе 40 мг/кг также индуцировало развитие диабета у экспериментальных мышей, о чем свидетельствовало увеличение уровней глюкозы до $19,8 \pm 4,0$ ммоль/л на 14 день и до $16,8 \pm 5,5$ на 28 день после введения стрептозоцина, против $8,5 \pm 1,1$ ммоль/л у контрольных мышей.

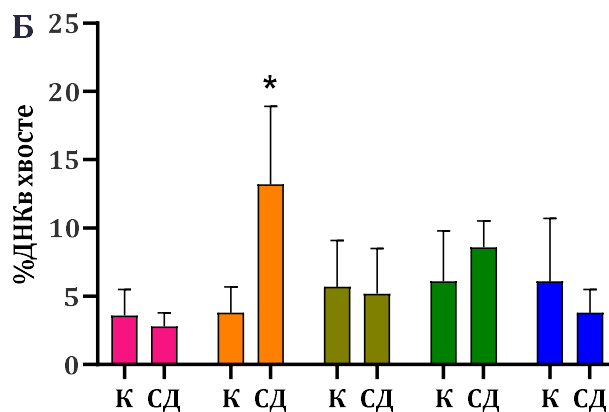
В модели с однократным введением стрептозоцина на 10 день статистически значимое увеличение поврежденности ДНК выявлено в клетках печени и почек (рисунок 3.19).



Примечание – К – группа контроль; СД – группа сахарный диабет; * – $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни).

Рисунок 3.19 – Уровень повреждений ДНК в органах мышей на 10 день после введения стрептозоцина в дозе 200 мг/кг

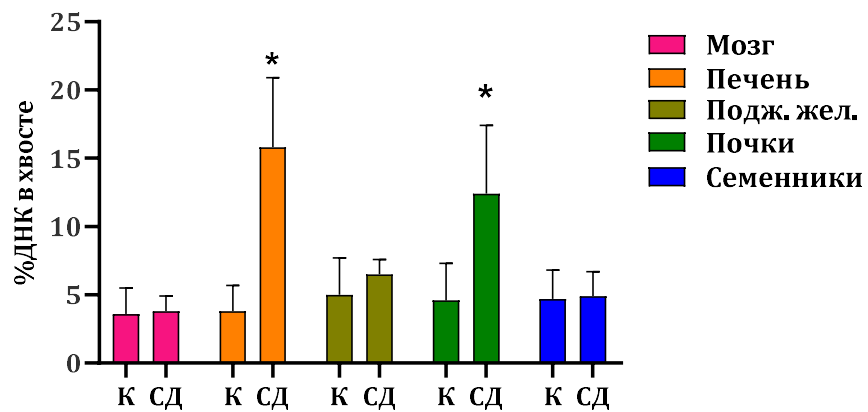
На 21 день после введения статистически значимое увеличение поврежденности ДНК выявлено только в клетках печени (рисунок 3.20).



Примечание – К – группа контроль; СД – группа сахарный диабет; * – $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни). Обозначение органов как на рисунке 3.19.

Рисунок 3.20 – Уровень повреждений ДНК в органах мышей на 21 день после введения стрептозоцина в дозе 200 мг/кг

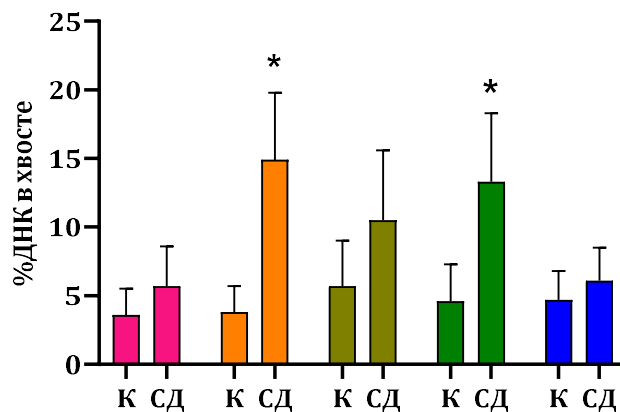
В модели с многократным введением стрептозоцина на 14 день статистически значимое увеличение поврежденности ДНК также выявлено в клетках печени и почек (рисунок 3.21).



Примечание – К – группа контроль; СД – группа сахарный диабет; * – $p < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни).

Рисунок 3.21 – Уровень повреждений ДНК в органах мышей на 14 день после введения стрептозоцина в дозе 40 мг/кг

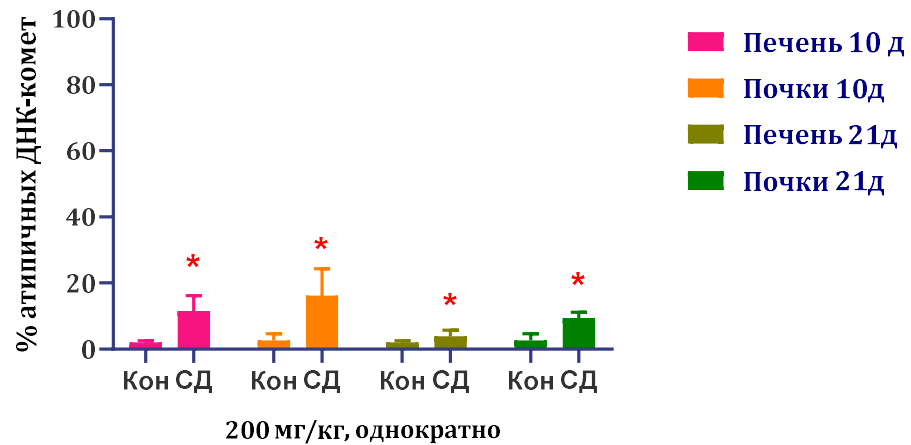
Аналогично на 28 день после введения статистически значимое увеличение поврежденности ДНК выявлено в клетках печени и почек (рисунок 3.22).



Примечание – К – группа контроль; СД – группа сахарный диабет; * – $p < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни). Обозначение органов как на рисунке 3.21.

Рисунок 3.22 – Уровень повреждений ДНК в органах мышей на 28 день после введения стрептозоцина в дозе 40 мг/кг

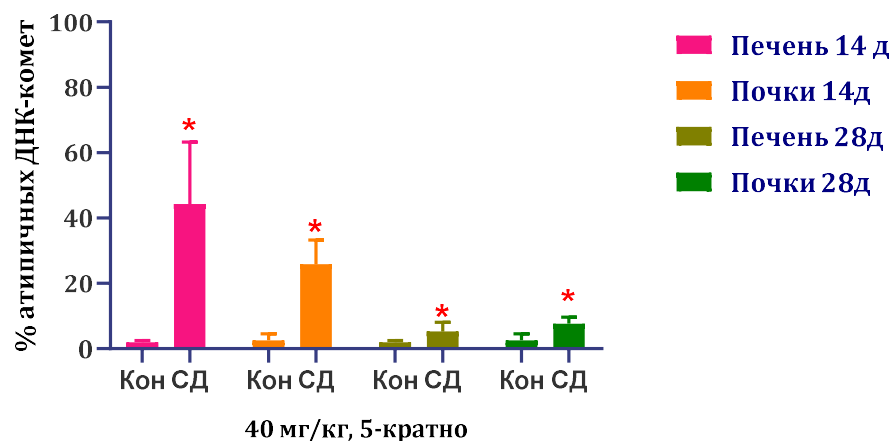
В модели с однократным введением стрептозоцина повышение уровней атипичных ДНК-комет выявлено в печени и почках на 10 и на 21 день (рисунок 3.23).



Примечание – Кон – группа контроль; СД – группа сахарный диабет; * – $p < 0,05$ (критерий χ^2).

Рисунок 3.23 – Уровень атипичных ДНК-комет в органах мышей при однократном введении стрептозоцина в дозе 200 мг/кг

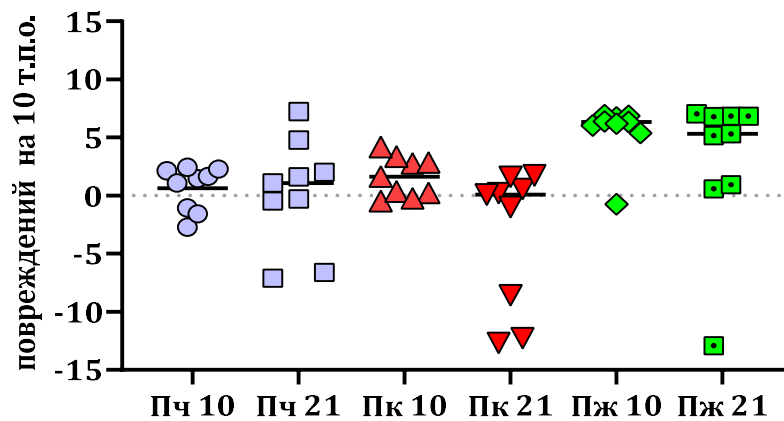
В модели с многократным введением стрептозоцина повышение уровней атипичных ДНК-комет в печени и почках также выявлено на обоих сроках наблюдения (рисунок 3.24). При этом на 14 день после введения их уровень оказался более высоким, в том числе по сравнению с показателями для однократного введения стрептозоцина.



Примечание – Кон – группа контроль; СД – группа сахарный диабет; * – $p < 0,05$ (критерий χ^2).

Рисунок 3.24 – Уровень атипичных ДНК-комет в органах мышей при многократном введении стрептозоцина в дозе 40 мг/кг

На рисунке 3.25 представлены данные по анализу поврежденности мтДНК в органах мышей в модели диабета, индуцированного однократным введением стрептозоцина в дозе 200 мг/кг. При обоих сроках наблюдения для печени и почек, в меньшей степени для поджелудочной железы, выявлены выраженные межиндивидуальные различия с получением отрицательных значений оцениваемого показателя.



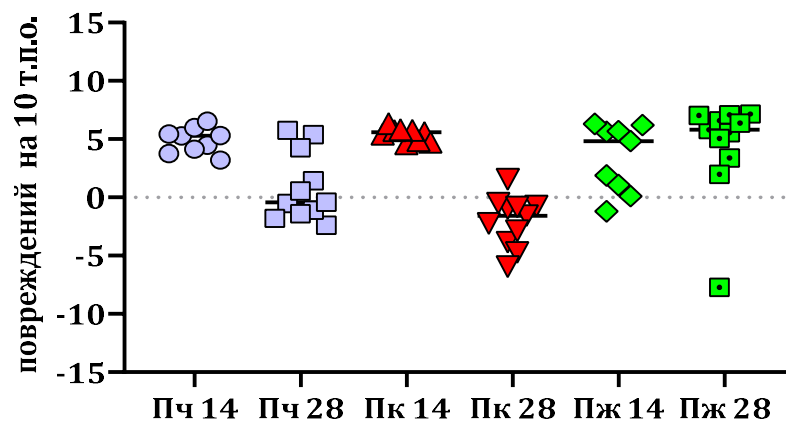
Примечание – Представлены индивидуальные значения для животных.

Рисунок 3.25 – Поврежденность мтДНК в клетках печени (Пч), почек (Пк) и поджелудочной железы (Пж) мышей на 10 и 21 день после однократного введения стрептозоцина в дозе 200 мг/кг

На модели диабета с многократным введением стрептозоцина повышенный уровень повреждений мтДНК выявлен в клетках печени и почек на 14 сутки, а для поджелудочной железы – на 28 сутки эксперимента (рисунок 3.26). Во всех остальных случаях, как и для модели с однократным введением, наблюдались выраженные межиндивидуальные различия с отрицательными значениями.

Таким образом установлено, что при обоих способах моделирования стрептозоцин-индуцированный диабет у мышей сопровождается увеличением поврежденности ДНК в клетках печени и почек, но не головного мозга, поджелудочной железы и семенников. Повышенный уровень атипичных ДНК-комет, являющихся свидетельством цитотоксических процессов, наблюдается

также только в печени и почках. Далее выполнены эксперименты с оценкой возможности коррекции повреждений ДНК на обеих моделях диабета с использованием охарактеризованных ранее соединений с антигенотоксической активностью.



Примечание – Представлены индивидуальные значения для животных.

Рисунок 3.26 – Поврежденность мтДНК в клетках печени (Пч), почек (Пк) и поджелудочной железы (Пж) мышей на 14 и 28 день после многократного введения стрептозоцина в дозе 40 мг/кг

Антигенотоксическая коррекция поврежденности ДНК при стрептозоцин-индуцированном диабете. Эксперименты выполнены на самцах мышей BALB/c. В качестве средства коррекции поврежденности ДНК использовали комбинацию соединений, для которых ранее была установлена антигенотоксическая активность в цитогенетическом тесте – аспартама и бетаина. В качестве препарата сравнения использовали метформин.

Опираясь на собственные наблюдения о том, что мышь с диабетом потребляет 5–7 мл воды в сутки, определили предположительно суточные дозы потребления аспартама в диапазоне 10–15 мг/кг и бетаина 50–75 мг/кг, что соотносится с рекомендованными дозами их потребления человеком. Исходя из этого, в экспериментах использовали приготовленную на питьевой воде смесь аспартама в концентрации 35 мг/л и бетаина в концентрации 175 мг/л.

В экспериментах на модели диабета с однократным введением стрептозоцина формировали четыре группы:

1) Негативный контроль (Кон): животным однократно внутрибрюшинно вводили 50 мМ цитратный буфер.

2) Группа «сахарный диабет» (СД). За 4 часа до введения стрептозоцина удаляли корм из клеток. После введения стрептозоцина в дозе 200 мг/кг заменяли питьевую воду на 10% раствор сахарозы и насыпали корм. На третьи сутки после введения 10% раствор сахарозы заменяли на обычную воду.

3) Группа «сахарный диабет + комбинация аспартам и бетаин» (СД+АБ). За 4 часа до введения стрептозоцина удаляли корм из клеток. После введения стрептозоцина в дозе 200 мг/кг заменяли питьевую воду на 10% раствор сахарозы и насыпали корм. На третьи сутки после введения 10% раствор сахарозы заменяли на комбинацию аспартама (35 мг/л) и бетаина (175 мг/л), приготовленную на питьевой воде.

4) Группа «сахарный диабет + метформин» (СД+М). За 4 часа до введения стрептозоцина удаляли корм из клеток. После введения стрептозоцина в дозе 200 мг/кг заменяли питьевую воду на 10% раствор сахарозы и насыпали корм. На третьи сутки после введения 10% раствор сахарозы заменяли на обычную воду. Начиная с этого момента ежедневно до эвтаназии животным перорально вводили метформин в дозе 250 мг/кг.

Для всех групп эвтаназию животных осуществляли на 10 день после введения стрептозоцина или цитратного буфера (негативный контроль).

В экспериментах на модели диабета с многократным введением стрептозоцина также формировали четыре группы:

1) Негативный контроль (Кон): животным 5-кратно, с интервалом 24 часа внутрибрюшинно вводили 50 мМ цитратный буфер.

2) Группа «сахарный диабет» (СД). За 4 часа до введения стрептозоцина удаляли корм из клеток. После введения стрептозоцина в дозе 40 мг/кг заменяли питьевую воду на 10% раствор сахарозы и насыпали корм.

Следующие 4 введения выполняли через каждые 24 часа, удаляя еду за 4 часа до введения. Через сутки после последнего введения 10% раствор сахарозы заменяли питьевой водой.

3) Группа «сахарный диабет + комбинация аспартам и бетаин» (СД+АБ). За 4 часа до введения стрептозоцина удаляли корм из клеток. После введения стрептозоцина в дозе 40 мг/кг заменяли питьевую воду на 10% раствор сахарозы и насыпали корм. Следующие 4 введения выполняли через каждые 24 часа, удаляя еду за 4 часа до введения. Через сутки после последнего введения 10% раствор сахарозы заменяли на комбинацию аспартама (35 мг/л) и бетаина (175 мг/л), приготовленную на питьевой воде.

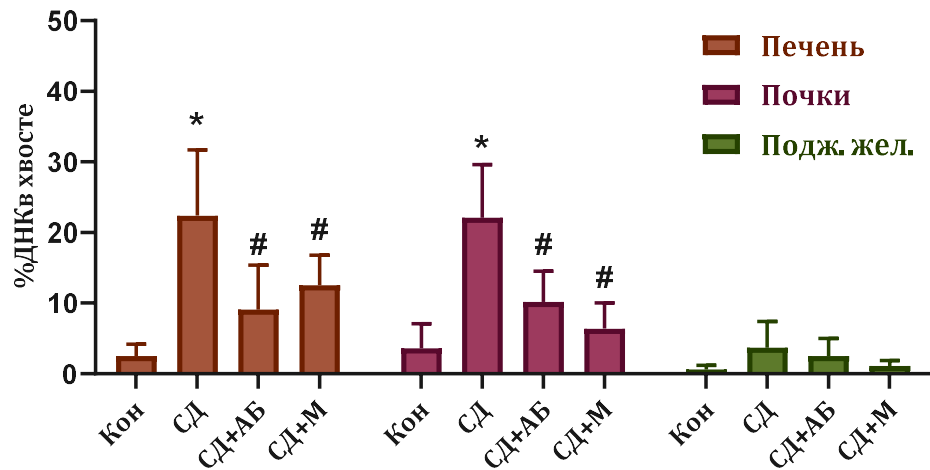
4) Группа «сахарный диабет + метформин» (СД+М). За 4 часа до введения стрептозоцина удаляли корм из клеток. После введения стрептозоцина в дозе 40 мг/кг заменяли питьевую воду на 10% раствор сахарозы и насыпали корм. Следующие 4 введения выполняли через каждые 24 часа, удаляя еду за 4 часа до введения. Через сутки после последнего введения 10% раствор сахарозы заменяли на питьевую воду. Начиная с этого момента ежедневно до эвтаназии животным перорально вводили метформин в дозе 250 мг/кг.

Для всех групп эвтаназию животных осуществляли на 14 день после последнего введения стрептозоцина или цитратного буфера (негативный контроль).

Сроки эвтаназии в обеих сериях экспериментов были выбраны исходя из данных предыдущих экспериментов, в которых определены максимальные наблюдаемые уровни поврежденности ДНК в органах мышей.

В модели с однократным введением стрептозоцина на 10 день статистически значимое увеличение поврежденности ДНК выявлено в клетках печени и почек (рисунок 3.27). В группе животных с СД, получавших комбинацию «аспартам+бетаин», выявлено снижение уровня повреждений ДНК на 58,0% в клетках печени и на 53,8% в клетках почек. В группе

животных, получавших метформин, также зарегистрировано снижение поврежденности ДНК в печени на 44,2% и почках на 71,0%.



Примечание –* – $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля; # – $p < 0,01$ по сравнению с группой СД (U-критерий Манна-Уитни).

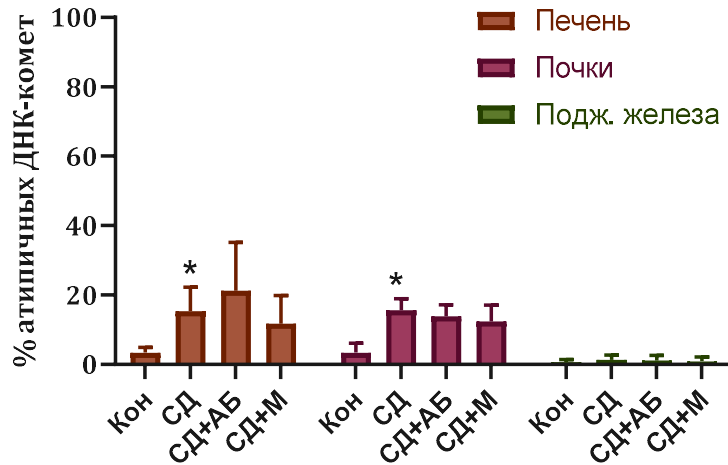
Рисунок 3.27 – Уровень поврежденности ДНК в органах мышей со стрептозоцин-индуцированным диабетом (СД; стрептозоцин 200 мг/кг, однократно) и мышей со стрептозоцин-индуцированным диабетом, получавших комбинацию аспартам+бетаин (СД+АБ) или метформин (СД+М)

Уровень глюкозы в крови у экспериментальных животных составил $38,9 \pm 2,0$ ммоль/л, практически не изменялся под влиянием используемой комбинации соединений ($36,2 \pm 2,7$ ммоль/л) и уменьшался под влиянием метформина до $27,60 \pm 3,11$ ммоль/л ($p < 0,01$).

В печени и почках выявлено повышение уровней атипичных ДНК-комет (рисунок 3.28). В группах животных с диабетом, получавших комбинацию «аспартам+бетаин» или метформин уровень атипичных ДНК-комет статистически значимо не отличался от показателя для группы СД.

В модели с многократным введением стрептозоцина (рисунок 3.29) на 14 день статистически значимое увеличение поврежденности ДНК выявлено в клетках печени и почек. В группе животных с СД, получавших комбинацию «аспартам+бетаин», выявлено снижение уровня повреждений ДНК на 52,2% в клетках печени и на 46,6% в клетках почек. В группе животных, получавших

метформин, снижение поврежденности ДНК составило 30,8% в клетках печени и 38,3% в клетках почек.

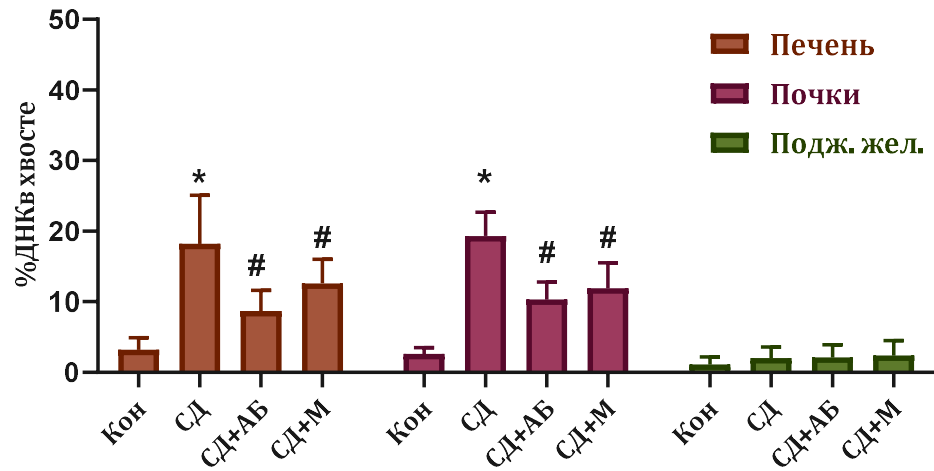


Примечание – * – $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля (критерий χ^2).

Рисунок 3.28 – Уровни атипичных ДНК-комет в органах мышей со стрептозоцин-индуцированным диабетом (СД; стрептозоцин 200 мг/кг, однократно) и мышей со стрептозоцин-индуцированным диабетом, получавших комбинацию аспартам+бетаин (СД+АБ) или метформин (СД+М)

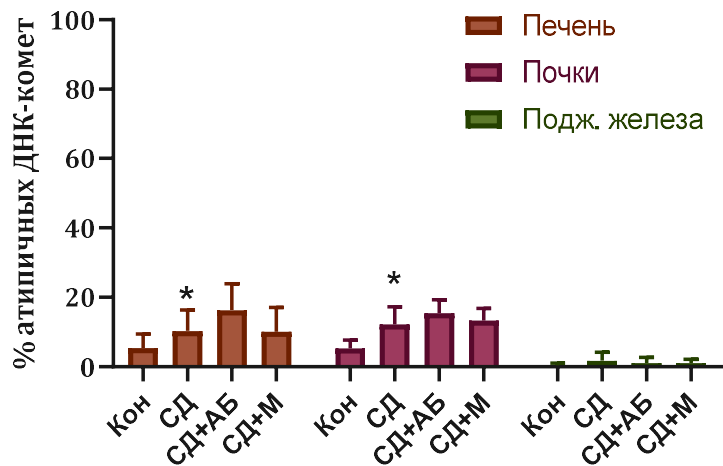
Уровень глюкозы в крови у экспериментальных животных составил $15,7 \pm 2,1$ ммоль/л, практически не изменялся под влиянием используемой комбинации соединений ($16,3 \pm 1,6$ ммоль/л) и имел тенденцию к снижению под действием метформина до $13,7 \pm 1,6$ ммоль/л ($p > 0,05$).

Аналогично результатам экспериментов с однократным введением стрептозоцина, на модели с многократным введением стрептозоцина обработка животных комбинацией аспартам+бетаин или метформином не оказывала влияния на уровень атипичных ДНК-комет (рисунок 3.30).



Примечание – * – $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля; # – $p < 0,01$ по сравнению с группой СД (U-критерий Манна-Уитни).

Рисунок 3.29 – Уровень поврежденности ДНК в органах мышей со стрептозоцин-индуцированным диабетом (СД; стрептозоцин 40 мг/кг, 5-однократно) и мышей со стрептозоцин-индуцированным диабетом, получавших комбинацию аспартам+бетаин (СД+АБ) или метформин (СД+М)



Примечание – * – $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля (критерий χ^2).

Рисунок 3.30 – Уровни атипичных ДНК-комет в органах мышей со стрептозоцин-индуцированным диабетом (СД; стрептозоцин 40 мг/кг, 5-кратно) и мышей со стрептозоцин-индуцированным диабетом, получавших комбинацию аспартам+бетаин (СД+АБ) или метформин (СД+М)

3.5.2 Эндогенная генотоксичность на модели алкогольной кардиомиопатии

Алкогольная кардиомиопатия (АКМП) – вторичная дилатационная кардиомиопатия, обусловленная токсическим воздействием этанола на миокард при его длительном злоупотреблении [301]. Разработка эффективной терапии АКМП остается сложной задачей, в значительной степени из-за отсутствия адекватных трансляционных моделей, которые позволили бы детально изучить патогенез заболевания и определить потенциальные фармакологические мишени для разработки средств терапии [251, 301]. Прогресс в этой области наметился с появлением новой трансляционной модели, достоверно воспроизводящей ключевые проявления АКМП у человека [251]. Эксперименты проведены совместно с сотрудниками лаборатории фармакологии кровообращения под руководством д.м.н. Крыжановского С.А. Получение трансляционной модели АКМП описано в разделе 2.10.

Уровень повреждений ДНК в клетках миокарда крыс с АКМП не отличался статистически значимо от показателя для интактных животных (таблица 3.21).

Таблица 3.21 – Поврежденность ДНК клеток миокарда у крыс с алкогольной кардиомиопатией

Экспериментальная группа	%ДНК в хвосте (M±m)	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 ($p_k<0,05$)**

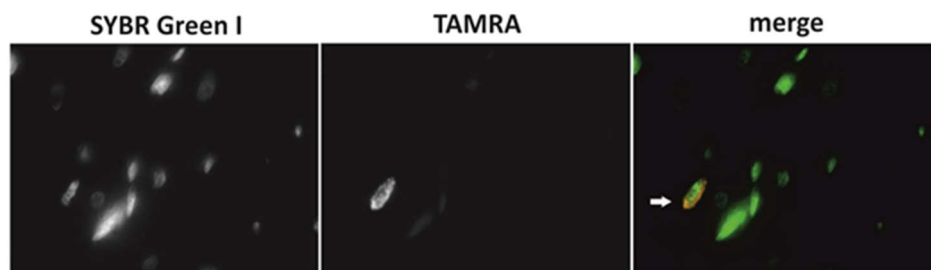
Примечание – * – по сравнению с контролем (критерий Манна-Уитни); ** – по сравнению с контролем (критерий χ^2); [#] – по сравнению с щелочным электрофорезом (критерий Манна-Уитни).

При этом выявлено статистически значимое снижение уровня атипичных ДНК-комет в группе крыс с АКМП по сравнению с животными

интактного контроля. Предполагая возможный вклад процессов клеточной гибели в наблюдаемые эффекты, были повторены эксперименты с оценкой повреждений ДНК в нейтральной версии метода ДНК-комет с параллельной оценкой апоптотической гибели клеток. Нейтральная версия метода позволяет оценить исключительно двунитевые разрывы в ДНК, характерные в том числе для фрагментации хроматина в ходе реализации апоптотической гибели.

Как и в условиях с щелочным электрофорезом, уровень поврежденности ДНК в миокарде крыс с АКМП статистически значимо не отличался от значения для интактного контроля. При этом у интактных крыс значение поврежденности ДНК оказалось более чем в 3 раза ниже по сравнению с аналогичным показателем, полученным для щелочной версии метода – $12,0 \pm 3,9$ против $36,9 \pm 5,3\%$. Для параллельно проанализированных клеток печени интактных крыс этот показатель составил $3,8 \pm 1,2$ % ДНК в хвосте, что лежит в пределах исторических контролей для этого органа и исключает вероятность методических артефактов при проведении метода ДНК-комет на клетках миокарда. Таким образом, в миокарде крыс наблюдается изначально высокий спонтанный уровень повреждений ДНК.

Анализ уровней апоптотической гибели методом TUNEL показал, что у интактных животных наблюдается незначительный уровень кардиомиоцитов, находящихся на стадии апоптоза (рисунок 3.31). Индекс апоптоза в миокарде у интактных животных составил в среднем 0,014, что согласуется с литературными данными. У крыс с АКМП индекс апоптоза составил 0,02, что не отличается от показателя интактного контроля.



Примечание – Стрелкой указан апоптотический кардиомиоцит.

Рисунок 3.31 – TUNEL-анализ миокарда крысы (ув. $\times 1000$)

3.5.3 Эндогенная генотоксичность на модели перинатальной иммунной активации

Инфекционные заболевания являются одним из распространенных источников эндогенной генотоксичности у человека (раздел 1.4). За счет индукции воспалительных процессов они способны вызывать системный генотоксический стресс в организме. Инфекционные заболевания у беременных помимо негативного влияния на организм матери могут приводить к перинатальной иммунной активации, которая ассоциирована с высоким риском развития впоследствии у потомства неврологических и психических нарушений, таких как расстройства аутистического спектра, синдром дефицита внимания и гиперактивности, задержки моторного и речевого развития [302, 303]. Очевидна роль в этом генотоксических поражений, однако на сегодня нет экспериментальных сведений, подтверждающих указанное предположение. С этой целью проведена оценка поврежденности ДНК в клетках плаценты, головы и туловища эмбрионов крыс на модели перинатальной иммунной активации, индуцированной введением липополисахарида (ЛПС). Являясь компонентом внешней мембраны грамотрицательных бактерий и лигандом для Toll-подобного рецептора TLR-4, он запускает врожденный иммунный ответ и последующее воспаление [304]. ЛПС-индуцированная модель перинатальной иммунной активации сегодня рассматривается как одна из наиболее релевантных.

Введение ЛПС однократно в дозе 0,25 мг/кг приводило к гибели эмбрионов на момент получения суспензий клеток (24 часа после введения). Двукратное введение в дозе 0,15 мг/кг с получением суспензий клеток через три часа после введения приводило к цитотоксическому эффекту в клетках плаценты и туловища эмбрионов, что заключалось в высоком уровне (>85%) атипичных ДНК-комет (данные не представлены).

Двукратное введение ЛПС в дозе 0,1 мг/кг с забоем через 3 часа после введения или однократное в дозе 0,2 мг/кг не приводило к индукции повреждений ДНК в анализируемых клетках (таблица 3.22).

Таблица 3.22 – Поврежденность ДНК в клетках плаценты и эмбрионов крыс с перинатальной иммунной активацией при различных дозах и режимах введения липополисахарида

Анализируемые ткани/группа		Контроль			ЛПС 0,1 мг/кг двукрат но	ЛПС 0,2 мг/кг 3 ч			ЛПС 0,2 мг/кг 6 ч		ЛПС 0,2 мг/кг 24 ч	
		%ДНК в хвосте										
Плацента	№2*	2,1	2,2	2,0	2,9	2,0	0,9	1,6	3,6	4,0	5,8	3,8
	№4	2,7	1,0	1,7	1,8	2,2	1,1	2,6	3,9	6,3	7,9	4,8
	№3	2,1	1,2	1,2	2,2	2,4	1,4	2,6	4,6	6,7	7,0	3,9
	№1	3,1	1,7	0,6	2,0	1,5	0,9	2,4	3,4	2,9	7,7	2,5
	<i>m</i>	2,5	1,5	1,4	2,2	2,0	1,1	2,3	3,9	5,0	7,1	3,8
	<i>m</i> ± SD (по группе)	1,8±0,6			2,2	1,8±0,6			4,5±0,8**		5,5±2,3**	
Голова эмбриона	№2	2,5	2,0	1,7	1,9	0,6	2,8	1,7	8,0	2,5	4,3	4,1
	№4	2,2	1,1	2,1	1,2	0,2	2,8	-	13,7	16,7	2,0	2,1
	№3	3,1	1,0	0,9	0,9	1,1	3,0	1,5	13,8	2,5	2,1	1,7
	№1	3,7	1,1	2,3	1,3	0,8	2,4	1,5	11,8	5,1	3,1	3,3
	<i>m</i>	2,9	1,3	1,8	1,3	0,7	2,8	1,6	11,8	6,7	2,9	2,8
	<i>m</i> ± SD (по группе)	2,0±0,8			1,3	1,7±1,0			9,3±3,6**		2,3±0,1	
Туловище эмбриона	№2	1,8	0,6	1,0	1,3	0,9	1,7	1,2	4,1	1,9	9,9	10,9
	№4	1,3	0,8	0,6	0,5	1,1	1,8	1,4	7,9	8,3	3,0	0,6
	№3	2,2	1,8	1,8	1,7	1,4	1,2	1,7	6,3	2,6	8,4	1,1
	№1	2,1	2,2	1,2	1,0	0,9	1,7	4,1	8,9	2,1	3,8	0,7
	<i>m</i>	1,9	1,4	1,2	1,1	1,1	1,6	2,1	6,8	3,7	6,3	3,3
	<i>m</i> ± SD (по группе)	1,5±0,4			1,1	1,8±0,3			5,3±2,2**		4,8±2,1**	

Примечание – * – положение эмбриона в роге матки (рисунок 2.2); ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем (U-критерий Манна-Уитни).

Выраженный генотоксический эффект в клетках плаценты и эмбрионов выявлен через 6 часов после однократного введения ЛПС в дозе 0,2 мг/кг. При этом эффект был наиболее выражен в клетках головы эмбриона. Через 24 часа после однократного введения ЛПС в дозе 0,2 мг/кг увеличение поврежденности ДНК выявлено в клетках плаценты и туловища эмбрионов, но не в голове. Таким образом, наибольший генотоксический эффект при моделировании перинатальной иммунной активации выявляется при однократном введении ЛПС в дозе 0,2 мг/кг на срок 6 часов. Дальнейшие исследования на большей выборке животных (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 (данные в полном объеме представлены в публикации). Не установлено зависимости в поврежденности ДНК от положения эмбрионов в роге матки.

Образцы, полученные от крыс, обработанных ЛПС в дозе 0,2 мг/кг на срок 6 часов также проанализированы на поврежденность митохондриальной ДНК (рисунок 3.32).

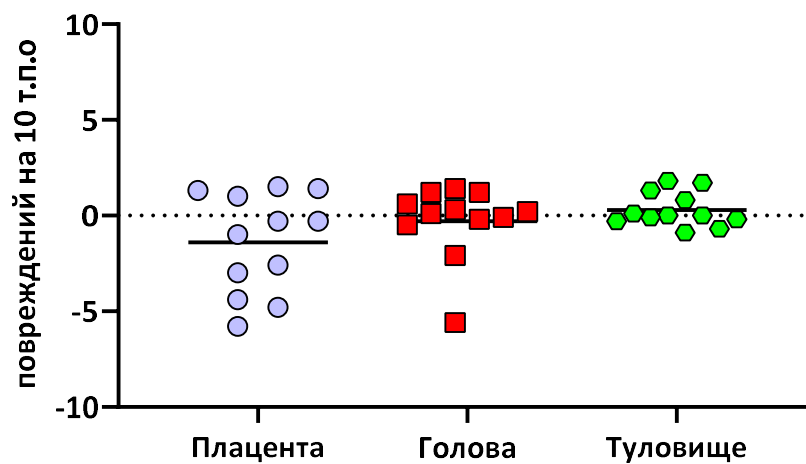


Рисунок 3.32 – Поврежденность мтДНК в клетках плаценты и эмбрионов крыс с перинатальной иммунной активацией

Как и в случае со стрептозоцин-индуцированным диабетом, получены как положительные, так и отрицательные значения оцениваемого показателя, с выраженными межиндивидуальными различиями. Для тканей плаценты и туловища получены преимущественно отрицательные значения, для эмбриона – положительные. Выявлена положительная корреляция между показателем поврежденности ядерной ДНК (%ДНК в хвосте) и поврежденностью мтДНК в клетках туловища эмбриона ($r=0,65$; $p=0,023$).

Обсуждение результатов

Полученные в результате проведенных экспериментов данные свидетельствуют о том, что сахарный диабет, индуцируемый у мышей BALB/c

однократным введением стрептозоцина в дозе 200 мг/кг или 5-кратным введением стрептозоцина в дозе 40 мг/кг, сопровождается увеличением уровней поврежденности ДНК и атипичных ДНК-комет в печени и почках. Полученные данные согласуются с результатами другого совместного исследования, в котором было показано увеличение выхода повреждений ДНК и уровня атипичных комет в печени и почках на 7, 14 и 21 день после однократного введения мышам BALB/c стрептозоцина в дозе 130 мг/кг [305]. В этом же исследовании на фоне незначительного возрастания (до 9,32 ммоль/мл) концентрации глюкозы, что рассматривается как состояние преддиабета, повреждения ДНК зарегистрированы в клетках поджелудочной железы. Отсутствие подобного эффекта в настоящих экспериментах предположительно объясняется разрешением процесса поражения поджелудочной железы к моменту выполнения наблюдений.

Сложно трактуемые результаты получены при оценке поврежденности мтДНК. В основе оценки поврежденности мтДНК методом ПЦР лежит принцип, основанный на том, что повреждения в молекуле ДНК будут препятствовать работе ДНК-полимеразы и замедлять накопление продуктов ПЦР, которое будет обратно пропорционально количеству молекул мтДНК с повреждениями [247, 306]. На модели диабета с однократным введением стрептозоцина при обоих сроках наблюдения для печени и почек, в меньшей степени для поджелудочной железы, выявлены выраженные межиндивидуальные различия с получением отрицательных значений (рисунок 3.25). При многократном введении стрептозоцина повышенный уровень повреждений мтДНК выявлен на 14 сутки в печени и почках, на 28 сутки – для поджелудочной железы (рисунок 3.26). В остальных же случаях также наблюдались межиндивидуальные различия с отрицательными значениями. Сходная картина наблюдалась и на модели перинатальной иммунной активации (рисунок 3.32).

Отрицательные значения при оценке поврежденности мтДНК, определяемой методом количественной ПЦР, были показаны в независимых

исследованиях [247, 306]. Предположительно это может быть связано с особенностями топологии мтДНК. Молекула мтДНК может существовать в различных топологических состояниях: суперспирализованном, релаксированном кольцевом или линейном. Эффективность ПЦР зависит от этого состояния: суперспирализованная форма является сложной матрицей для амплификации, в то время как релаксированные и линейные формы амплифицируются значительно легче. Масштабное повреждение мтДНК вследствие окислительного стресса и/или ее деградация в ходе клеточной гибели могут приводить к релаксации молекулы с образованием линейных фрагментов. Это, в свою очередь, повышает эффективность ПЦР, что проявляется в более низких значениях ΔC_t для поврежденной мтДНК по сравнению с интактной и расчетным отрицательным значениям. Таким образом можно предполагать, что положительные значения свидетельствуют о поврежденности мтДНК, тогда как отрицательные – преимущественно о масштабном окислительном повреждении или деградации мтДНК. Полученные данные определяют перспективность дальнейших исследований по разработке методических приемов оценки поврежденности как мтДНК на основе метода ПЦР в режиме реального времени.

Из проанализированных органов/тканей поврежденность ДНК и цитотоксические эффекты установлены для клеток печени и почек экспериментальных животных, что согласуется с клинической картиной развивающихся при диабете осложнений. Диабет сопровождается развитием таких патологий печени, как гликогеновая гепатопатия, диабетический гепатосклероз и неалкогольная жировая болезнь [307]. Диабетическая нефропатия является специфическим осложнением сахарного диабета и ведущей причиной развития хронической почечной недостаточности, риск которой возрастает в 25 раз [308]. На использованной экспериментальной модели следует ожидать генотоксических повреждений в клетках сетчатки глаза и магистральных и периферических сосудов, являющихся также главными мишенями патогенетических нарушений при диабете. Это может

быть подтверждено методом ДНК-комет при соответствующей его адаптации к указанным тканям.

У животных с диабетом, индуцированным как однократным, так и многократным введением стрептозоцина, свободное потребление питьевого водного раствора, содержащего охарактеризованные ранее антигенотоксиканты аспартам (35 мг/л) и бетаин (175 мг/л), приводит к снижению поврежденности ДНК в клетках печени и почек. Аналогичная картина наблюдается при использовании гипогликемического препарата метформина в дозе 250 мг/кг. Ни в одном случае не зарегистрировано снижения уровней атипичных ДНК-комет. Их биологическая значимость до сих пор не определена [309]. Предположительно, их появление связано с фрагментацией ДНК в ходе того или иного типа клеточной гибели. В свете текущих представлений о клеточной гибели как возможном механизме антимуtagenной защиты [310], ее снижение выглядит нежелательным, усиливающим вероятность возникновения мутантных клеток. В этой связи наблюдаемое снижение поврежденности ДНК на фоне отсутствия влияния на показатель атипичных ДНК-комет следует рассматривать как положительный или в крайнем случае как индифферентный результат.

Высокий уровень атипичных ДНК-комет выявлен в клетках миокарда у интактных крыс. Исследования методом TUNEL показывают, что индекс апоптоза кардиомиоцитов составляет 0,014 (1,4% апоптотических клеток), тогда как в ~8% наблюдается высокая степень фрагментации ДНК. Это позволяет заключить, что выявляемые атипичные ДНК-кометы не могут рассматриваться как апоптотические и клеточная гибель кардиомиоцитов реализуется отличным от апоптоза путем. По современным представлениям ключевую роль в поддержании тканевого гомеостаза в миокарде играет процесс аутофагии, нарушение которой установлено при гипертензии, ишемии-реперфузии, инфаркте миокарда и при АКМП [311]. Снижение выраженности экспериментальной АКМП у крыс показано на фоне приема индуктора аутофагии рапамицина [312]. Повышенный индекс

аутофагии в миокарде пациентов с дилатированной кардиомиопатией ассоциировалась с лучшим прогнозом [313]. Вышеописанное позволяет предполагать, что атипичные ДНК-кометы, наблюдаемые на препаратах миокарда крыс, могут формировать клетки с деградированным в результате аутофагии хроматином. В пользу этого свидетельствуют полученные данные о значительном, почти 3-кратном снижении атипичных ДНК-комет при АКМП, для которой характерно ингибирование аутофагии в ткани миокарда [314]. В диссертационном исследовании Мирошкиной И.А. было показано, что применение кардиопротекторов фабомотизола и триметазида приводит к увеличению содержания атипичных ДНК-комет в миокарде крыс с АКМП до значений интактного контроля [315]. Таким образом совокупность полученных данных позволяет рассматривать атипичные ДНК на препаратах ДНК-комет миокарда как важный индикатор процессов регуляции и поддержания тканевого гомеостаза, предположительно связанный с аутофагией.

У интактных крыс при анализе методом ДНК-комет в щелочной версии выявлен также и высокий уровень поврежденности ДНК клеток миокарда, показатель которого почти в 10 раз превышает значение для клеток печени. Сопоставление с данными, полученными при проведении ДНК-комет в нейтральной версии, свидетельствует о том, что наблюдаемая поврежденность ДНК связана с высоким уровнем однонитевых разрывов ДНК и/или щелочно-лабильных сайтов. Примечательно, что полученные значения %ДНК в хвосте кардиомиоцитов ($36,9 \pm 5,3$), сопоставимы с показателями, полученными для сперматозоидов интактных животных (34,5–36,2; раздел 3.2). Является ли наблюдаемый факт, как в случае со сперматозоидами, следствием высокого уровня щелочно-лабильных сайтов и имеют ли кардиомиоциты аналогично высокую степень компактизации хроматина, является предметом дальнейшего изучения.

Критическим периодом эмбрионального развития нервной системы, на который могут влиять неблагоприятные факторы окружающей среды,

является нейрогенез. Иммунная активация у матери приводит к нарушениям пролиферации нейроэндокринных клеток, их дифференцировки в нейроны и миграции нейронов с формированием отдельных областей, способствуя таким образом развитию нарушений у потомства [316]. В качестве ведущего механизма нарушения нейрогенеза при этом рассматривается индуцируемый вследствие воспалительных процессов окислительный стресс [317]. Как было показано, индуцированная липополисахаридом иммунная активация запускает воспалительный ответ, окислительный стресс, а также приводит к нарушению проницаемости гематоэнцефалического и гематоплацентарного барьеров у крыс [318]. Рассматривая окислительный стресс как ведущий механизм эндогенной генотоксичности логично ожидать, что перинатальная иммунная активация сопровождается и повреждением ДНК плодов. В настоящих экспериментах показано, что перинатальная иммунная активация, индуцированная введением липополисахарида, сопровождается увеличением поврежденности ДНК в клетках плаценты, головы и туловища эмбрионов. При этом генотоксический эффект наиболее выражен в голове эмбрионов. В недавних клинических исследованиях показано, что высокие уровни маркеров окислительного повреждения ДНК, РНК и липидов в крови матерей ассоциируются со снижением умственного развития у детей [319]. Таким образом, полученные результаты в совокупности с литературными данными свидетельствуют о патогенетической роли повреждений ДНК в развитии неврологических нарушений, выявляемых у потомства в результате перинатальной иммунной активации.

Заключение

Выявленные эндогенные генотоксические эффекты при стрептозоцин-индуцированном диабете и перинатальной иммунной активации расширяют текущие представления о генотоксическом статусе указанных моделей. Полученные данные не только обосновывают целесообразность углубленных исследований в этой области, но и формируют экспериментальную базу для

целенаправленного поиска средств фармакологической и/или нутрициологической коррекции генотоксических эффектов при исследованных патологиях и патологических состояниях.

Полученные на модели АКМП результаты определяют перспективность дальнейших исследований, направленных на изучение роли и механизмов аутофагии в функционировании миокарда с целью определения фармакологических мишеней и разработки средств терапии АКМП и других сердечно-сосудистых патологий.

3.6 Исследование органо- и тканеспецифичности антигенотоксических эффектов ряда соединений природного происхождения

Анализ накопленного экспериментального материала в области антимуtagenеза показывает, что подавляющее большинство *in vivo* исследований проведены методом цитогенетического анализа – методом учета микроядер или хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей (раздел 1.7). В то же время недостаточность сведений о тканеспецифичности действия антигенотоксикантов является существенным препятствием к их практическому внедрению для защиты генома человека. В последнее десятилетие наблюдается активный рост применения в исследованиях антигенотоксичности метода ДНК-комет, который стал необходимым «инструментом» для решения указанной проблемы. Однако на сегодня лишь в малой части исследований проанализированы защитные эффекты в широком наборе органов/тканей, большинство исследований ограничиваются печенью или клетками периферической крови, значительно реже желудком или костным мозгом.

Очевидно, что фармакокинетические особенности тестируемых соединений будут обуславливать органо- и тканеспецифичность антигенотоксических эффектов. Кроме того, возможны варианты, когда, проявляя протекторную активность в одних органах, соединение может

демонстрировать комутагенную активность в других, усиливая эффект генотоксиканта. Такая дозозависимая инверсия эффектов характерна, в частности, для антигенотоксикантов полифенольной природы [3].

Исторически поиск и разработка антигенотоксикантов ведется с целью защиты генома на уровне всего организма, что объясняется политаргетностью действия большинства генотоксикантов. В то же время существуют ситуации, требующие направленной (таргетной) антигенотоксической защиты определенных органов/тканей организма. Наиболее востребован такой подход при проведении противоопухолевой терапии цитостатиками, сопряженной неизбежно с гено- и цитотоксической нагрузкой на нецелевые органы/ткани организма. Разработка таргетных антигенотоксикантов возможна как путем подбора соединений с заданными фармакокинетическими характеристиками среди ранее выявленных и изученных антигенотоксикантов, так и путем направленного синтеза.

Таким образом, оценка органо- и тканеспецифичности действия при разработке антигенотоксикантов позволит не только всесторонне охарактеризовать их эффективность и безопасность, но и определит наиболее перспективные «адреса» их применения.

3.6.1 Изучение антигенотоксичности бетаина

Бетаин (триметилглицин) – природное органическое соединение, играющее важную роль в биологических процессах в животных и растительных клетках. Бетаин обладает двойной биологической активностью: он является донором метильных групп в процессе трансметилирования, катализируемого бетаин-гомоцистеин-метилтрансферазой, а также выступает как осмопротектор, защищая клетки от стресса и стабилизируя их водно-солевой баланс [320]. Для бетаина продемонстрированы антиоксидантная, противовоспалительная, гепато-, кардио- и нефропротекторная активности [321–324]. Выявление у соединения антимутагенной активности в тесте Эймса [325] позволило ожидать протекторной активности и в эукариотических

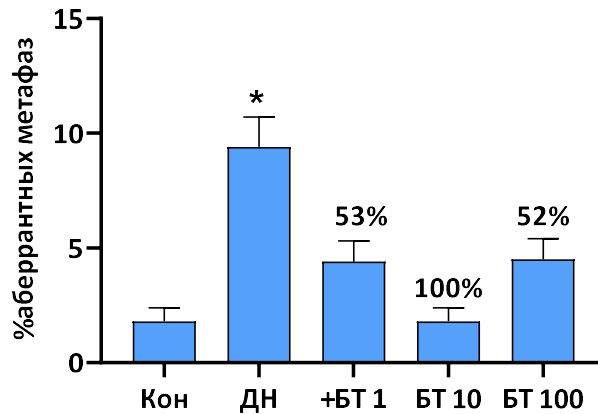
клетках, оценка которой в экспериментах *in vivo* явилась задачей исследования.

Обработка животных. Эксперименты проведены на самцах мышей F₁ СВА×С57В1/6. В цитогенетическом тесте бетаин в виде водного раствора вводили мышам перорально в дозах 1, 10 и 100 мг/кг в течение пяти дней, последнее введение сочеталось с внутрибрюшинной инъекцией генотоксиканта – диоксидина в дозе 200 мг/кг или циклофосфамида в дозе 20 мг/кг. Цитогенетические препараты костного мозга получали через 24 часа. В экспериментах методом ДНК-комет бетаин также вводили в течение пяти дней, с инъекцией генотоксиканта диоксидина в дозе 200 мг/кг или метилметансульфоната в дозе 30 мг/кг совместно с последним введением соединения. Микропрепараты ДНК-комет костного мозга, печени, почек и селезенки получали через 1 или 3 часа после совместного введения бетаина, соответственно, с диоксидином или метилметансульфонатом. Метилметансульфонат использовали вместо циклофосфамида поскольку последний, помимо алкилирования оснований ДНК, вызывает меж- и внутринитевые сшивки в ДНК, что затрудняет выявление его эффектов стандартной процедурой метода ДНК-комет [326].

Результаты исследования. Бетаин проявил антигенотоксическую активность по отношению к цитогенетическим эффектам диоксидина, на 53, 100 и 52% снижая их, соответственно, в дозах 1, 10 и 100 мг/кг (рисунок 3.33).

Сходные результаты получены в эксперименте с использованием в качестве модельного генотоксиканта циклофосфамида, за исключением дозы 10 мг/кг, в которой протекторный эффект оказался менее выраженным (рисунок 3.34).

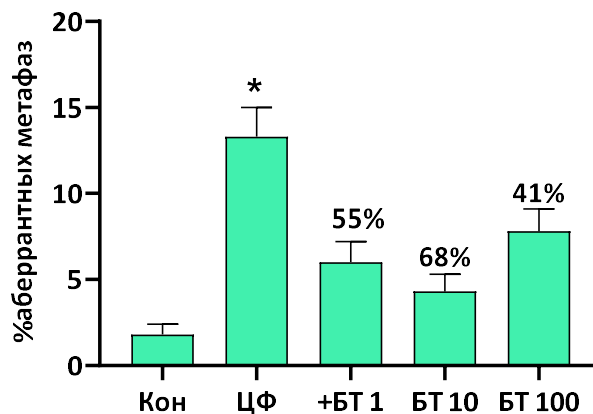
Тканеспецифичность антигенотоксической активности бетаина далее исследована методом ДНК-комет. Для этого бетаин использован в дозах 1 и 10 мг/кг, в которых зарегистрирован наибольший его протекторный эффект.



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

Рисунок 3.33 – Влияние бетаина (БТ) в дозах 1, 10 и 100 мг/кг на цитогенетические эффекты диоксидина (ДН) в дозе 200 мг/кг в клетках костного мозга мышей *in vivo*

При использовании в качестве модельного генотоксиканта диоксидина, бетаин в костном мозге и печени проявил максимальный антигенотоксический эффект в дозе 1 мг/кг (63% и 74% снижение эффекта соответственно), тогда как в почках для обеих доз защитный эффект оказался сходным (таблица 3.23). Не выявлено протекторной активности бетаина в селезенке.



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

Рисунок 3.34 – Влияние бетаина (БТ) в дозах 1, 10 и 100 мг/кг на цитогенетические эффекты циклофосамида (ЦФ) в дозе 20 мг/кг в клетках костного мозга мышей *in vivo*

В экспериментах с метилметансульфонатом бетаин продемонстрировал антигенотоксическую активность только в клетках костного мозга, на 35–50% снижая эффекты генотоксиканта.

Таблица 3.23 – Влияние бетаина на повреждающую ДНК активность диоксидина и метилметансульфоната в органах/тканях мышей *in vivo*

Группа	%ДНК в хвосте			
	костный мозг	печень	почки	селезенка
Контроль	2,1±0,3	2,0±0,9	3,4±0,6	1,0±0,3
Диоксидин 200 мг/кг	12,0±2,2 [#]	16,8±2,4 [#]	28,0±2,2 [#]	5,6±1,4 [#]
+ бетаин 1 мг/кг	4,4±0,8* (63%)^{&}	4,4±1,4* (74%)	13,0±2,2* (54%)	4,0±1,2
+ бетаин 10 мг/кг	8,0±1,8** (33%)	9,8±2,0** (42%)	10,6±2,0* (62%)	5,8±1,6
Контроль	2,4±0,8	1,9±0,4	3,3±0,7	1,1±0,2
Метилметансульфонат 30 мг/кг	10,2±1,4 [#]	10,4±1,4 [#]	11,6±1,4 [#]	5,1±1,0 [#]
+ бетаин 1 мг/кг	6,6±1,1** (35%)	11,8±1,4	14,1±1,6	5,2±1,0
+ бетаин 10 мг/кг	5,1±1,0** (50%)	11,0±1,4	9,7±1,3	7,2±1,2

Примечание – [#] – p<0,001 по сравнению с контролем; * – p<0,001 и ** – p<0,01 по сравнению с эффектом генотоксиканта (U-критерий Манна-Уитни); [&] – снижение эффекта генотоксиканта.

3.6.2 Изучение антигенотоксичности бетанина

Активно пролиферирующие клетки органов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), наряду с клетками костного мозга, наиболее подвержены побочному действию большинства цитостатических препаратов. В связи с этим, в рамках предлагаемого выше подхода таргетной защиты, актуальным представляется поиск и разработка антигенотоксикантов на основе соединений, которые не всасываются в ЖКТ и, таким образом, с одной стороны обеспечивают в ЖКТ локальный протекторный эффект, с другой стороны – не оказывают влияния на противоопухолевую терапию.

Одним из таких перспективных для разработки соединений является природный гликозид бетанин, натуральный пигмент, относящийся к подгруппе бетацианинов класса беталаинов. Именно он придает характерную

темно-красную, фиолетовую или бордовую окраску красной свекле (*Beta vulgaris*), которая является основным природным источником этого пигмента. Беталаины сегодня привлекают особое внимание исследователей благодаря выявлению различных видов биологической активности, включающей антиоксидантную, противовоспалительную, антидиабетическую, гепато- и кардиопротекторную [327]. Для экстракта свеклы, основным компонентом которой являются беталаины, показана антигенотоксическая активность *in vivo* [328]. В ряде работ для экстрактов свеклы и беталаинов продемонстрирована антиканцерогенная активность [329, 330]. Задачей исследования явилась оценка антигенотоксической активности бетанина в органах/тканях мышей *in vivo* по отношению к повреждающему действию генотоксикантов с различными механизмами действия. Исследование проведено совместно с м.н.с. лаборатории генетической и репродуктивной токсикологии Лисицыным А.А.

Обработка животных. Эксперименты проведены на самцах мышей F₁ СВА×С57В1/6. В исследовании использовали выделенный из экстракта красной свеклы и иммобилизованный на целлюлозе бетанин.

В первой серии экспериментов оценивали собственную генотоксическую активность бетанина. Исследования в тесте на индукцию хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей проводили в соответствии с требованиями руководства OECD TG475. Бетанин в виде водного раствора вводили мышам перорально однократно в дозах 250, 500 и 2000 мг/кг на срок 18 часов и однократно перорально в дозе 2000 мг/кг на срок 24 часа, с получением цитогенетических препаратов через 24 часа после введения.

Исследования на индукцию повреждений ДНК в органах/тканях мышей проводили методом ДНК-комет в соответствии с требованиями руководства OECD TG489. Бетанин в виде водного раствора вводили мышам перорально в дозах 250, 500 и 2000 мг/кг трехкратно, интервалами в 24 часа.

Микропрепараты ДНК-комет клеток крови, печени, почек, желудка, 12-перстной и прямой кишки получали через 3 часа после последнего введения.

В экспериментах по оценке антигенотоксической активности в цитогенетическом тесте бетанин вводили в дозах 25, 50 и 100 мг/кг перорально однократно, одновременно с внутрив брюшинным введением диоксидина в дозе 250 мг/кг или метилметансульфоната в дозе 80 мг/кг, с получением цитогенетических препаратов через 24 часа после введения.

В экспериментах по оценке антигенотоксической активности методом ДНК-комет бетанин вводили в дозах 25, 50 и 100 мг/кг перорально однократно, одновременно с внутрив брюшинным введением диоксидина в дозе 250 мг/кг или метилметансульфоната в дозе 80 мг/кг. Микропрепараты ДНК-комет клеток крови, печени, почек, желудка, 12-перстной и прямой кишки получали через 1,5 или 3 часа после введения, соответственно, в эксперименте с диоксидином или метилметансульфонатом.

Антигенотоксический эффект (АЭ) вычисляли по формуле:

$$АЭ(\%) = \frac{(Эг - Эгб) \times 100}{Эг}$$

где Эг – эффект (%ДНК в хвосте или поврежденных метафаз) при введении генотоксиканта, Эгб – эффект при введении генотоксиканта и бетанина.

Результаты исследования. В таблицах 3.24 и 3.25 представлены данные по оценке собственной генотоксической активности бетанина.

Установлено, что бетанин не проявляет повреждающей ДНК активности в органах/тканях и цитогенетической активности в клетках костного мозга мышей *in vivo*. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о собственной генетической безопасности соединения.

Таблица 3.24 – Влияние бетанина на уровень поврежденности ДНК в органах/тканях мышей *in vivo*

Группа	%ДНК в хвосте					
	клетки крови	печень	почки	желудок	12-перстная кишка	прямая кишка
<i>Негативный контроль</i>						
1	0,3	1,2	1,9	2,5	3,2	2,8
2	0,3	2,2	1,2	2,4	2,2	2,6
3	0,2	1,5	1,0	2,6	1,9	2,7
4	0,2	1,1	1,3	3,5	2,5	1,7
5	0,3	1,1	1,6	2,2	1,9	2,4
<i>m±SD</i>	<i>0,3±0,1</i>	<i>1,4±0,5</i>	<i>1,4±0,4</i>	<i>2,6±0,5</i>	<i>2,3±0,5</i>	<i>2,4±0,4</i>
<i>Бетанин 125 мг/кг</i>						
1	0,3	1,1	1,0	2,0	2,0	1,8
2	0,1	1,4	1,1	2,8	1,8	2,3
3	0,2	1,3	1,0	2,7	2,0	1,7
4	0,2	1,5	1,6	2,0	2,0	2,8
5	0,2	0,9	0,6	3,1	1,9	1,9
<i>m±SD</i>	<i>0,2±0,1</i>	<i>1,2±0,2</i>	<i>1,1±0,4</i>	<i>2,5±0,5</i>	<i>1,9±0,1</i>	<i>2,1±0,5</i>
<i>Бетанин 500 мг/кг</i>						
1	0,3	1,2	2,0	2,4	1,9	1,7
2	0,2	1,3	1,4	2,5	2,6	1,6
3	0,2	1,9	1,2	2,3	2,0	2,8
4	0,2	1,5	1,1	3,6	1,9	2,6
5	0,4	1,4	1,2	2,5	3,2	2,2
<i>m±SD</i>	<i>0,3±0,1</i>	<i>1,5±0,3</i>	<i>1,4±0,4</i>	<i>2,7±0,5</i>	<i>2,3±0,6</i>	<i>2,2±0,5</i>
<i>Бетанин 2000 мг/кг</i>						
1	0,1	1,2	0,9	1,3	2,0	2,8
2	0,1	1,0	1,2	2,4	1,9	2,2
3	0,2	1,5	0,9	2,2	1,9	2,6
4	0,2	1,1	1,3	1,8	1,9	1,8
5	0,4	1,4	1,4	1,6	2,3	3,0
<i>m±SD</i>	<i>0,2±0,1</i>	<i>1,2±0,2</i>	<i>1,1±0,2</i>	<i>1,9±0,5</i>	<i>2,0±0,2</i>	<i>2,5±0,5</i>

Таблица 3.25 – Влияние бетанина на уровень хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей *in vivo*

Условия эксперимента	на 100 клеток					Всего поврежденных метафаз (M±m %)
	гепов	хроматидных фрагментов	хромосомных фрагментов	обменов	клеток с МП ^a	
Контроль	0	0,4	0	0	0	0,4±0,3
Бетанин 125 мг/кг	0,2	0,6	0	0	0	0,8±0,4
500 мг/кг	0	0,4	0	0	0	0,4±0,3
2000 мг/кг	0,2	0,4	0	0	0	0,6±0,3
2000 мг/кг (24 ч)	0,2	0,2	0	0	0	0,4±0,3
Топотекан 0,5 мг/кг	0,3	4,0	0	1,8	7,8	12,8±1,7*

Примечание – ^a – метафаз с множественными (≥ 5) повреждениями хромосом; * – $p < 0,001$ по сравнению с контролем (φ – критерий Фишера).

Данные по антигенотоксической активности бетанина по отношению к эффектам диоксида представлено в таблице 3.26. Установлено, что бетанин проявляет выраженную антигенотоксическую активность в клетках печени, желудка, 12-перстной и прямой кишки, снижая эффекты генотоксиканта на 35–70%. При этом протекторная активность оказалась наиболее выражена в 12-перстной и прямой кишке. Не выявлено антигенотоксической активности в клетках крови.

Данные по антигенотоксической активности бетанина по отношению к эффектам метилметансульфоната представлено в таблице 3.27. Как и в экспериментах с диоксидом, не выявлено влияния бетанина на эффекты генотоксиканта в клетках крови. В дозе 25 мг/кг бетанин на 48,5–65,4% снижал индуцируемую метилметансульфонатом поврежденность ДНК в печени, желудке и органах ЖКТ. В дозе 50 мг/кг в указанных органах зарегистрирован сходный протекторный эффект, а в дозе 100 мг/кг последний оказался менее выражен, особенно в печени и желудке.

Таблица 3.26 – Влияние бетанина на повреждающую ДНК активность диоксида *in vivo*

Ткань / группа	Контроль		Диоксидин 250 мг/кг		Диоксидин + бетанин (мг/кг)					
					25	50	100			
%ДНК в хвосте по мышам и $m \pm SD$ / (антигенотоксический эффект)										
Кровь	0,2	0,2±0,1	7,4	6,3±1,7*	4,7	3,8±2,2	4,4	4,1±1,1	4,8	4,1±0,8
	0,1		3,8		2,7		3,2		5,0	
	0,1		6,5		7,3		3,3		3,4	
	0,2		7,5		2,1		3,8		3,7	
							2,2		5,9	
Печень	0,6	1,3±0,7	22,4	19,7±3,6*	14,7	11,7±1,8# (40,6%)	10,9	10,3±1,4# (47,7%)	12,3	11,4±1,6# (42,1%)
	0,7		20,0		10,3		10,7		13,2	
	1,9		21,8		11,4		9,4		9,6	
	1,7		14,6		10,5		8,3		10,0	
							11,5		12,0	
Желудок	0,8	1,6±1,3	14,0	14,8±2,2*	9,0	9,6±2,7# (35,1%)	5,1	5,2±1,3# (64,9%)	8,6	7,2±2,1# (51,4%)
	0,5		13,3		6,9		4,3		4,8	
	3,4		18,1		8,4		7,4		9,3	
	1,6		13,9		9,6		4,6		8,2	
							14,0		4,6	
12-перстная кишка	0,4	0,7±0,3	7,0	8,4±3,0*	3,3	4,9±2,8# (41,7%)	1,9	3,2±1,0# (61,9%)	1,5	3,1±2,0# (70,0%)
	0,6		6,0		2,5		3,3		1,9	
	0,8		8,0		4,1		2,6		6,5	
	1,0		12,6		4,8		3,6		2,9	
							9,7		4,6	

Продолжение таблицы 3.26

Прямая кишка	0,9	1,2±0,6	10,6	14,7±5,3*	5,9	5,7±2,3# (61,2%)	3,0	4,8±2,2# (67,3%)	3,6	5,0±2,9# (66,0%)
	1,6		11,9		9,5		8,2		2,9	
	0,6		22,4		3,4		2,6		4,6	
	1,9		13,8		5,4		4,4		10,0	
							4,4		5,6	

Примечание – * – p<0,001 по сравнению с контролем, # – p<0,001 по сравнению с эффектом диоксида (критерий Даннета).

Были проведены дополнительные эксперименты по установлению минимальной дозы, в которой бетанин проявляет антигенотоксическую активность. В дозе 10 мг/кг бетанин на 26,9–40,4% снижал генотоксический эффект диоксида в желудке, двенадцатиперстной и прямой кишке, тогда как в дозе 5 мг/кг – только в желудке (на 20,4%).

Таблица 3.27 – Влияние бетанина на повреждающую ДНК активность метилметансульфоната *in vivo*

Ткань / группа	Контроль	ММС 40 мг/кг	ММС + бетанин (мг/кг)							
			25	50	100					
%ДНК в хвосте по инд, мышам и m±SD / (антигенотоксический эффект)										
Кровь	0,3	0,3±0,1	10,0	9,9±2,5*	5,4	6,8±2,3	5,7	7,1±1,3	6,2	7,5±1,9
	0,5		10,5		10,3		7,6		5,6	
	0,2		7,0		5,7		6,6		7,4	
	0,3		13,6		4,8		9,1		10,4	
			8,5		8,0		6,4		7,9	
Печень	1,4	1,5±0,2	10,9	13,6±1,7*	8,4	7,0±1,8# (48,5%)	8,3	6,9±1,0# (49,3%)	7,0	8,7±1,0# (36,0%)
	1,3		15,0		6,2		7,2		8,7	
	1,6		14,9		9,5		5,7		9,4	
	1,8		13,1		5,1		7,0		9,2	
			14,1		5,9		6,3		9,3	
Желудок	2,1	2,1±0,2	13,0	21,1±7,9*	8,5	7,3±1,7# (65,4%)	8,4	7,2±0,8# (65,9%)	8,8	11,3±2,5# (46,5%)
	2,0		20,0		5,8		6,5		10,6	
	1,9		21,1		9,7		7,6		10,8	
	2,4		17,2		6,7		6,6		10,8	
			34,0		5,8		7,0		15,4	
12-перстная кишка	0,7	0,7±0,1	21,6	19,9±1,3*	6,7	7,3±1,8# (63,3%)	3,8	5,9±1,2# (70,4%)	6,3	8,8±1,5# (55,8%)
	0,9		20,8		6,3		6,5		8,1	
	0,6		18,6		5,5		6,5		9,9	
	0,6		20,0		10,0		6,9		9,8	
			18,6		8,0		5,7		9,6	
Прямая кишка	1,9	2,0±0,2	27,8	23,2±4,7*	11,1	10,0±3,1# (56,9%)	5,2	10,6±3,9# (54,3%)	8,2	11,6±2,8# (50,0%)
	1,9		18,9		10,8		15,1		10,5	
	2,2		28,4		6,0		10,4		11,9	
	1,7		22,0		8,0		8,7		11,4	
			18,8		13,8		13,4		16,0	

Примечание – * – p<0,001 по сравнению с контролем, # – p<0,001 по сравнению с эффектом диоксида (критерий Даннета); ММС – метилметансульфонат.

Данные экспериментов по оценке антигенотоксической активности в цитогенетическом тесте представлены в таблице 3.28. Установлено, что бетанин не оказывает статистически значимого влияния на кластогенные эффекты ни диоксидина, ни метилметансульфоната.

Таким образом установлено, что бетанин обладает выраженной антигенотоксической активностью в печени и клетках органов ЖКТ по отношению к генотоксикантам с различным механизмом ДНК-повреждающего действия, но не проявляет протекторной активности в клетках крови и костного мозга.

Таблица 3.28 – Влияние бетанина на цитогенетические эффекты диоксидина и метилметансульфоната в клетках костного мозга мышей *in vivo*

Условия эксперимента	на 100 клеток					Всего поврежденных метафаз (M±m %)
	гепов	хроматидных фрагментов	хромосомных фрагментов	обменов	клеток с МП ^а	
Контроль	0	0,4	0	0	0	0,4±0,3
Диоксидин 250 мг/кг	0,4	5,6	0	1,8	5,6	11,6±1,4 <i>p</i> <0,001 ^б
+Бетанин 25 мг/кг	0	5,0	0	1,6	8,6	13,6±1,5 <i>p</i> >0,05 ^в
50 мг/кг	0,2	5,0	0	1,6	5,2	10,8±1,4 <i>p</i> >0,05 ^в
100 мг/кг	0,4	6,0	0,4	0,6	7,2	12,2±1,5 <i>p</i> >0,05 ^в
ММС 80 мг/кг	0,2	9,2	0	2,4	1,4	12,2±1,5 <i>p</i> <0,001 ^б
+Бетанин 25 мг/кг	0,2	13,0	0	3,0	5,0	15,8±1,6 <i>p</i> >0,05 ^в
50 мг/кг	0,8	9,4	0	2,6	5,4	15,8±1,6 <i>p</i> >0,05 ^в
100 мг/кг	0,2	9,2	0,2	2,2	1,6	11,8±1,4 <i>p</i> >0,05 ^в

Примечание – ^а - метафаз с множественными (≥ 5) повреждениями хромосом; ^б - по сравнению с контролем; ^в - по сравнению с эффектом генотоксиканта (ϕ – критерий Фишера); ММС – метилметансульфонат.

3.6.3 Изучение антигенотоксичности апигенина, нарингенина и гесперетина

Темозоломид является монофункциональным алкилирующим ДНК агентом второго поколения, широко используемым для цитостатической терапии опухолей головного мозга высокой степени злокачественности. Его основные побочные эффекты обусловлены токсичностью для клеток костного мозга, приводящей к развитию миелосупрессии и апластической анемии, а при длительном применении – вторичного миелодиспластического синдрома и острого миелоидного лейкоза [331]. Перспективными средствами для предупреждения генотоксических эффектов темозоломида являются природные флавоноиды, обладающие антигенотоксической активностью, но имеющие ограниченную способность преодолевать гематоэнцефалический барьер, что снижает вероятность влияния на целевую активность цитостатика [332, 333]. Оценка тканеспецифичности протекторной активности таких флавоноидов – флавонола апигенина и флавононов нарингенина и гесперетина по отношению к генотоксическим эффектам темозоломида явилась задачей исследования.

Обработка животных. Эксперименты проведены на самцах мышей F₁ СВА×С57В1/6. В экспериментах по оценке антигенотоксической активности в цитогенетическом тесте апигенин в дозах 5, 25 и 50 мг/кг, нарингенин и гесперетин в дозах 25, 50 и 100 мг/кг в виде суспензии в 0,5% растворе карбоксиметилцеллюлозы вводили внутривентрикулярно, трехкратно, с интервалом 24 часа между введениями. Последнее введение сочеталось с внутривентрикулярным введением темозоломида (50 мг/кг), диоксидина (250 мг/кг), циклофосфамида (20 мг/кг) или метилметансульфоната (80 мг/кг), с получением цитогенетических препаратов костного мозга через 24 часа после введения. В отдельном эксперименте апигенин в указанных дозах вводили однократно через 1 час после введения темозоломида.

В экспериментах по оценке антигенотоксической активности методом ДНК-комет апигенин в дозах 5, 25 и 50 мг/кг, нарингенин и гесперетин в дозах

25, 50 и 100 мг/кг в виде суспензии в 0,5% растворе карбоксиметилцеллюлозы вводили внутривентрикулярно, трехкратно, с интервалом 24 часа между введениями. Последнее введение сочеталось с внутривентрикулярным введением темозоломида в дозе 50 мг/кг с получением микропрепаратов ДНК-комет клеток костного мозга, печени, почек, головного мозга и прямой кишки через 3 часа после введения. Антигенотоксический эффект (АЭ) вычисляли по формуле:

$$АЭ(\%) = \frac{(Эг - Эгс) \times 100}{Эг}$$

где Эг – эффект (%ДНК в хвосте или поврежденных метафаз) при введении генотоксиканта, Эгс – эффект при введении генотоксиканта и соединения.

Результаты исследования. В проведенных экспериментах применяли темозоломид в дозе 50 мг/кг, что с учетом межвидового пересчета доз соответствует суточной терапевтической у человека. Указанная доза вызывала достоверное повышение уровня повреждений ДНК во всех исследованных органах, с наиболее выраженным эффектом в печени и почках (таблица 3.29). Помимо генотоксического действия в почках зарегистрирован цитотоксический эффект, проявлявшийся увеличением до 44% уровня атипичных ДНК-комет.

Апигенин в дозах 25 и 50 мг/кг редуцировал поврежденность ДНК в клетках костного мозга и печени, в дозе 25 мг/кг в почках, и в дозах 5 и 50 мг/кг в прямой кишке. Во всех использованных дозах апигенин в почках снижал долю атипичных ДНК-комет. Не выявлено антигенотоксической активности у апигенина в клетках головного мозга.

Для нарингенина в дозах 50 и 100 мг/кг зарегистрирована антигенотоксическая активность в клетках костного мозга и головного мозга, в дозах 25 и 50 мг/кг в клетках прямой кишки. В остальных органах

соединение не снижало индуцированную темозоломидом поврежденность ДНК.

Антигенотоксическая активность гесперетина в клетках почек, головного мозга и прямой кишки наблюдалась во всех использованных дозах. В костном мозге протекторная активность выявлена в дозах 25 и 50 мг/кг. В клетках печени у гесперетина защитных эффектов не выявлено.

Цитогенетический анализ в клетках костного мозга выявил антигенотоксическую активность по отношению к эффектам темозоломида у всех трех соединений во всех исследованных дозах (таблица 3.30).

Таблица 3.29 – Влияние апигенина, нарингенина и гесперетина на повреждающую ДНК активность темозоломида

Группа	%ДНК в хвосте (M±SD) /АЭ (%), p				
	костный мозг	печень	почки	головной мозг	прямая кишка
Контроль	1,0±0,6	2,0±0,5	1,7±0,8 (4,6±1,5%) ^a	1,2±0,5	3,0±1,8
ТМ 50 мг/кг	6,8±1,6, <i>p</i> =0,0079*	16,5±1,6, <i>p</i> =0,0079*	14,2±2,7, <i>p</i> =0,0079* (36,6±2,1%, <i>p</i> =0,002 ^{&})	9,1±0,9, <i>p</i> =0,0079*	8,7±2,7, <i>p</i> =0,0156*
+ АП 5 мг/кг	5,3±0,9	17,2±3,5	11,2±2,0 (15,7±3,6%, <i>p</i> =0,012 ^{&&})	11,5±2,3	2,7±1,5/100, <i>p</i> =0,7302 [^]
+ АП 25 мг/кг	2,3±1,5/66, <i>p</i> =0,0001**	5,8±0,9/65, <i>p</i> <0,0001**	7,1±4,0/50, <i>p</i> <0,0258** (4,6±2,7%, <i>p</i> =0,0079 ^{&&})	8,3±1,9	11,7±5,4
+ АП 50 мг/кг	3,3±1,1/52, <i>p</i> =0,0014**	11,4±2,2/31, <i>p</i> =0,0068**	11,6±5,2 (20,1±8,8%, <i>p</i> =0,048 ^{&&})	7,0±2,3	2,8±0,8/100, <i>p</i> =0,6905 [^]
Контроль	1,3±0,2	3,6±0,4	1,8±0,3 (8,8±2,1%)	0,9±0,3	2,0±1,0
ТМ 50 мг/кг	5,6±1,3, <i>p</i> =0,0079*	14,8±4,5, <i>p</i> =0,0079*	11,8±1,9, <i>p</i> =0,0079* (23,2±6,0%, <i>p</i> =0,0073 ^{&})	9,1±1,5, <i>p</i> =0,0079*	10,3±2,2, <i>p</i> =0,0079*
+ НГ 25 мг/кг	4,1±1,1	14,7±3,5	11,6±3,4 (31,3±6,2%)	7,7±1,7	5,3±1,3/49 <i>p</i> =0,0014**
+ НГ 50мг/кг	2,9±0,7/48, <i>p</i> =0,001**	11,0±1,5	9,6±1,8 (22,6±5,2%)	5,1±0,9/44, <i>p</i> =0,0019**	4,8±1,5/54 <i>p</i> =0,0007**
+ НГ 100 мг/кг	2,1±1,0/62, <i>p</i> =0,0001**	13,8±1,8	9,2±1,8 (24,6±6,1%)	6,7±1,9/26, <i>p</i> =0,049**	11,2±2,1
Контроль	1,9±0,5	2,4±0,7	2,2±0,8 (6,5±2,2%)	1,9±0,6	2,8±0,7
ТМ 50 мг/кг	6,2±0,7, <i>p</i> =0,0079*	11,1±1,5, <i>p</i> =0,0079*	12,6±2,6, <i>p</i> =0,0079* (44,0±3,4%, <i>p</i> =0,0073 ^{&})	6,5±0,7, <i>p</i> =0,0079*	9,4±2,2, <i>p</i> =0,0079*
+ ГТ 25 мг/кг	4,8±0,7/23, <i>p</i> =0,0032**	9,1±0,5	8,4±0,5/33, <i>p</i> =0,0007** (34,5±5,1)	3,8±0,6/42, <i>p</i> <0,0001**	5,7±0,9**/39, <i>p</i> =0,001**
+ ГТ 50 мг/кг	4,7±0,6/23, <i>p</i> =0,002**	10,6±2,2	9,0±0,8/29, <i>p</i> =0,0027** (38,5±4,3%)	5,0±0,5/23, <i>p</i> =0,0085**	5,0±0,2**/47, <i>p</i> =0,0002**
+ ГТ 100 мг/кг	5,3±0,4	11,4±2,5	8,7±0,4/31, <i>p</i> =0,0013** (40,3±8,3%)	4,6±0,9/29, <i>p</i> =0,0014**	6,4±1,2#/32, <i>p</i> =0,0065**

Примечание – АП – апигенин; НГ – нарингенин; ГТ – гесперетин; ТМ – темозоломид; АЭ – антигенотоксический эффект; ^a – атипичных ДНК-комет (M±SD); * – по сравнению с контролем (критерий Манна-Уитни); ** – по сравнению с эффектом ТМ (критерий Даннета для множественных сравнений); & – по сравнению с контролем (критерий χ^2); && – по сравнению с эффектом ТМ (критерий χ^2); ^ – по сравнению с контролем (критерий Манна-Уитни).

Таблица 3.30 – Влияние апигенина, нарингенина и гесперетина на цитогенетические эффекты темозоломида в клетках костного мозга мышей

Группа	на 100 клеток					Метафаз с абберациями (M±SE, %)	АЭ (%)
	гепов	хроматид. фрагм.	хромосом. фрагм.	обменов	метафаз с МП ^а		
Контроль	0	0,4	0	0	0	0,4±0,3	
ТМ 50 мг/кг	1,0	12,0	0	0,8	2,8	14,2±1,6 [#]	
+ АП 5 мг/кг	0,2	6,2	0,2	0,8	0,4	6,8±1,1^{**}	52
+ АП 25 мг/кг	0,4	3,4	0,2	0,2	0,4	3,8±0,9[*]	73
+ АП 50 мг/кг	0,2	6,0	0	0,4	1,6	7,2±1,2[*]	49
ТМ 50 мг/кг	0,8	7,8	0,6	0,2	0,6	8,8±1,3 [#]	
+ НГ 25 мг/кг	1,2	2,6	0	0,2	0,4	4,0±0,9^{**}	55
+ НГ 50 мг/кг	0,5	4,3	0	0,3	0,5	4,5±1,0^{**}	49
+ НГ 100 мг/кг	0,2	2,0	0,2	0	0	2,2±0,7[*]	75
ТМ 50 мг/кг	0,8	6,6	0,4	0,4	1,0	8,8±1,3 [#]	
+ ГТ 25 мг/кг	0,6	4,8	0	0,4	0,4	5,4±1,0^{***}	39
+ ГТ 50 мг/кг	0	3,6	0	0,2	0,6	4,2±0,9^{**}	52
+ ГТ 100 мг/кг	0,6	3,2	0	0,2	0,6	4,0±0,9^{**}	55
введение АП через 1 час после ТМ							
ТМ 50 мг/кг	0,4	8,8	0	0,6	0,8	8,6±1,3 [#]	
+ АП 5 мг/кг	0	3,4	0	0,4	1,0	4,6±0,9^{***}	47
+ АП 25 мг/кг	0	3,6	0	0	0,6	4,2±0,9^{**}	51
+ АП 50 мг/кг	0,6	2,6	0	0,4	0,6	4,2±1,2^{**}	51

Примечание – АП – апигенин; НГ – нарингенин; ГТ – гесперетин; ТМ – темозоломид; АЭ – антигенотоксический эффект; ^а – метафаз со множественными (≥ 5 на метафазу) повреждениями хромосом; [#] – $p < 0,001$ по сравнению с контролем; * – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$ и *** – $p < 0,05$ по сравнению с эффектом темозоломида (угловой ϕ – критерий Фишера).

Наибольший антигенотоксический эффект для апигенина выявлен в дозе 25 мг/кг (73%), для нарингенина (75%) и гесперетина (55%) в дозе 100 мг/кг. Апигенин в условиях введения через час после инъекции темозоломида также продемонстрировал антигенотоксическое действие, снижая цитогенетические эффекты генотоксиканта на 47–51%.

Для определения спектра антигенотоксической активности апигенина и нарингенина были проведены дополнительные цитогенетические

исследования с применением модельных генотоксикантов, различающихся по механизму действия (таблица 3.31).

Таблица 3.31 – Влияние апигенина и нарингенина на цитогенетические эффекты циклофосфамида, метилметансульфоната и диоксидина в клетках костного мозга мышей

Группа	на 100 клеток					Метафаз с абберациями (M±SE, %)	АЭ (%)
	гепов	хроматид. фрагм.	хромосом. фрагм.	обменов	метафаз с МП ^а		
Контроль	0	0,4	0	0	0	0,4±0,3	
ЦФ 20 мг/кг	0,2	12,6	0,2	2,0	2,6	14,6±1,6 [#]	
+ АП 5 мг/кг	0,5	12,8	0,3	2,8	4,0	15,3±1,8	0
+ АП 25 мг/кг	0,4	7,4	0	1,6	1,6	9,6±1,3^{***}	34
ДН 250 мг/кг	0	6,5	0	1,0	14,3	19,8±2,0 [#]	
+ АП 5 мг/кг	0,2	5,0	0	1,4	7,8	12,2±1,5^{**}	38
+ АП 25 мг/кг	0	2,6	0	0,4	7,4	9,6±1,3[*]	52
ММС 80 мг/кг	0,4	6,0	0,2	1,6	1,0	8,2±1,2 [#]	
+ АП 5 мг/кг	0,2	5,4	0	1,0	0,4	5,6±1,0	0
+ АП 25 мг/кг	0,2	3,0	0	0,6	0,4	3,8±0,9^{**}	54
ЦФ 20 мг/кг	0,4	9,4	0	1,2	3,6	13,0±1,5 [#]	
+ НГ 50 мг/кг	0,4	7,4	0	0,4	0,6	7,4±1,2^{**}	43
+ НГ 100 мг/кг	0	3,2	0	0,4	0,6	3,8±0,9[*]	71
ДН 250 мг/кг	0,4	5,2	0	0,6	11,0	16,4±1,8 [#]	
+ НГ 50 мг/кг	0,2	3,8	0,2	0,2	11,8	14,8±1,7	0
+ НГ 100 мг/кг	0,4	3,2	0	0,6	11,6	14,6±1,7	0

Примечание – АП – апигенин; НГ – нарингенин; ЦФ – циклофосфамид; ДН – диоксидин; ММС – метилметансульфонат; АЭ – антигенотоксический эффект; ^а – метафаз со множественными (≥5 на метафазу) повреждениями хромосом; [#] – p<0,001 по сравнению с контролем; * – p<0,001, ** – p<0,01 и *** – p<0,05 по сравнению с эффектом генотоксиканта (угловой φ – критерий Фишера).

В дозе 25 мг/кг апигенин снижал генотоксические эффекты циклофосфамида и метилметансульфоната, а в дозах 5 и 25 мг/кг – и диоксидина. В дозах 50 и 100 мг/кг нарингенин показал значимую антигенотоксическую активность в отношении индуцированных циклофосфамидом аббераций, однако не оказывал протекторного эффекта против цитогенетических эффектов диоксидина.

Обсуждение результатов

Обязательным условием для разрабатываемых антигенотоксикантов является отсутствие у них собственной генотоксической активности. Исследования в тесте Эймса и методом учета микроядер в клетках костного мозга *in vivo* показали, что бетаин не обладает генотоксической активностью [334]. В тестах *in vitro* и *in vivo* установлено, что апигенин, нарингенин и гесперидин (гликозид гесперетина) не обладают генотоксической активностью [335–337]. Исследования бетанина в составе экстракта свеклы в *in vitro* тестах продемонстрировали слабовыраженные мутагенные и кластогенные эффекты [338]. Было высказано предположение, что последние могут быть обусловлены наличием в изученных образцах экстрактов помимо бетанина других компонентов свеклы, обладающих генотоксичностью, в частности, нитритов и нитратов. В *in vivo* экспериментах у бетанина не было установлено генотоксической активности, однако ввиду методических недочетов данные этих исследований не позволили сделать однозначное заключение о его генетической безопасности [338]. В настоящем исследовании, проведенном в соответствии с современными требованиями, методами цитогенетического анализа и ДНК-комет *in vivo* показано отсутствие у бетанина генотоксической активности.

Антигенотоксическая активность бетаина продемонстрирована в тесте по учету хромосомных aberrаций в клетках костного мозга и методом ДНК-комет. По отношению к повреждающим эффектам диоксида протекторные эффекты бетаина помимо клеток костного мозга также выявлены в клетках печени и почек. Эти данные согласуются с результатами исследования комбинации аспартам+бетаин на модели стрептозоцин-индуцированного диабета, в котором продемонстрирована антигенотоксическая активность комбинации в указанных органах (раздел 3.5.1). Ранее для бетаина показана также способность снижать поврежденность ДНК в клетках плаценты и эмбрионов крыс со стрептозоцин-индуцированным диабетом [339]. Снижение эффектов генотоксиканта прооксидантного механизма действия диоксида

[340] и эндогенной генотоксичности на моделях стрептозоцин-индуцированного диабета позволяет утверждать, что антигенотоксическая активность бетаина связана с его антиоксидантной и/или противовоспалительной активностями [321]. Вместе с этим протекторная активность соединения также выявлена в цитогенетическом тесте по отношению к эффектам циклофосфида, а методом ДНК-комет по отношению к эффектам метилметансульфоната – генотоксикантам алкилирующего типа действия. Для бетаина установлена способность снижать канцерогенез в легких мышей, индуцируемый 4-(метилнитрозамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанолом, предположительно за счет активации репарации алкилированных оснований ДНК [341]. Не исключено, что антигенотоксическая активность бетаина по отношению к повреждающему действию алкилирующих генотоксикантов также может быть связана с его внутриклеточной функцией донора метильных групп.

Бетанин проявил выраженную антигенотоксическую активность в клетках печени, желудка, 12-перстной и прямой кишки по отношению к эффектам обоих использованных генотоксикантов – диоксида и метилметансульфоната. В первом случае, протекторные эффекты соединения очевидно связаны с его антиоксидантной активностью, продемонстрированной неоднократно [327].

Механизмы антигенотоксического действия бетанина в отношении метилметансульфоната остаются не ясными, однако можно предложить следующую гипотезу. Беталаины образуются в результате конденсации беталаминовой кислоты с аминокислотами или аминами, природа которых определяет, к какому классу будут относиться продукты реакции – бетацианинам или бетаксантинам [342]. L-DOPA является предшественником как беталаминовой кислоты, так и цикло-DOPA – структурного фрагмента, определяющего структуру бетацианинов. Кроме того, L-DOPA может конденсироваться с беталаминовой кислотой с образованием бетаксантина. Было показано, что L-DOPA, дофамин, адреналин и их предшественник L-

тирозин достоверно снижают частоту образования микроядер в полихроматофильных эритроцитах периферической крови и костного мозга мышц, обработанных метилметансульфонатом [343]. Предполагаемый механизм защитного действия заключается в связывании алкилирующего карбокатиона CH_3^+ этими соединениями посредством реакции замещения в ароматическом кольце или нуклеофильными группами в боковых цепях [343].

Бетанин проявил сходную антигенотоксическую активность в отделах желудочно-кишечного тракта, несколько более низкую в печени и не оказывал протекторного действия в клетках крови. Цитогенетический анализ не выявил антикластогенной активности бетанина в костном мозге. Было показано, что предобработка животных экстрактом свеклы приводит к достоверному снижению повреждений ДНК (на 20%) в клетках печени крыс, обработанных N-нитрозодиэтиламиноом [344]. Вместе с тем, не было выявлено защитного действия экстракта на повреждение ДНК в клетках крови животных, обработанных 7,12-диметилбенз[а]антраценом [345]. В совокупности с этими экспериментальными сведениями полученные результаты указывают на то, что бетанин проявляет специфичную для органов ЖКТ антигенотоксичность, что очевидно объясняется очень низкой биодоступностью бетацианинов (1–3%) и их воздействием на клетки ЖКТ на всем его протяжении [346].

Таким образом, тканеспецифичность действия бетанина может служить примером целенаправленной антимуtagenной терапии, когда целью защиты являются определенные органы/ткани организма. Представляется перспективной разработка бетанина в качестве средства предупреждения генотоксичности и развития вторых первичных опухолей в органах ЖКТ и печени у пациентов, проходящих химиотерапию при опухолях других локализаций.

Выраженные органо- и тканеспецифические антигенотоксические эффекты выявлены в экспериментах с природными флавоноидами – апигенином, нарингенином и гесперетином. Все три соединения по отношению к эффектам генотоксиканта темозоломида продемонстрировали в

клетках костного мозга протекторную активность, оцененную по двум конечным точкам – поврежденности ДНК и уровню хромосомных aberrаций. Антигенотоксичность апигенина также установлена в клетках печени, почек и прямой кишки. В почках апигенин снижал уровень атипичных ДНК-комет, вплоть до контрольных значений (доза 25 мг/кг), что свидетельствует о выраженной цитопротекторной активности. Нарингенин и гесперетин проявили антигенотоксическую активность в клетках головного мозга и прямой кишки, гесперетин также в почках, однако в печени эффект у обоих соединений не проявлялся. В цитогенетическом тесте антигенотоксические эффекты апигенина установлены также в отношении циклофосамида, метилметансульфоната и диоксидина. У нарингенина выявлена способность снижать кластогенные эффекты циклофосамида.

Анализ полученных данных показывает, что антигенотоксические эффекты апигенина, нарингенина и гесперетина не имеют дозовой зависимости, либо она носит нелинейный характер, что очевидно связано с особенностями их фармакокинетики, мета-/катаболизма и молекулярными механизмами биологической активности. Они характеризуются низкой биодоступностью (<10%), склонной к дозозависимому снижению вследствие насыщения транспортных систем и активации эффлюксных транспортеров, а также низкой проницаемостью для гематоэнцефалического барьера [347].

Несмотря на низкую биодоступность исследованные соединения проявили антигенотоксические эффекты, сопоставимые или превышающие таковые для известных антигенотоксикантов, в том числе синтетической природы [3]. Апигенин проявил защитные эффекты по отношению к повреждающим эффектам всех использованных в исследовании генотоксикантов, нарингенин – темозоломида и циклофосамида. Это позволяет предположить существование некоего общего универсального механизма реализации антигенотоксического потенциала у исследованных флавоноидов. Особый интерес представляет их способность модулировать

ключевые сигнальные каскады клеточного ответа на стрессорные воздействия, включая повреждение ДНК [348].

Таким образом, для апигенина, нарингенина и гесперетина установлена антигенотоксическая активность по отношению к эффектам генотоксикантов с различными механизмами действия. Протекторные эффекты апигенина и гесперетина в условиях постобработки позволяют использовать их для защиты организма после генотоксического воздействия, что значительно расширяет сферы их практического применения. Апигенин не проявляет антигенотоксичности в клетках головного мозга, но при этом демонстрирует выраженные защитные эффекты в органах-мишенях побочного действия темозоломида, прежде всего в костном мозге. Это определяет перспективность его разработки в качестве сопроводительного лекарственного средства защиты нецелевых тканей от генотоксического воздействия, снижающего побочные эффекты при цитостатической терапии опухолей головного мозга темозоломидом. Очевидны перспективы дальнейшего поиска высокоэффективных антигенотоксикантов, в том числе таргетного действия, в ряду природных флавоноидов и/или их синтетических производных.

Отдельно следует обсудить результаты сопоставления данных цитогенетического теста и метода ДНК-комет в клетках костного мозга. В цитогенетическом тесте бетаин продемонстрировал наивысшую протекторную активность в дозе 10 мг/кг, тогда как при оценке повреждений ДНК методом ДНК-комет – в дозе 1 мг/кг. Для апигенина, нарингенина и гесперетина снижение кластогенных эффектов темозоломида выявлено во всех исследованных дозах. При оценке влияния на поврежденность ДНК для доз апигенина 25 и 50 мг/кг и доз нарингенина 50 и 100 мг/кг получены сопоставимые с данными цитогенетического теста протекторные эффекты. В то же время в наименьшей из исследованных доз оба соединения не продемонстрировали снижения индуцируемых генотоксикантом повреждений ДНК. Аналогично, в экспериментах на поврежденность ДНК защитный эффект гесперетина выявлен только в наименьшей исследованной дозе – 25

мг/кг. Очевидно, что причина несовпадения данных двух тестов связана с особенностями возникновения регистрируемых конечных точек. Цитогенетический тест позволяет регистрировать повреждения ДНК, зафиксированные в хромосомные aberrации. Метод ДНК-комет регистрирует одно- и двунитевые разрывы в ДНК и щелочно-лабильные сайты, возникающие не только в результате прямого повреждения молекулы ДНК, но и реализуемые в ходе репарации – процесса, растянутого во времени. Соответственно, для разных доз антигенотоксиканта ввиду различий в фармакокинетических и фармакодинамических профилях «окно наблюдения» для различных генотоксических точек будет значимо различаться. Подтверждение данной гипотезы может быть получено в экспериментах с оценкой методом ДНК-комет дозово-временных характеристик проявления антигенотоксических эффектов. Тем не менее следует подчеркнуть, что данные двух тестов не противоречат, а взаимно дополняют друг друга и позволяют более развернуто охарактеризовать протекторные эффекты соединений.

Заключение

Для бетаина, бетанина, апигенина, нарингенина и гесперетина с использованием двух конечных точек (генотоксических событий) – хромосомных aberrаций и повреждений ДНК, установлены выраженные, характеризующиеся органо- и тканеспецифичностью антигенотоксические эффекты. Впервые экспериментально продемонстрирован предлагаемый подход таргетной антигенотоксической защиты. Полученные данные определяют перспективность дальнейшей разработки бетанина и апигенина в качестве сопроводительных средств для направленной протекции от цитостатического воздействия нецелевых органов/тканей при проведении соответствующей противоопухолевой терапии.

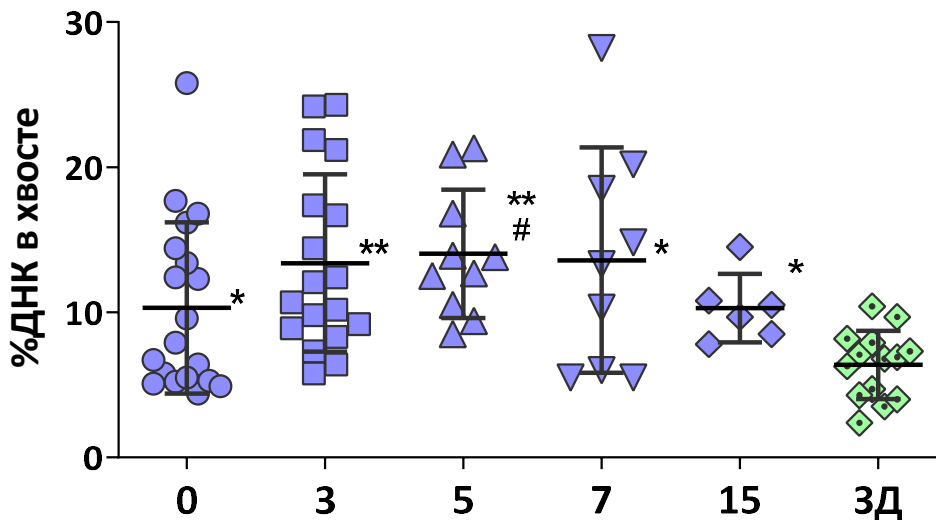
3.7 Оценка эндогенной генотоксичности у пациентов с тяжелой сочетанной травмой и при невынашивании беременности

3.7.1 Оценка эндогенной генотоксичности у пациентов с тяжелой сочетанной травмой

У пациентов в критическом состоянии, обусловленном тяжелой травмой, развивается сложная системная воспалительная реакция, которая может приводить к дисфункции органов, гемодинамической нестабильности и коагулопатии [349]. Воспалительная реакция, в свою очередь, способствует развитию хронического окислительного стресса, ведущего к усугублению первичного патологического состояния с развитием острого респираторного дистресс-синдрома, полиорганной недостаточности, сепсиса и летального исхода [350–352]. Применение антиоксидантов в сопроводительной терапии рассматривается многими специалистами как один из эффективных способов восстановления про-антиоксидантного баланса в организме при критических состояниях [349, 350]. Вместе с тем такая фармакологическая коррекция в полной мере не разработана, поскольку нет единого мнения о том, какие биомаркеры считать наиболее специфичными для характеристики окислительного стресса [349, 350]. Традиционно его выраженность принято оценивать по уровню продуктов перекисного окисления липидов и по общему антиоксидантному статусу [350, 351, 353]. Учитывая, что окислительный стресс является ведущим механизмом эндогенно-индуцированной генотоксичности, было выдвинуто предположение, что критические состояния будут сопровождаться увеличением поврежденности ДНК. Проверке указанной гипотезы посвящены настоящие эксперименты.

В первой серии исследований выборка пациентов с тяжелой сочетанной 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 3.35). 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 последующие 3, 5 и 7 сутки наблюдалось дальнейшее увеличение поврежденности ДНК клеток крови, при этом значение на 5 сутки оказалось статистически значимо выше по сравнению с 0 сутками.



Примечание –* – $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля и ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля (U-критерий Манна-Уитни); # – $p < 0,05$ по сравнению с показателем на 0 сутки (критерий Уилкоксона).

Рисунок 3.35 – 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

Начиная с 5 суток значительная часть пациентов выбыла из наблюдения ввиду летального исхода. На 15 сутки наблюдения показатель поврежденности ДНК снизился, но оставался значимо выше показателя для контрольной группы.

Анализ содержания 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина в ДНК клеток крови не выявил статистически значимых отличий между группой здоровых доноров и пациентами на всех сроках наблюдения (рисунок 3.36).

Для некоторых образцов крови пациентов в качестве пилотного исследования получали микропрепараты ДНК-комет с нейтральным электрофорезом. На этих микропрепаратах выявлены ДНК-кометы, имеющие

типичную морфологию, но при этом значительно меньших размеров (рисунок 3.37, в). Особенности таких «малых» ДНК-комет являлось то, что они имеют хвосты приблизительно одинаковой длины с содержанием ДНК в хвосте в пределах 45–60%, общее содержание ДНК (голова + хвост) широко варьирует и составляет максимально $\sim 1/3$ от значения для типичных ДНК-комет. У 8 пациентов на 3 или 5 сутки на микропрепаратах ДНК-комет наблюдалась высоко-фрагментированная ДНК, диффузно распределенная по гелю и затрудняющая анализ и дифференцировку ДНК-комет (рисунок 3.37, г).

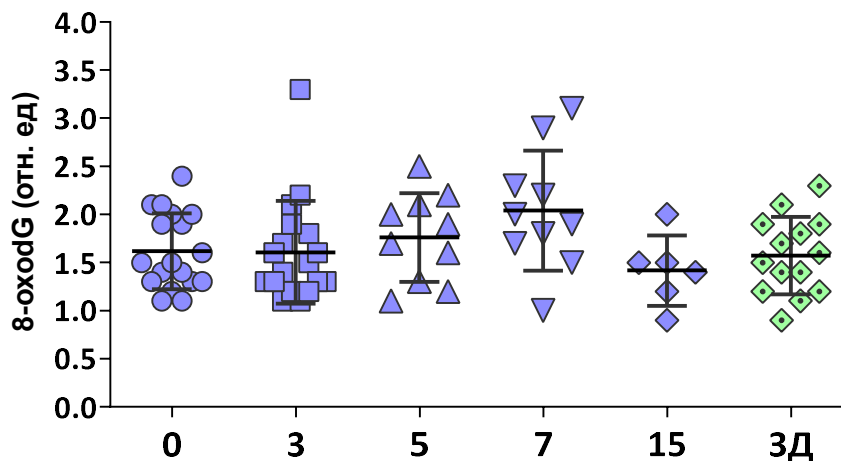
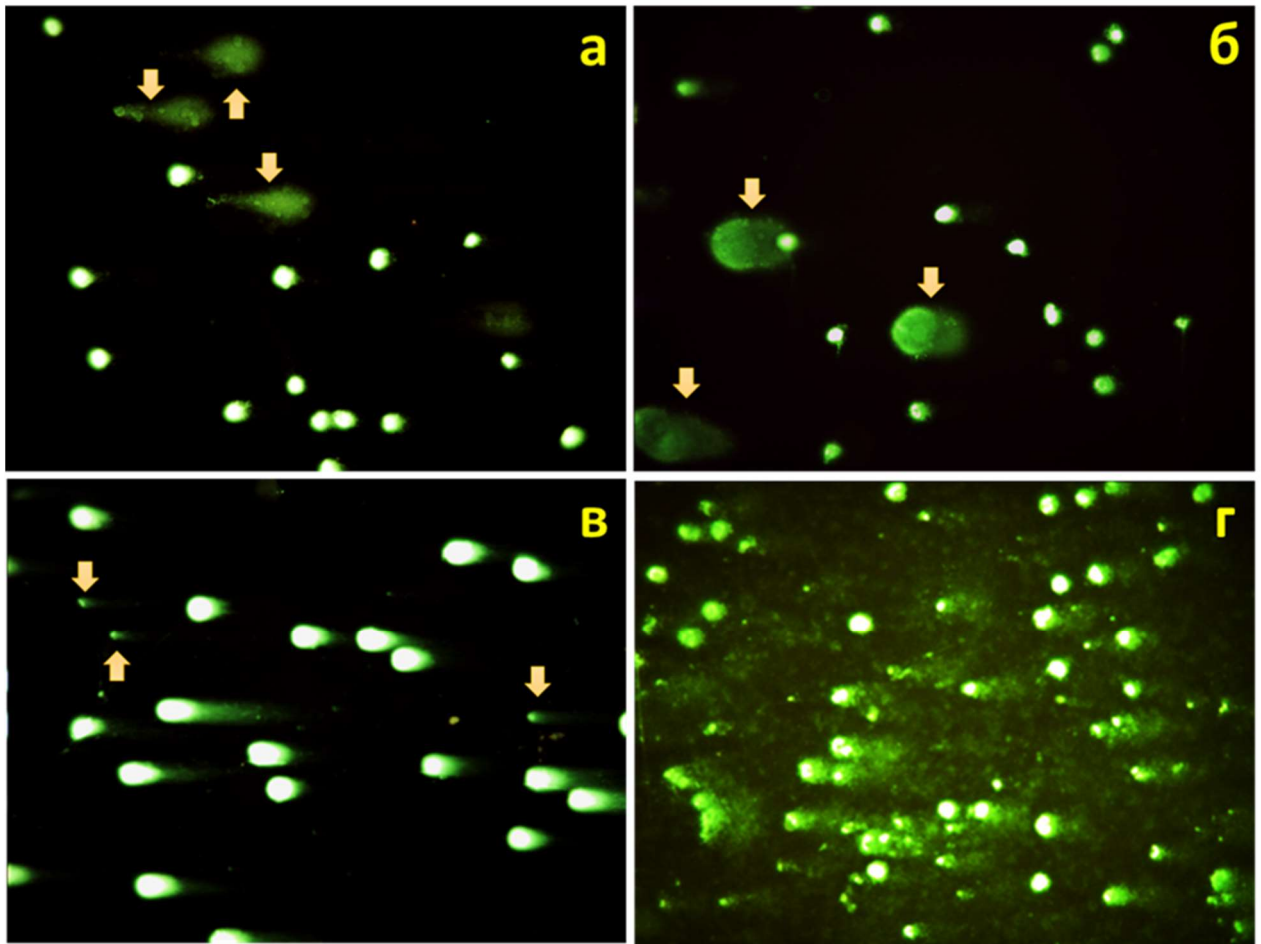


Рисунок 3.36 – Уровень содержания 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина (8-oxodG) в ДНК клеток крови здоровых доноров (ЗД) и пациентов с тяжелой сочетанной травмой в день поступления в реанимационное отделение (0) и на 3, 5, 7 и 15 сутки наблюдения

На сегодня выявленные феномены не имеют объяснения. Очевидно, что такая фрагментация ДНК связана с клеточной гибелью. Травматическое повреждение органов/тканей с индукцией локальных воспалительных реакций может приводить к попаданию в кровотоки клеток, гибнущих преимущественно некротическим путем.



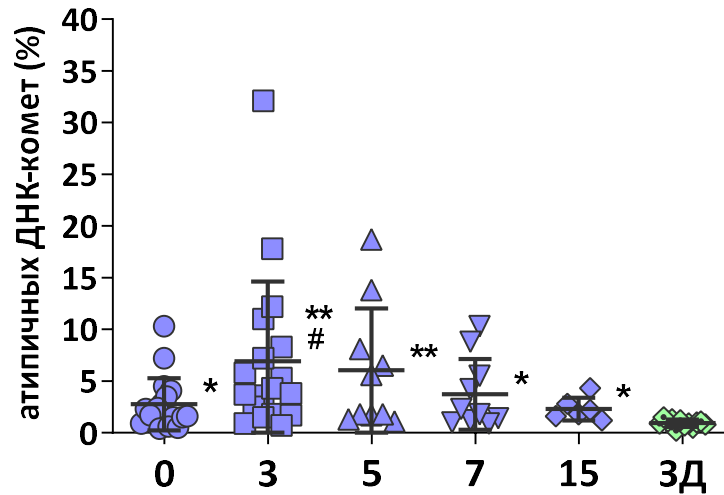
Примечание – а – с атипичными ДНК-кометами; б – с ДНК-кометами большого размера с диффузно-распределенной ДНК; в – с «малыми» ДНК-кометами (нейтральный электрофорез); г – с высоко-фрагментированной ДНК.

Рисунок 3.37 – Цифровые изображения с микропрепаратов ДНК-комет клеток пациентов с тяжелой сочетанной травмой

Известны литературные данные, свидетельствующие о значительном возрастании в плазме крови пациентов с различными видами травмы ДНК некротических клеток, которая обратно коррелировала с выживаемостью пациентов [354]. Предполагая указанный механизм, ДНК-кометы большого размера с диффузно-распределенной ДНК (рисунке 3.37, б) классифицировали как «некротические» и проводили подсчет наряду с оценкой атипичных ДНК-комет.

Средне-групповой показатель уровня атипичных ДНК-комет у здоровых доноров составил $0,9 \pm 0,4\%$ (рисунок 3.38). 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.



Примечание – * – $p < 0,05$ 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).

Рисунок 3.38 – 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

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 3.39).

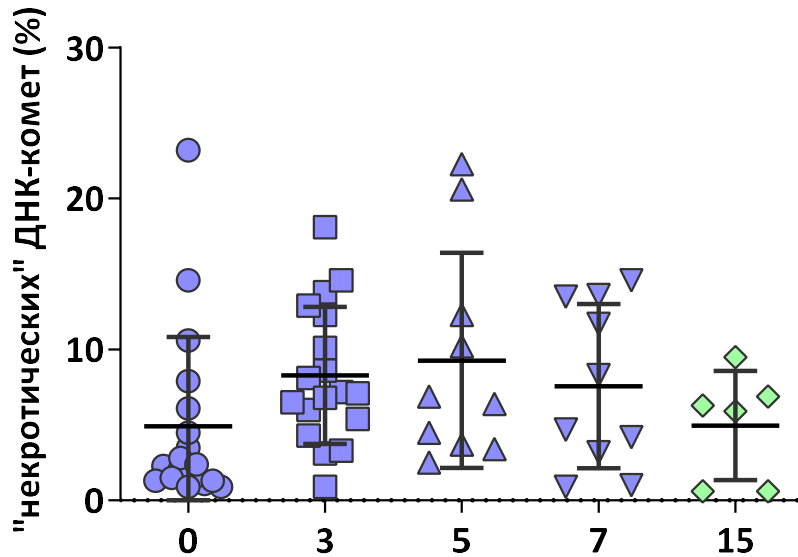
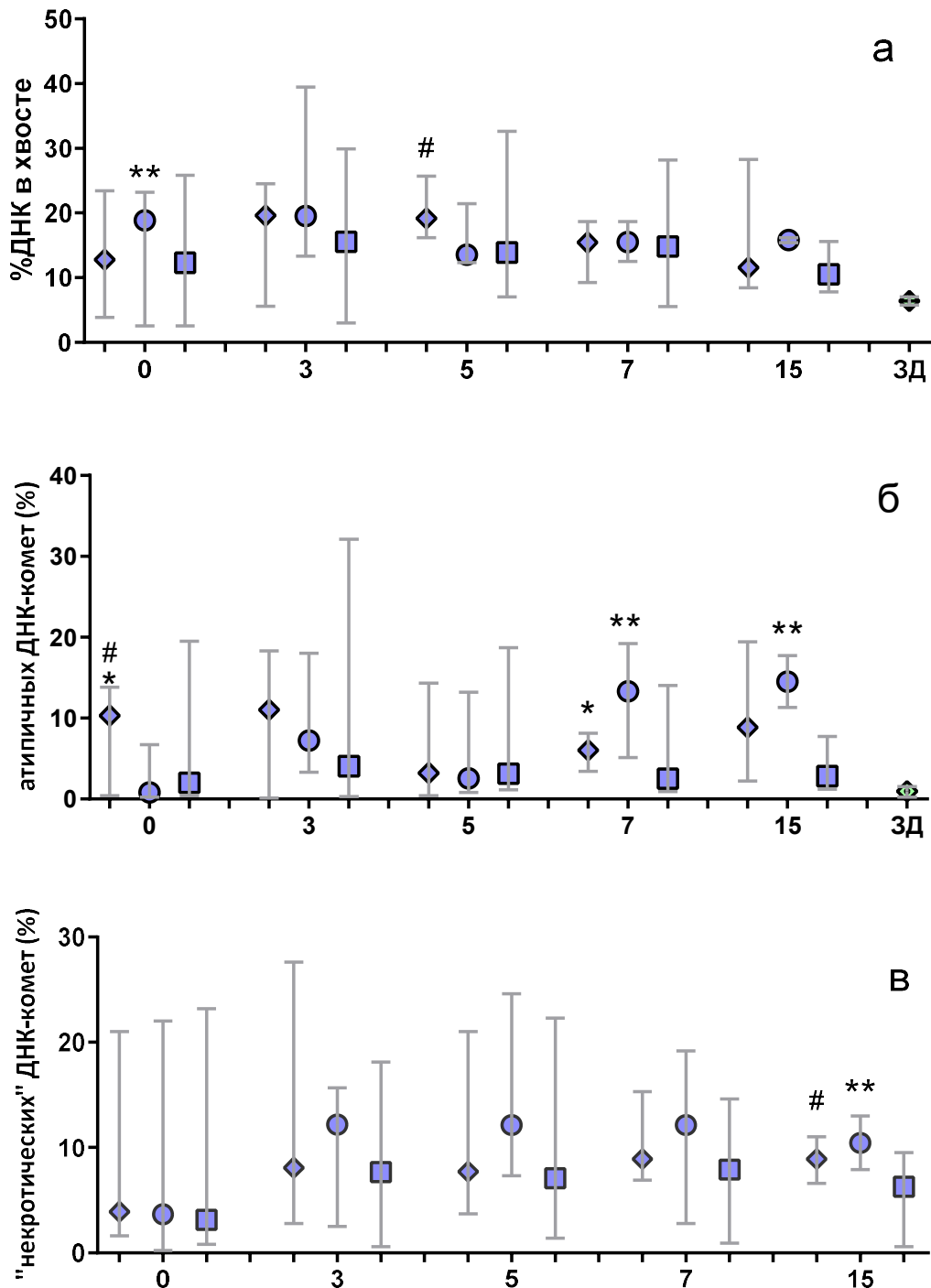


Рисунок 3.39 – Уровень «некротических» ДНК-комет на микропрепаратах крови пациентов с тяжелой сочетанной травмой в день поступления в реанимационное отделение (0) и на 3, 5, 7 и 15 сутки наблюдения

Во второй серии исследований клиническая выборка состояла из 95 пациентов. Средние показатели поврежденности ДНК для всей группы пострадавших на всех сроках наблюдения оказались статистически значимо выше (0 сутки – $14,4 \pm 5,8\%$; 3 сутки – $19,7 \pm 7,7\%$; 5 сутки – $17,8 \pm 5,9\%$; 7 сутки – $15,6 \pm 3,4\%$; 15 сутки – $14,1 \pm 5,8\%$) по сравнению с показателем для здоровых доноров – $6,4 \pm 2,3\%$ ($p < 0,01$). Выявлены значимые различия между группами с ЧМТ+ТСТ и ТСТ на первые (0) сутки наблюдения и между группами ЧМТ и ТСТ на пятый день (рисунок 3.40, а).

Уровни атипичных ДНК-комет для всей группы пациентов на всех сроках наблюдения оказались статистически значимо выше (1 день – $5,4 \pm 5,5$, $p < 0,05$; 3 день – $8,6 \pm 6,2$, $p < 0,01$; 5 день – $5,4 \pm 4,9$, $p < 0,05$; 7 день – $7,8 \pm 5,5$, $p < 0,01$; 15 день – $9,0 \pm 5,8$, $p < 0,01$) по сравнению со здоровыми донорами – $0,9 \pm 0,4\%$. Достоверно высокий уровень атипичных ДНК-комет на первые (0) сутки наблюдения выявлен у пострадавших с ЧМТ по сравнению с пациентами с ЧМТ+ТСТ и ТСТ (рисунок 3.40, б). На седьмые сутки наблюдения показатели в группах пациентов с ЧМТ и ЧМТ+ТСТ оказались значимо выше по сравнению с пациентами с ТСТ. У пациентов с ЧМТ+ТСТ

на 15 сутки наблюдения выявлены значимые различия в показателе по сравнению с группой с ТСТ.



Примечание – 3Д – здоровые доноры; ◇ – пациенты с ЧМТ; ○ – с ЧМТ+ТСТ; □ – с ТСТ.
* – $p < 0,05$ между пациентами с ЧМТ и ЧМТ+ТСТ; ** – $p < 0,05$ между пациентами с ЧМТ+ТСТ и ТСТ; # – $p < 0,05$ между пациентами с ЧМТ и ТСТ.

Рисунок 3.40 – Поврежденность ДНК (а), уровень атипичных (б) и «некротических» ДНК-комет (в) на различных сроках наблюдения (значения представлены как медиана со стандартным отклонением)

У здоровых доноров «некротические» ДНК-кометы не выявлены. У исследованных пациентов «некротические» ДНК-кометы наблюдались на всех сроках исследования: 0 сутки – $6,1 \pm 5,5\%$; 3 сутки – $9,7 \pm 6,1\%$; 5 сутки – $10,9 \pm 5,6\%$; 7 сутки – $10,1 \pm 4,5\%$; 15 сутки – $8,0 \pm 2,8\%$. Статистически значимые различия между группами выявлены на 15 сутки наблюдения. У пациентов с ЧМТ и ЧМТ+ТСТ показатели оказались выше по сравнению с показателем для пациентов с ТСТ (рисунок 3.40, в).

В соавторстве с Муравьевой М.Ю. и Мягковой Е.А. у пациентов с тяжелой сочетанной травмой были проведены расширенные исследования, включавшие комбинированную оценку динамики поврежденности ДНК, уровня 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина, показателей общего холестерина, холестерина ЛПНП, общего белка, печеночных ферментов АсТ и АлТ, гамма-глутамилтранспептидазы, антиоксидантного статуса и наноструктуры мембраны эритроцитов крови. Полученные результаты изложены в диссертационных исследованиях указанных соавторов [355, 356].

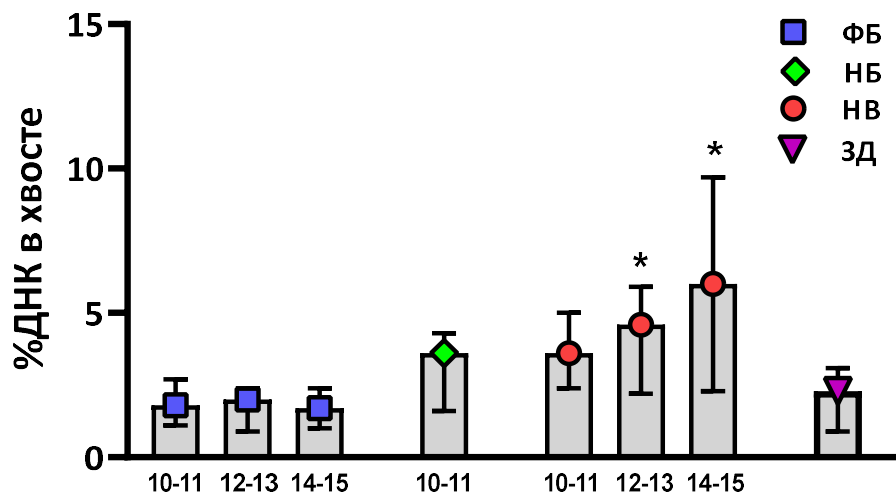
3.7.2 Оценка эндогенной генотоксичности при невынашивании беременности

Невынашивание беременности – самопроизвольное прерывание беременности на любом сроке с момента зачатия до доношенного срока, включающее неразвивающуюся беременность, самопроизвольные аборты (выкидыши) и преждевременные роды. Причинами их возникновения считаются генетические факторы, инфекции, передающиеся половым путем, нарушения эндокринной и иммунной систем, врожденные и приобретенные аномалии матки [357].

В качестве одного из факторов развития указанных патологических состояний сегодня рассматривается окислительный стресс, который может быть обусловлен как воздействием внешних неблагоприятных факторов, так и следствием генетически обусловленных особенностей системы антиоксидантной защиты матери и плода [358, 359]. Индуцированные

окислительным стрессом повреждения ДНК рассматриваются как потенциальный патогенетический фактор нарушения развития беременности [360]. Вместе с этим экспериментальные исследования в этой области на сегодня единичны и фрагментарны [360, 361]. В настоящем исследовании проведена апробация метода ДНК-комет для мониторинга эндогенно-индуцированной генотоксичности в клетках крови у пациентов с невынашиванием беременности.

Результаты исследований показали, что при физиологически протекающей беременности уровень поврежденности ДНК в клетках крови не превышает аналогичный показатель для здоровых небеременных доноров (рисунок 3.41).



Примечание – * – $p < 0,05$ при сравнении с показателем для группы пациентов ФБ (U-критерий Манна-Уитни); 10–11, 12–13 и 14–15 – недели беременности.

Рисунок 3.41 – 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

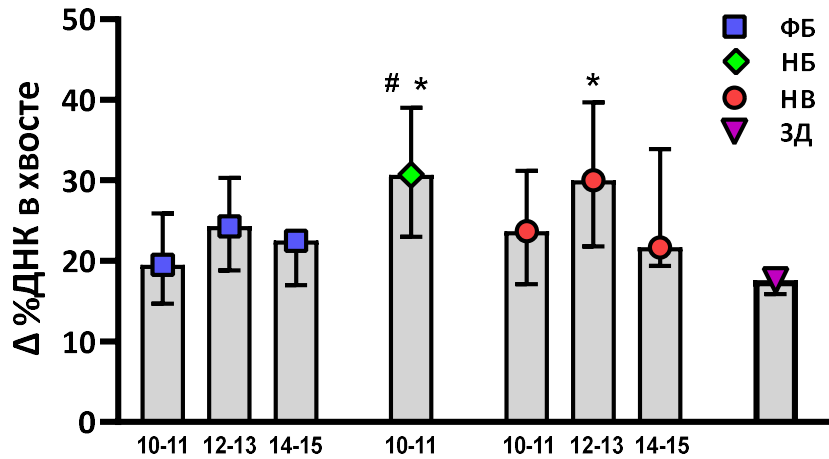
статистически значимо от соответствующего показателя для здоровых доноров ввиду высокой вариабельности значений внутри групп пациентов. В то же время у пациентов с неразвивающейся беременностью уровень повреждений ДНК оказался статистически значимо выше по сравнению с показателем для лиц с физиологически протекающей беременностью.

Перекись водорода является сильным цитотоксическим агентом, действие которого опосредовано индукцией образования высокореакционных активных форм кислорода, повреждающих практически все клеточные макромолекулы, в том числе ДНК. Устойчивость клеток к ДНК-повреждающему и цитотоксическому действию перекиси водорода может рассматриваться как показатель эффективности системы антиоксидантной защиты клеток. Целью дальнейшего исследования явилось изучение ДНК-повреждающего действия перекиси водорода на клетки крови исследованных лиц.

Для этого образцы крови отстаивали до осаждения эритроцитов, после чего 250 мкл крови, содержащей лейкоциты, центрифугировали при 1000g 10 минут. Плазму крови удаляли и клетки ресуспендировали в 250 мкл среды RPMI-1640. Отмывку клеток крови повторяли. После второй отмывки клетки ресуспендировали в 250 мкл среды RPMI-1640, добавляли H_2O_2 в конечной концентрации 100 мкМ и инкубировали 5 минут при 37°C. После инкубации клетки использовали для получения микропрепаратов ДНК-комет. В качестве показателя индукции повреждений ДНК использовали разницу в процентном содержании ДНК в хвосте до и после обработки клеток H_2O_2 – $\Delta\%$ ДНК в хвосте.

Полученные данные представлены на рисунке 3.42. 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. У пациентов с неразвивающейся беременностью этот показатель оказался статистически значимо выше по сравнению как со здоровыми донорами, так и по сравнению

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.



Примечание – * – $p < 0,05$ при сравнении с показателем для группы пациентов ФБ (U-критерий Манна-Уитни); 10–11, 12–13 и 14–15 – недели беременности.

Рисунок 3.42 – *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 cyt C. Полученные результаты изложены в диссертационном исследовании соавтора [362].

3.8 Исследование эндогенной генотоксичности у пациентов с системной красной волчанкой и возможности ее антигенотоксической коррекции

Системная красная волчанка (СКВ) – хроническое полисиндромное заболевание группы диффузных болезней соединительной ткани, патогенетическую основу которого составляет генерализованная дисфункция иммунной системы. Утрата иммунологической толерантности с гиперпродукцией широкого спектра аутоантител, формирующих циркулирующие иммунные комплексы, приводит к системному повреждению эндотелия сосудов, базальных мембран и паренхимы органов [363]. Исследования молекулярных механизмов патогенеза СКВ показали, что связанная с системным воспалительным процессом избыточная продукция АФК и снижение эффективности антиоксидантной системы защиты приводит к окислительной модификации липидов, белков и ДНК, потенцируя иммунологические нарушения и усугубляя манифестацию заболевания [364, 365].

Окислительная модификация молекулы ДНК АФК приводит к изменению ее антигенных свойств [366]. Высокие иммуногенные свойства установлены для 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина (8-oxodG) – основного продукта окислительной модификации оснований ДНК [367]. Так, у пациентов с СКВ уровень 8-oxodG в ДНК лимфоцитов значительно превышает аналогичный показатель для здоровых людей, а его содержание в ДНК иммунных комплексов плазмы крови пациентов с СКВ более чем в 100 раз выше, чем в ядерной ДНК [368]. Совокупный анализ этих данных позволил специалистам рассматривать окислительную модификацию ДНК как один из факторов патогенеза СКВ [364].

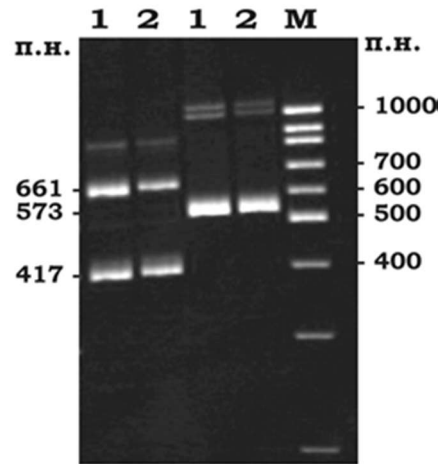
Методом ДНК-комет оценена поврежденность ДНК в клетках крови у пациентов с СКВ и в клиническом исследовании изучена возможность ее антигенотоксической коррекции введением в стандартную терапию

экспериментально охарактеризованного лекарственного антигенотоксиканта фабомотизола [369].

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

Помимо повреждения ДНК в результате окислительного стресса увеличенный уровень 8-оходG в ДНК клеток крови пациентов с СКВ может являться следствием нарушения его репарации. Косвенным подтверждением этому могут служить многочисленные экспериментальные данные о нарушении процессов репарации ДНК при СКВ, а также данные о повышенной чувствительности клеток к прооксидантным воздействиям [379]. Предполагая возможные нарушения репарации окислительно-модифицированных оснований ДНК в клетках пациентов с СКВ, методом полуколичественной ПЦР с обратной транскрипцией исследована экспрессия гена *hOGG1*, кодирующего фермент эксцизионной репарации окисленного гуанина – 8-оксигуанин-ДНК-гликозилазу (*hOGG1*).

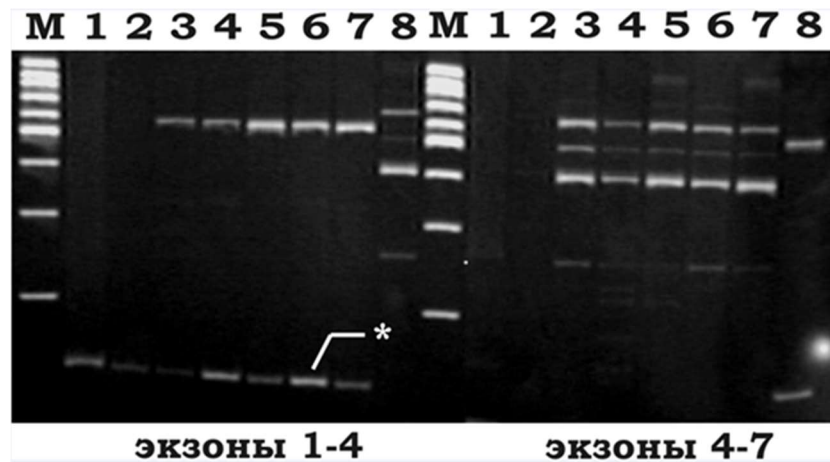
Ген *hOGG1* содержит восемь экзонов и кодирует две группы родственных изоформ белка – α -*hOGG1* и β -*hOGG1* [371]. В результате альтернативного сплайсинга первичного транскрипта образуется восемь типов мРНК: 1a–c (α -*hOGG1*) и 2a–e (β -*hOGG1*). На рисунке 3.43 представлен пример амплификации экзонов 1–4 (фрагмент 1) и экзонов 4–7 (фрагмент 2) гена *hOGG1* у здоровых доноров. Экзоны 1–4 (амплификационный фрагмент 573 п.н.) являются общими для всех изоформ белка. Продукт амплификации 417 п.н. экзонов 4–7 соответствуют типу мРНК 1a, продукт амплификации 661 п.н. – типу мРНК 1b.



Примечание – М – маркер молекулярной массы; п.н. – пар нуклеотидов.

Рисунок 3.43 – Амплификация экзонов 1–4 и 4–7 мРНК гена *hOGG1* у здоровых доноров 1 и 2

У 9 из 18 исследованных пациентов выявлены нарушения экспрессии гена *hOGG1*. У пациентов 1 и 2 (рисунок 3.44) исследуемая мРНК не выявлялась ни при амплификации для полуколичественной оценки (27 циклов), ни при амплификации для DGGE-анализа (35 циклов).



Примечание – М – маркер молекулярной массы; * - амплификация мРНК β -актина.

Рисунок 3.44 – Амплификация экзонов 1–4 и 4–7 мРНК гена *hOGG1* у пациентов 1–8

У пациентов 14 (рисунок 3.45), 17 и 18 (рисунок 3.46) при 27 циклах амплификации мРНК также не детектировалась, однако при 35 циклах

амплификации получен слабый амплификационный сигнал, достаточный для проведения DGGE-анализа. У четырех пациентов снижение экспрессии выявлено для экзонов 4–7. У пациентов 11 и 16 наблюдалось снижение относительного уровня мРНК для экзонов 4–7 при нормальном уровне мРНК, для экзонов 1–4 (в 2–3 раза по сравнению с нормальным соотношением). 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.

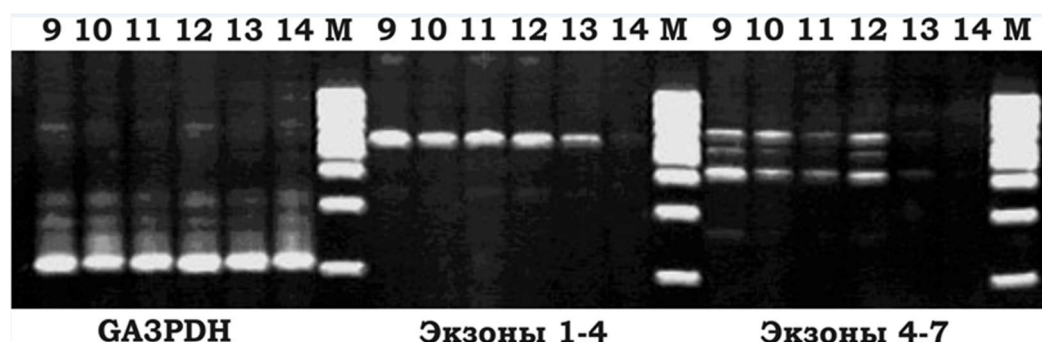


Рисунок 3.45 – Амплификация экзонов 1–4 и 4–7 мРНК гена *hOGG1* у пациентов 9–14

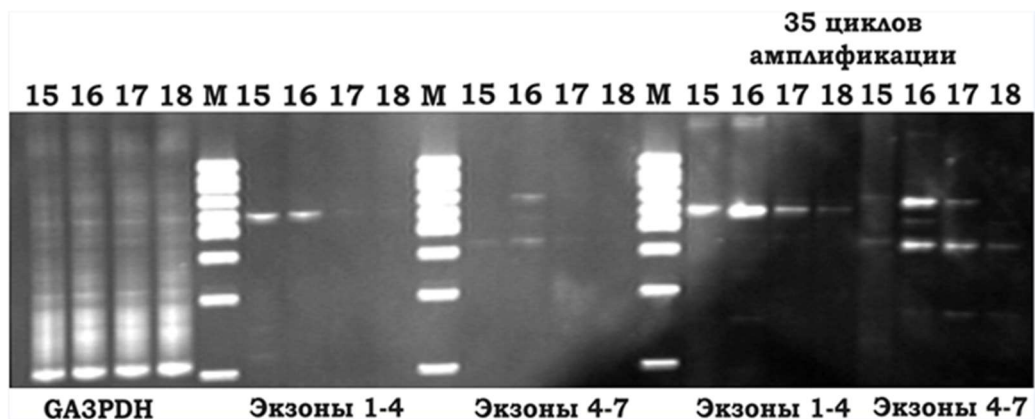


Рисунок 3.46 – Амплификация экзонов 1–4 и 4–7 мРНК гена *hOGG1* у пациентов 15–18

DGGE-анализ ни у одного из пациентов не выявил изменений в первичной последовательности экзонов 1–4 и 4–7 мРНК *hOGG1* (рисунок 3.47), за исключением пациентов 1 и 2, для которых DGGE-анализ не проводился вследствие отсутствия экспрессии исследуемой мРНК.

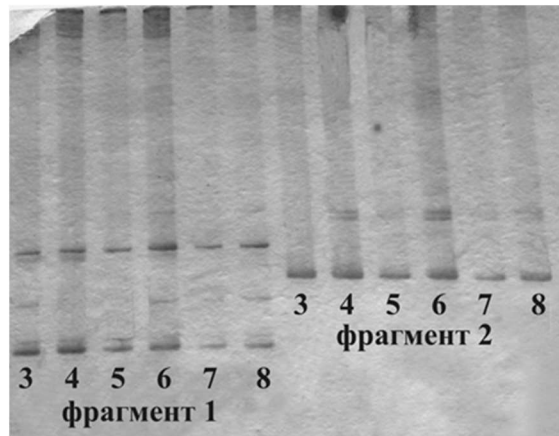


Рисунок 3.47 – DGGE-анализ амплифицированных экзонов 1–4 (фрагмент 1) и 4–7 (фрагмент 2) мРНК гена *hOGG1* у пациентов 3,4,5,6,7,8

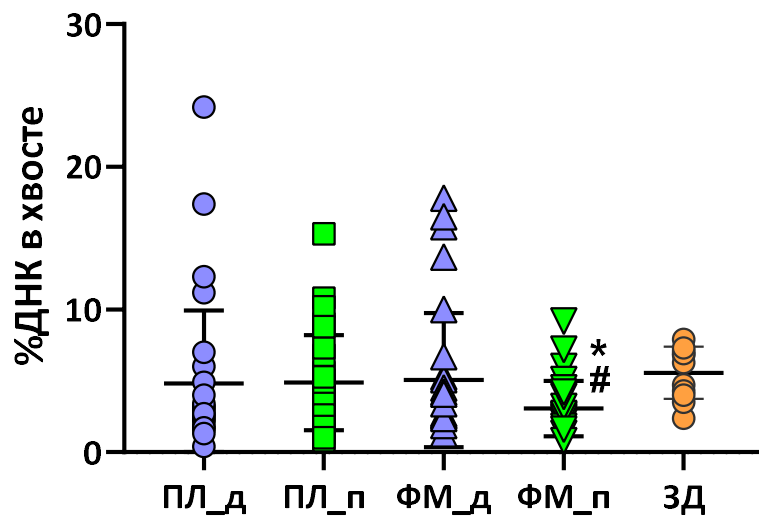
Полученные данные свидетельствуют о нарушении экспрессии гена *hOGG1* в клетках периферической крови пациентов с СКВ – от снижения экспрессии до полного ее отсутствия. У пяти пациентов нарушения выявлены для обоих анализируемых фрагментов мРНК гена *hOGG1*, однако у четырех пациентов наблюдалось значительное снижение уровней мРНК для экзонов 4–7 при нормальном уровне для экзонов 1–4. Данный факт может свидетельствовать о том, что нарушение экспрессии затрагивает в первую очередь α -hOGG1 изоформы белка (1a и 1b). Именно α -hOGG1 белки обладают 8-охоG-гликозилазной активностью и отвечают за репарацию как ядерной, так и митохондриальной ДНК, тогда как роль β -hOGG1 остается неясной [372].

3.8.2 Эндогенная генотоксичность у пациентов с СКВ и ее антигенотоксическая коррекция

У пациентов с СКВ до назначения терапии средние показатели поврежденности ДНК составили $4,8 \pm 5,1$ (от 0,4 до 24,2) и $5,1 \pm 4,7$ (от 1,3 до 17,8) %ДНК в хвосте соответственно для групп пациентов, принимавших плацебо и фабомотизол. Между группами пациентов и здоровыми донорами статистически значимых различий не выявлено.

По окончании терапии средний показатель поврежденности ДНК в группе пациентов с СКВ, принимавших плацебо, составил $4,9 \pm 3,3$ %ДНК в

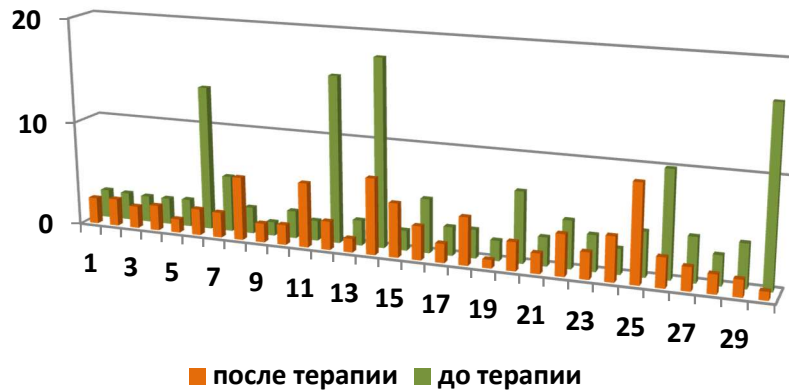
хвосте (рисунок 3.48), что не отличалось от показателя до начала терапии ($4,8 \pm 5,1$ %ДНК в хвосте). В группе пациентов с СКВ, принимавших фабомотизол, после терапии показатель поврежденности ДНК статистически значимо снизился до уровня $3,1 \pm 2,0$ %ДНК в хвосте. При этом показатель оказался статистически значимо ниже аналогичного для группы пациентов, принимавших плацебо ($p < 0,001$).



Примечание – * – $p < 0,001$ при сравнении с соответствующим показателем до терапии (критерий Уилкоксона); # – $p < 0,001$ при сравнении с показателем для группы пациентов после приема плацебо (U-критерий Манна-Уитни).

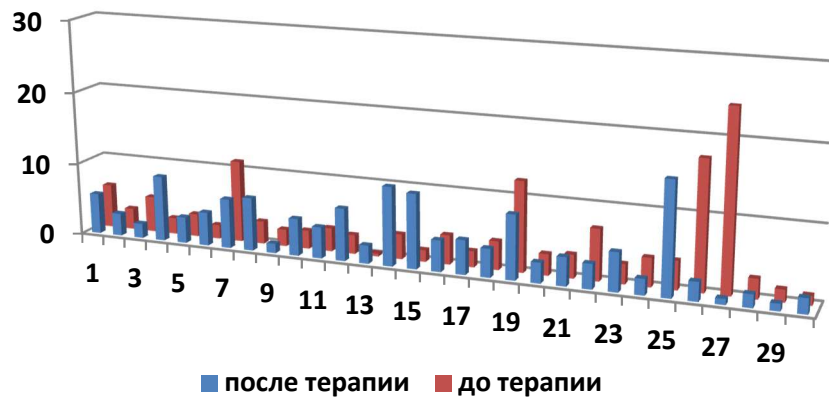
Рисунок 3.48 – Поврежденность ДНК клеток крови пациентов с СКВ до терапии (ПЛ_д и ФМ_д), после терапии (ПЛ_п и ФМ_п) и здоровых доноров (ЗД). ПЛ – группа пациентов, принимавших плацебо; ФМ – группа пациентов, принимавших фабомотизол

Анализ распределения показателя повреждений ДНК у отдельных пациентов до и после соответствующей терапии показал, что в группе пациентов с назначением фабомотизола у 18 из 30 пациентов наблюдается снижение повреждений ДНК, в том числе у пациентов, имеющих изначально высокий показатель, тогда как у 4 наблюдалось повышение (рисунок 3.49). Из пациентов, принимавших плацебо, у 9 наблюдалось снижение, тогда как у 11 – увеличение поврежденности ДНК (рисунок 3.50).



Примечание – по оси Y – %ДНК в хвосте; по оси X – номер пациента.

Рисунок 3.49 – Индивидуальные показатели поврежденности ДНК клеток крови пациентов с СКВ, принимавших фабомотизол

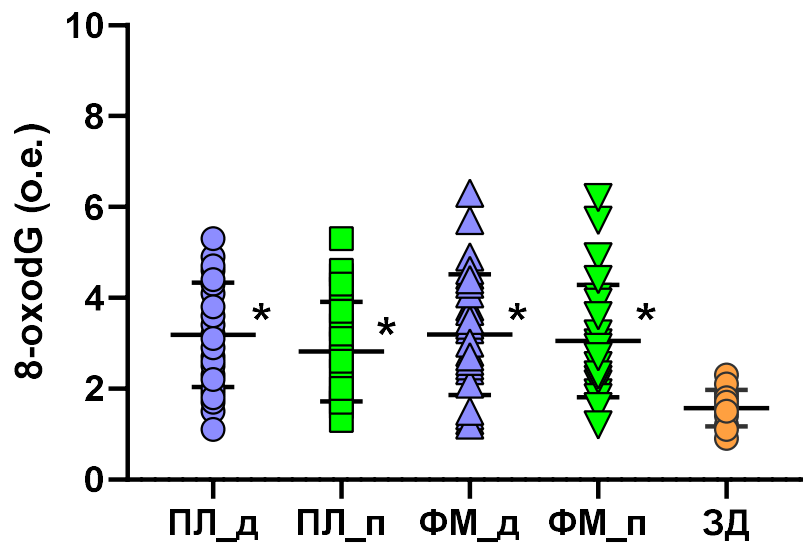


Примечание – по оси Y – %ДНК в хвосте; по оси X – номер пациента.

Рисунок 3.50 – Индивидуальные показатели поврежденности ДНК клеток крови пациентов с СКВ, принимавших плацебо

У пациентов с СКВ 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., соответственно для пациентов на плацебо и с назначением фабомотизола (рисунок 3.51). Между группами пациентов до назначения терапии статистически значимых различий не выявлено, однако показатели в обоих случаях статистически значимо превышали значение для здоровых добровольцев $1,6 \pm 0,4$ (от 0,9 до 2,3) о.е. По окончании терапии средний

показатель содержания 8-охоG в группе пациентов, принимавших плацебо, составил $2,8 \pm 1,1$ о.е., что не отличалось от аналогичного показателя до начала терапии ($3,2 \pm 1,2$ о.е.). Аналогично в группе пациентов с назначением фабомотизола не выявлено статистически значимых различий в оцениваемом показателе до и после проведения терапии ($3,2 \pm 1,3$ против $3,1 \pm 1,2$ о.е. соответственно). В обоих случаях показатели оставались выше значения для здоровых доноров.



Примечание – * – $p < 0,001$ при сравнении с группой здоровых доноров (U-критерий Манна-Уитни).

Рисунок 3.51 – Уровень 8-охоdG в ДНК клеток крови пациентов с СКВ до терапии (ПЛ_д и ФМ_д), после терапии (ПЛ_п и ФМ_п) и здоровых доноров (ЗД). ПЛ – группа пациентов, принимавших плацебо; ФМ – группа пациентов, принимавших фабомотизол

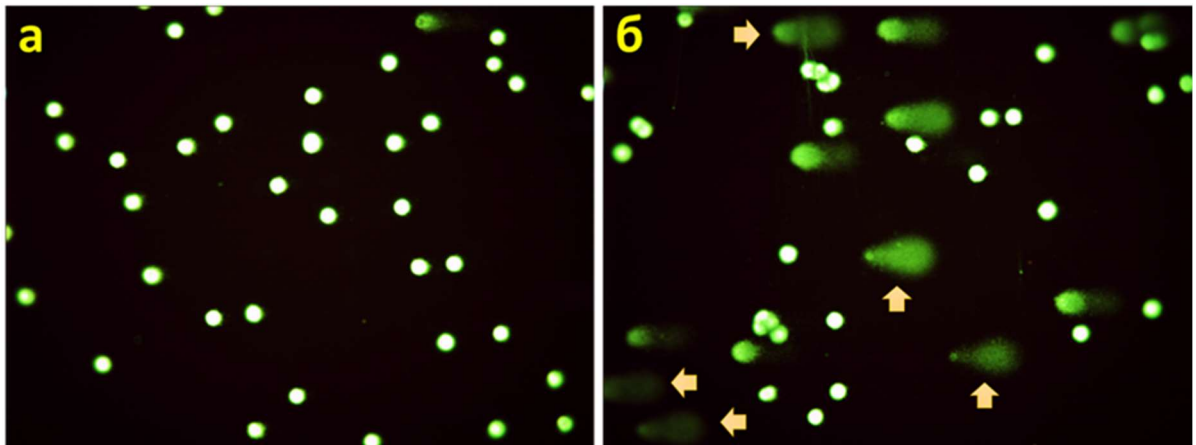
3.8.3 Анализ устойчивости клеток к повреждающему ДНК и цитотоксическому действию перекиси водорода у пациентов с СКВ

Традиционно в модельных системах для индукции повреждений ДНК в клетках перекись водорода используется в конечной концентрации 100 мкМ. Однако предварительные исследования показали, что в указанной концентрации перекись водорода приводит к гибели до 60% клеток крови пациентов с СКВ, что затрудняет проведение анализа. Исходя из этих данных,

для исследований нами была выбрана концентрация перекиси водорода 40 мкМ, при которой ее цитотоксический эффект *ex vivo* в клетках крови пациентов с СКВ не превышал 20%.

Образцы крови отстаивали до осаждения эритроцитов, после чего 250 мкл крови, содержащей лейкоциты, центрифугировали при 1000g 10 минут. Плазму крови удаляли и клетки ресуспендировали в 250 мкл среды RPMI-1640. Отмывку клеток крови повторяли. После второй отмывки клетки ресуспендировали в 250 мкл среды RPMI-1640, добавляли H_2O_2 в конечной концентрации 40 мкМ и инкубировали 5 минут при 37°C. После инкубации клетки использовали для получения микропрепаратов ДНК-комет. В качестве показателя индукции повреждений ДНК использовали разницу в процентном содержании ДНК в хвосте до и после обработки клеток H_2O_2 – $\Delta\%$ ДНК в хвосте. Отдельно подсчитывался уровень атипичных ДНК-комет на 500 проанализированных ДНК-комет.

На рисунке 3.52 приведены примеры цифровых изображений ДНК-комет клеток крови пациента с СКВ до и после обработки H_2O_2 .

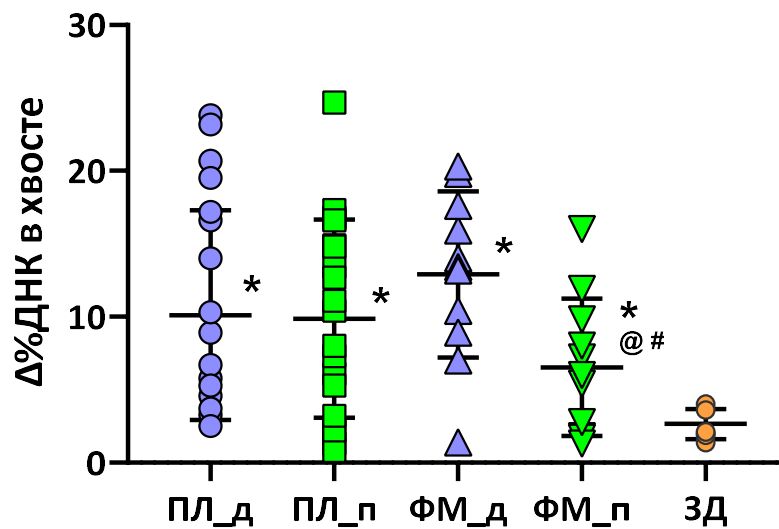


Примечание – стрелками отмечены атипичные ДНК-кометы.

Рисунок 3.52 – Цифровые изображения с микропрепаратов ДНК-комет клеток крови пациента с СКВ до (а) и после (б) обработки H_2O_2

У всех пациентов с СКВ до начала терапии обработка клеток крови H_2O_2 приводила к увеличению поврежденности ДНК до $10,1 \pm 7,1$ (от 2,5 до 23,8) и до $9,9 \pm 6,8$ (от 1,4 до 20,3) $\Delta\%$ ДНК в хвосте соответственно для пациентов с

назначением плацебо и фабомотизола (рисунок 3.53). Между группами пациентов статистически значимых различий не выявлено. В обоих случаях показатели оказались статистически значимо выше показателя для здоровых доноров – $2,7 \pm 1,0$ (от 1,4 до 4,0). По окончании терапии средний показатель H_2O_2 -индуцируемых повреждений ДНК в группе пациентов, принимавших плацебо, составил $9,9 \pm 6,8$ %ДНК в хвосте, что не отличалось от показателя до начала проведения терапии.

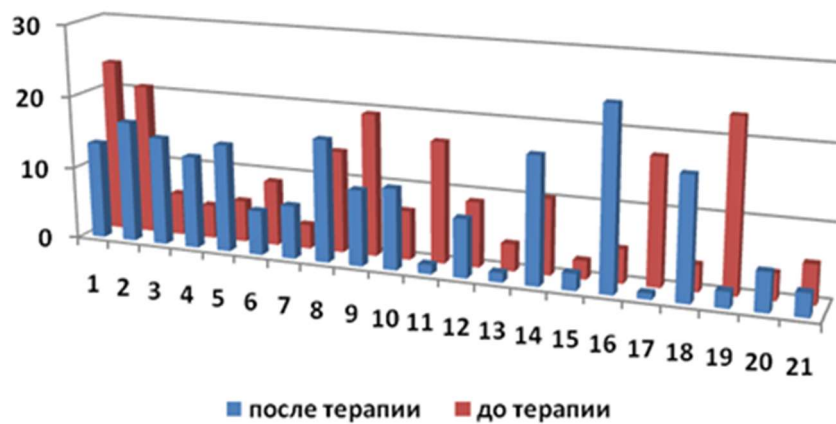


Примечание – * – $p < 0,001$ при сравнении с группой здоровых доноров (U-критерий Манна-Уитни); # – $p < 0,001$ при сравнении с показателем до терапии (Критерий Уилкоксона); @ – $p = 0,01$ при сравнении с показателем для группы пациентов после приема плацебо (U-критерий Манна-Уитни).

Рисунок 3.53 – *ex vivo* H_2O_2 -индуцируемая 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). ПЛ – группа пациентов, принимавших плацебо; ФМ – группа пациентов, принимавших фабомотизол

В группе пациентов с назначением фабомотизола после проведения терапии показатель индуцированной поврежденности ДНК статистически значимо снизился до уровня $6,5 \pm 4,6$ Δ%DНК в хвосте. При этом показатель оказался статистически значимо ниже аналогичного для группы пациентов на плацебо ($p < 0,01$).

Анализ индивидуальных показателей $\Delta\%$ ДНК в хвосте у пациентов до и после соответствующей терапии показал, что в группе пациентов на плацебо у 9 из 21 наблюдалось снижение устойчивости к повреждающему действию перекиси водорода, у 7 пациентов наоборот – увеличение устойчивости (рисунок 3.54).

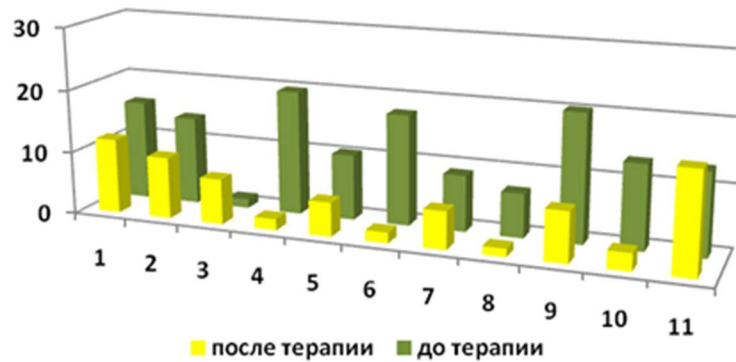


Примечание – по оси Y – $\Delta\%$ ДНК в хвосте; по оси X – номер пациента.

Рисунок 3.54 – Индивидуальные показатели H_2O_2 -индуцируемой поврежденности ДНК клеток крови пациентов с СКВ, принимавших плацебо

В группе пациентов с назначением фабомотизола снижение уровня индуцируемых H_2O_2 повреждений ДНК наблюдалось у 9 из 11 пациентов, лишь у одного наблюдалось снижение устойчивости к действию перекиси водорода (рисунок 3.55).

Далее была проведена оценка влияния терапии на устойчивость клеток крови к цитотоксическому действию перекиси водорода, оцениваемому по количеству атипичных ДНК-комет после обработки перекисью водорода.

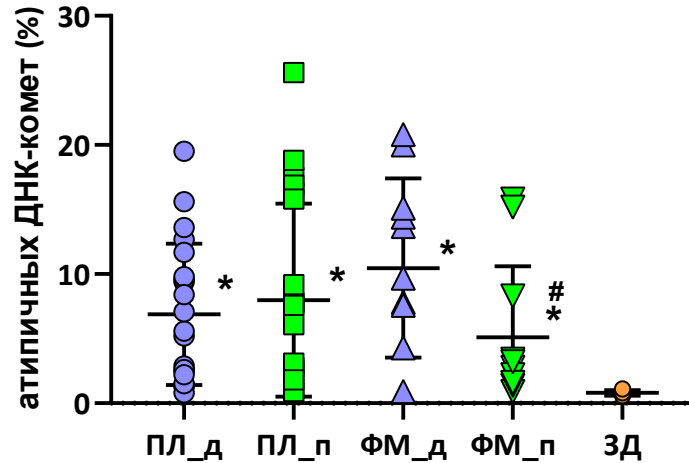


Примечание – по оси Y – $\Delta\%$ ДНК в хвосте; по оси X – номер пациента.

Рисунок 3.55 – Индивидуальные показатели H_2O_2 -индуцируемой поврежденности ДНК клеток крови пациентов с СКВ, принимавших фабомотизол

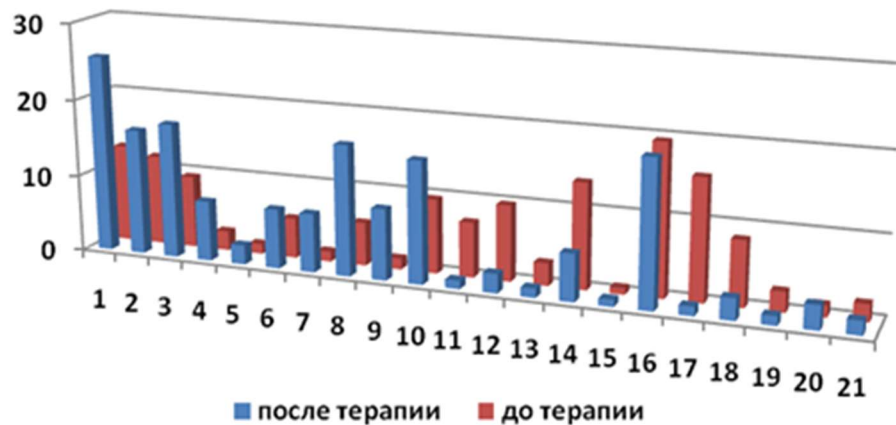
До начала терапии уровень индуцируемых H_2O_2 атипичных ДНК-комет составил в среднем $6,9 \pm 5,5$ (от 0,8 до 19,5%) и $10,5 \pm 6,9$ (от 0,9 до 20,8%) соответственно для пациентов с назначением плацебо и фабомотизола. Между группами пациентов до назначения терапии статистически значимых различий не выявлено (рисунок 3.56). В обоих случаях показатели оказались статистически значимо выше показателя для здоровых доноров – $0,8 \pm 0,2$ (от 0,5 до 1,1%).

Анализ индивидуальных уровней атипичных ДНК-комет у пациентов до и после соответствующей терапии показал, что в группе пациентов, принимавших плацебо, у 10 из 21 наблюдалось снижение устойчивости к цитотоксическому действию H_2O_2 , у 7 пациентов – увеличение устойчивости (рисунок 3.57).



Примечание – * – $p < 0,001$ при сравнении с группой здоровых доноров (U-критерий Манна-Уитни); # – $p < 0,001$ при сравнении с соответствующим показателем до терапии (критерий Уилкоксона).

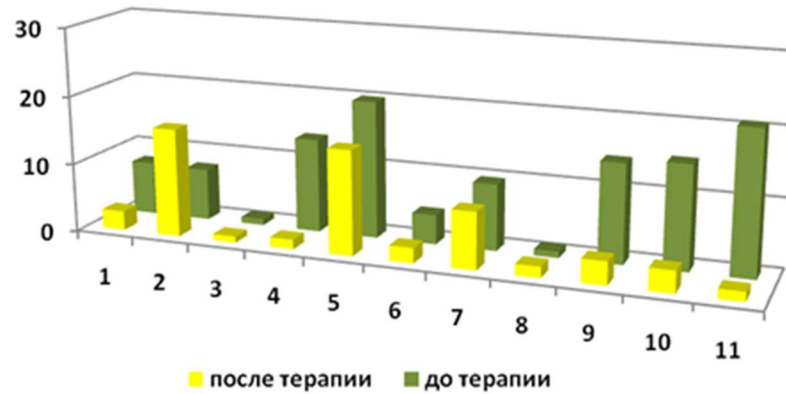
Рисунок 3.56 – Уровень атипичных ДНК-комет, индуцируемых H_2O_2 *ex vivo* в образцах крови пациентов с СКВ до терапии (ПЛ_д и ФМ_д), после терапии (ПЛ_п и ФМ_п) и здоровых доноров (ЗД). ПЛ – группа пациентов, принимавших плацебо; ФМ – группа пациентов, принимавших фабомотизол



Примечание – по оси Y – уровень атипичных ДНК-комет (%); по оси X – номер пациента.

Рисунок 3.57 – Индивидуальные показатели уровня атипичных ДНК-комет, индуцируемых H_2O_2 *ex vivo* в образцах крови пациентов с СКВ, принимавших плацебо

В группе пациентов с назначением фабомотизола увеличение устойчивости к цитотоксическому действию перекиси водорода наблюдалось у 7 из 11 пациентов, тогда как лишь у одного наблюдалось снижение устойчивости (рисунок 3.58).



Примечание – по оси Y – уровень атипичных ДНК-комет (%); по оси X – номер пациента.

Рисунок 3.58 – Индивидуальные показатели уровня атипичных ДНК-комет, индуцируемых H_2O_2 *ex vivo* в образцах крови пациентов с СКВ, принимавших фабомотизол

Обсуждение

У двух пациентов с СКВ выявлено отсутствие экспрессии мРНК гена *hOGG1* во всех исследованных типах клеток периферической крови, у 7 пациентов значительное ее снижение. Ряд экспериментальных данных о сниженной репаративной способности и высокой чувствительности различных типов клеток пациентов с СКВ к прооксидантным воздействиям позволяет предполагать, что нарушение экспрессии этого гена наблюдается и в других клетках организма [373]. Более развернутое изучение данного вопроса, в том числе с исследованием экспрессии других генов, отвечающих за репарацию окислительных повреждений ДНК, может внести определенный вклад в понимание механизмов системности заболевания.

Сравнительный анализ клинических данных не выявил значимых различий между показателями активности заболевания у пациентов с

нормальным уровнем мРНК гена *hOGG1* и пациентов с нарушением экспрессии гена. Не выявлено корреляции между тяжестью течения заболевания и степенью подавления экспрессии гена. В работе Bashir S. и др. также не было обнаружено корреляции уровней 8-oxodG в ДНК клеток крови с активностью и длительностью заболевания [370]. В настоящий момент лишь предположительно можно рассуждать о причинах отсутствия подобных корреляций. В частности, всем пациентам на момент исследования проводилась иммуносупрессивная терапия метилпреднизолоном и циклофосфамидом, что могло сказаться на оцениваемых показателях, в том числе оказать влияние на экспрессию исследуемого гена. С этой точки зрения наибольший интерес для дальнейших исследований представляют больные с вновь выявленной СКВ до назначения им терапии.

Нарушение экспрессии гена *hOGG1* и связанное с этим нарушение репарации ДНК, наряду с окислительным стрессом, может рассматриваться как один из главных факторов повышения уровня окислительных повреждений ДНК при СКВ. В подтверждение этого установлено, что содержание 8-oxoG в ДНК клеток крови у пациентов с СКВ более чем 1,8 раза превышает значения, наблюдаемые у здоровых доноров.

Сравнение среднегрупповых значений поврежденности ДНК не выявило статистически значимых различий между пациентами с СКВ и здоровыми донорами ввиду высокой вариабельности показателя среди пациентов. Вместе с тем анализ индивидуальных данных в обеих исследованных группах до начала терапии демонстрирует у части пациентов значительно более высокие по сравнению со среднегрупповыми значениями показатели поврежденности ДНК. В группе пациентов, принимавших фабомотизол, у большей части наблюдалось снижение повреждений ДНК, в том числе у пациентов, имеющих изначально высокий показатель. В итоге в среднем по группе показатель поврежденности ДНК после терапии статистически значимо снизился по сравнению с началом терапии и, более того, оказался статистически значимо ниже среднегруппового показателя для пациентов, принимавших плацебо.

Не выявлено значимого влияния включения фабомотизола в стандартную терапию на уровень 8-охоG в ДНК клеток. Показатель в обеих группах пациентов не отличался до и после терапии и оставался значительно выше значения для здоровых доноров. В совокупности с данными первой серии исследований полученные результаты позволяют утверждать, что наблюдаемый в ДНК клеток крови пациентов с СКВ высокий уровень 8-охоG обусловлен, преимущественно, нарушением его репарации. В этом случае очевидно, что применение соединений с антиоксидантной активностью может снизить его уровень, однако лишь до определенной степени.

Для клеток крови пациентов с СКВ выявлена экстремально высокая чувствительность к прооксидантным воздействиям, свидетельствующая о снижении у них эффективности систем антиоксидантной защиты. Полученные данные нашли подтверждение в недавних исследованиях [374]. В группе пациентов, принимавших фабомотизол, у 9 из 11 пациентов выявлено увеличение устойчивости к повреждающей ДНК активности H_2O_2 , а также к ее цитотоксической активности, что выражалось в снижении индукции атипичных ДНК-комет. В группе пациентов, получавших плацебо, таких эффектов не выявлено. Полученные данные позволяют предполагать, что введение фабомотизола в стандартную терапию СКВ позволяет повысить декомпенсированную окислительным стрессом систему антиоксидантной защиты в клетках.

Заключение

Введение в стандартную терапию СКВ лекарственного антигенотоксиканта фабомотизола способствует снижению наблюдаемой в клетках крови пациентов поврежденности ДНК и увеличивает устойчивость клеток к прооксидантному, цито- и генотоксическому воздействию перекиси водорода. Полученные данные определяют перспективность дальнейших исследований по поиску и разработке эффективных средств коррекции состояния эндогенной генотоксичности у пациентов с СКВ.

ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При концептуальной разработке методологии необходимым условием для решения задач и достижения поставленной цели является наличие соответствующего методического «инструмента». Таким «инструментом» в настоящем диссертационном исследовании стал метод ДНК-комет. Ключевыми требованиями к любому методу являются точность и воспроизводимость. Для метода ДНК-комет серьезной проблемой оставалась значительная вариабельность данных, как внутрилабораторная – внутри- и между сериями экспериментов, так и межлабораторная.

В результате проведенных исследований установлено, что основной вклад в вариабельность данных, получаемых методом ДНК-комет, вносят различия в двух экспериментальных технических параметрах – температурных условиях проведения этапа щелочной денатурации и электрофореза, и напряженности электрического поля в ходе электрофореза. Для снижения межлабораторной вариабельности данных перед проведением экспериментов для конкретной электрофоретической камеры следует эмпирически определить напряжение, обеспечивающее заданные значения напряженности электрического поля. Для снижения внутрилабораторной вариабельности данных необходимо строго унифицировать температурные условия проведения этапов щелочной денатурации и электрофореза, в том числе с помощью рециркуляции электрофорезного раствора. В совокупности с унификацией остальных экспериментальных условий (концентрация агарозного геля, длительность лизиса, щелочной денатурации и электрофореза) это обеспечивает меж- и внутрилабораторную сходимость и воспроизводимость данных, полученных с использованием метода ДНК-комет. Указанные критические методические моменты отражены в

утвержденных методических рекомендациях по оценке генотоксичности *in vitro* и *in vivo* методом ДНК комет.

Актуальной, но нерешенной методической проблемой в системе оценки генотоксичности лекарственных средств, остается ее регистрация в половых клетках. В настоящее время для этой цели применяются ряд валидированных методов, однако каждый из них имеет определенные недостатки, одним из которых является ограниченность экспериментальных тест-объектов только самцами. Это актуализирует необходимость внедрения новых высокочувствительных методов оценки генотоксических повреждений в половых клетках как самцов, так и самок.

Для решения указанной задачи предложены методические приемы регистрации повреждений ДНК в ооцитах, сперматозоидах и одно- и двухклеточных эмбрионах экспериментальных животных методом ДНК-комет. Установлено, что ввиду особенностей морфологии ооцитов и структуры хроматина сперматозоидов оценка повреждений ДНК в этих клетках методом ДНК-комет сопряжена с методическими сложностями, которые ограничивают чувствительность метода, что является важным показателем для детекции низкоуровневых генотоксических воздействий. В то же время показано, что индуцируемые в ооцитах животных повреждения ДНК могут быть успешно выявлены методом ДНК-комет у полученных от них одно- и двухклеточных эмбрионов. Такой методологический подход имеет одно важное преимущество. Согласно регуляторным требованиям, в случае выявления у лекарственных средств-кандидатов генотоксичности в стандартных тестах *in vivo* целесообразность их дальнейшей разработки и применения определяется на основе оценки «польза-риск», включающей изучение потенциальных генотоксических рисков для потомства, что особо актуально в случае лекарственных средств, предполагаемых к применению по жизненным показаниям. Использование для этих целей метода ДНК-комет в предимплантационных эмбрионах экспонированных животных позволяет

релевантно оценить такие риски, поскольку регистрирует генотоксические эффекты, миновавшие «мейотический» фильтр.

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 двух случаях генотоксичность установлена только методом ДНК-комет, в одном случае и методом ДНК-комет, и в цитогенетическом тесте. Показано, что модификация метода ДНК-комет с применением ферментов репарации ДНК значительно повышает чувствительность тестирования.

В результате исследований выявлены ранее неизвестные, регистрируемые на уровне первичных повреждений ДНК генотоксические эффекты морфина, характеризующиеся тканеспецифичностью и зависимостью от режима применения. Это указывает на необходимость дальнейшего развернутого исследования морфина и других опиатов на генотоксическую активность. Имеющиеся в литературе сведения о генотоксичности парацетамола не получили подтверждения, что проясняет ситуацию с неоднозначными данными о генотоксичности этого лекарственного средства.

На основе опыта экспериментальных исследований с применением ДНК-комет разработана серия методических рекомендаций и методические указания по оценке генотоксичности *in vitro* и *in vivo* методом ДНК-комет в щелочной версии.

Уникальные свойства наноматериалов, определяющие их эффективность, могут одновременно являться источником непредсказуемых биологических эффектов. Отличительные особенности проявления эффектов наноматериалов определяют необходимость оптимизации существующей методологии оценки их генотоксичности, в том числе внедрением

чувствительных методов, позволяющих оценить потенциальные эффекты в органах/тканях, являющихся первичной мишенью воздействия наноматериалов или способных их накапливать. Решением может служить применение метода ДНК-комет.

В экспериментах *in vivo* нанокристаллы кремния и катионные липосомальные частицы продемонстрировали тканеспецифичную генотоксическую активность, выявляемую методом ДНК-комет, но не методом учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга. Таким образом экспериментально продемонстрировано, что применение только цитогенетических тестов *in vivo* при исследовании генотоксичности лекарственных средств на основе наноматериалов может приводить к получению ложноотрицательных результатов и недооценке рисков. Это определяет приоритетность использования для этой цели метода ДНК-комет, позволяющего оценивать генотоксические эффекты в различных органах/тканях. Полученные данные обосновывают также целесообразность использования в качестве тест-системы для исследования генотоксических свойств наноматериалов в экспериментах *in vitro* клеток цельной периферической крови.

Эндогенная генотоксичность выявлена при многих патологиях и патологических состояниях человека. Очевидно, как и при экзогенном генотоксическом воздействии, эндогенная генотоксичность, в зависимости от заболевания и патологического состояния, характеризуется органо- и тканеспецифичностью. Сведения о последней важны для поиска и разработки эффективных антигенотоксикантов.

Выявленные эндогенные генотоксические эффекты при стрептозоцин-индуцированном диабете и перинатальной иммунной активации расширяют текущие представления о генотоксическом статусе указанных моделей. Полученные данные не только обосновывают целесообразность углубленных исследований в этой области, но и формируют экспериментальную базу для целенаправленного поиска средств фармакологической и/или

нутрициологической коррекции генотоксических эффектов при исследованных патологиях и патологических состояниях. Полученные на модели АКМП результаты определяют перспективность дальнейших углубленных исследований, направленных на изучение роли и механизмов клеточной гибели в функционировании миокарда с целью поиска новых фармакологических мишеней и разработки средств терапии АКМП и других сердечно-сосудистых патологий.

Определение органо- и тканеспецифичности эффектов не менее актуально в исследованиях антигенотоксичности. Анализ накопленного экспериментального материала показывает, что подавляющее большинство *in vivo* исследований проводятся сегодня методом цитогенетического анализа в клетках костного мозга мышей. В то же время недостаточность сведений о тканеспецифичности действия антигенотоксикантов является существенным препятствием к их практическому внедрению для защиты генома человека. Оценка органо- и тканеспецифичности действия при разработке лекарственных антигенотоксикантов позволит не только всесторонне охарактеризовать их эффективность и безопасность, но и определит наиболее перспективные «адреса» их применения.

В экспериментах с бетаином, бетанином, апигенином, нарингенином и гесперетином методом ДНК-комет показано, что антигенотоксические эффекты этих соединений характеризуются выраженной органо- и тканеспецифичностью. На основе полученных данных впервые предложен принцип таргетного антимуtagenеза – направленной защиты определенных органов и тканей организма. Так, анализ профиля тканеспецифичности эффектов бетанина и апигенина позволяет рекомендовать их разработку в качестве лекарственных средств сопроводительной терапии, предназначенных для направленной протекции нецелевых органов/тканей от цито- и генотоксических воздействий при противоопухолевой терапии. Перспективной представляется разработка нарингенина и гесперетина, а

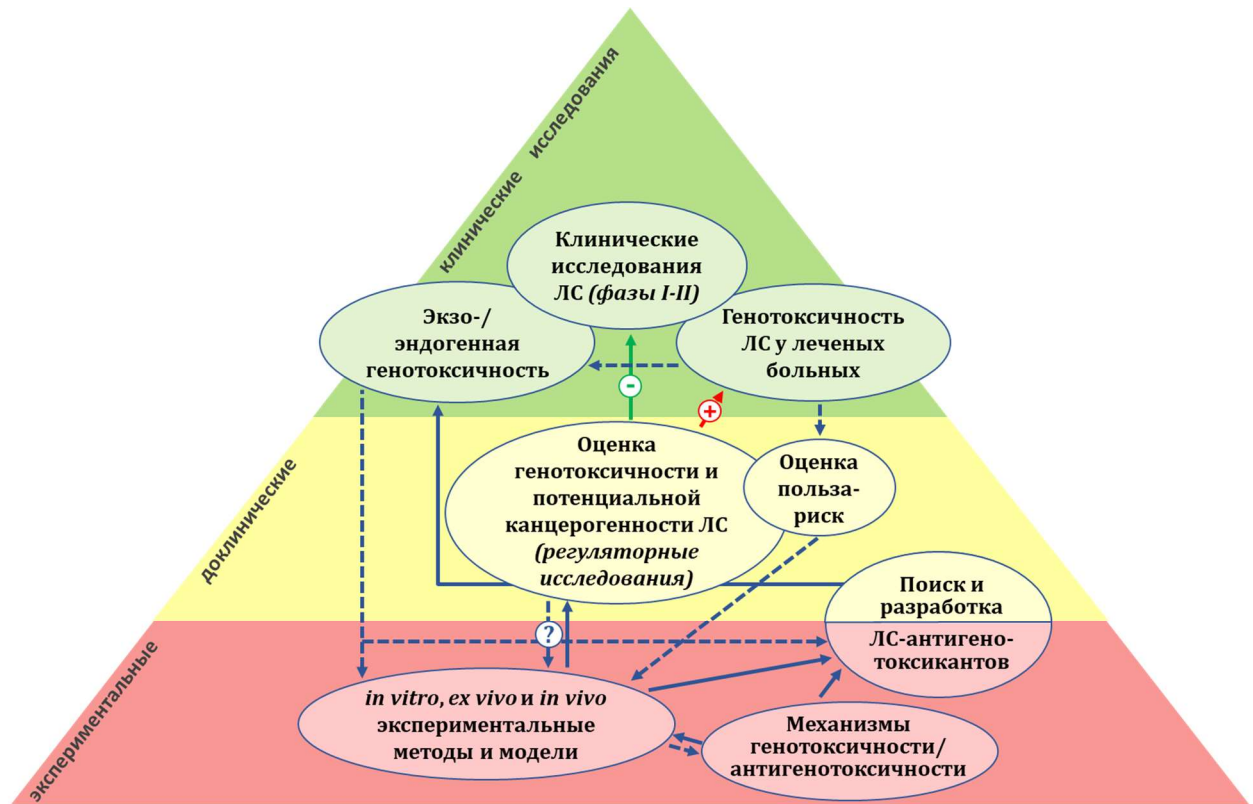
также их вновь синтезированных производных, в качестве лекарственных средств с нейропротекторной активностью.

Оценка эффективности разрабатываемых лекарственных средств-антигенотоксикантов в клинических исследованиях также требует высокочувствительного метода для детекции и мониторинга эндогенно-индуцированной генотоксичности. Накоплен большой опыт применения с этой целью методов цитогенетического анализа, однако они малопригодны для выявления низкоуровневой эндогенной генотоксичности. Клинические исследования у пациентов с тяжелой сочетанной травмой, невынашиванием беременности и системной красной волчанкой продемонстрировали высокую эффективность для решения указанной задачи метода ДНК-комет. В двух последних случаях показано, что наряду с регистрацией поврежденности ДНК целесообразна дополнительная оценка устойчивости клеток к *ex vivo* прооксидатному цито- и генотоксическому воздействию, что может служить непрямым индикатором состояния системы антиоксидантной защиты. Проведенное у пациентов с системной красной волчанкой исследование является примером успешной лекарственной антигенотоксической коррекции эндогенно-индуцированной генотоксичности в клинике у человека.

Таким образом, 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 методологической платформы, интегрирующей повреждение ДНК с другими генотоксическими конечными точками (генные, хромосомные и геномные мутации) в единую систему сквозной оценки генотоксического и антигенотоксического потенциала лекарственных средств на всех этапах их разработки (рисунок 4.1).

Ядро такой платформы составляют регламентированные валидированные тесты для оценки генотоксичности. Оценка поврежденности

ДНК методом ДНК-комет решает при этом критически важную задачу – органо- и тканеспецифичное определение потенциальных эффектов.



Примечание – отрицательные (⊖), положительные (⊕) и неоднозначные (?) результаты тестов на генотоксическую активность.

Рисунок 4.1 – Концепция методологической платформы для сквозной комплексной оценки генотоксического и антигенотоксического потенциала лекарственных средств (ЛС)

При отрицательном результате по совокупности результатов тестирования разрабатываемое лекарственное средство допускается до фаз I и II клинических исследований.

В случае неоднозначных, сложно трактуемых результатов проводятся расширенные генотоксикологические исследования с использованием дополнительных/альтернативных экспериментальных *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* методов и моделей. В первую очередь это тест ДНК-комет *in vitro* и *in vivo* в модификации со специфическими ферментами репарации, как показано для соединения PLX01107 (раздел 3.3), *in vitro* в клетках периферической крови

человека, как показано для катионных липосомальных наночастиц (раздел 3.4), *in vitro* тест ДНК-комет и микроядерный тест на 2D/3D-культурах метаболически компетентных клеток. Для более точного прогноза канцерогенного потенциала целесообразно также проведение теста на клеточную трансформацию *in vitro*.

При выявлении генотоксичности у лекарственного средства, предполагаемого к применению по жизненным показаниям, проводится всесторонняя оценка соотношения польза/риск, включающая: оценку генотоксичности у леченных пациентов (фаза III) методами ДНК-комет и цитогенетического анализа в клетках крови, буккального и уротелиального эпителия; расширенный генотоксикологический анализ, включающий оценку эффектов в половых и зародышевых клетках (метод ДНК-комет в предимплантационных эмбрионах, цитогенетический анализ в ооцитах и клетках сперматогоний); механистические исследования наблюдаемых эффектов.

Оценка эндогенной (заболевания, патологические состояния) и экзогенной (генотоксичные лекарственные средства) генотоксичности в клинических исследованиях проводится методами ДНК-комет и цитогенетического анализа в клетках крови, буккального и уротелиального эпителия. С использованием соответствующих экспериментальных моделей на основе данных механистических исследований проводится поиск и разработка лекарственных средств с антигенотоксической активностью.

Очевидно, что представленная методологическая платформа будет расширяться и совершенствоваться по мере получения новых фундаментальных знаний о механизмах генотоксичности и антигенотоксичности, накопления экспериментального материала, разработки новых экспериментальных методов и моделей.

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 внутрилабораторную сходимость и воспроизводимость 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 aberrации 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 aberrаций 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 методические рекомендации «Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений» (Методические рекомендации. РАМН и РАСХН, Москва, 2006); «Методические рекомендации МР 4.2.0014-10 «Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*» (Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, 2010); «Методические рекомендации по оценке ДНК-повреждений методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток в фармакологических исследованиях» (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Москва, 2012), «Методические рекомендации по оценке мутагенных свойств лекарственных средств» (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Москва, 2012); «Методические рекомендации по оценке канцерогенности лекарственных средств и вспомогательных веществ в краткосрочных тестах» (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Москва, 2012); «Оценка генотоксичности *in vitro* и *in vivo* методом ДНК-комет в щелочной версии» (Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том 3. Москва, 2025) и методические указания «Методические указания МУ 1.2.3364-16 «Оценка мутагенной активности пестицидов» (Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016)».

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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. **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.
3. **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.
4. 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.
5. **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.
6. **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.

7. 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.
8. **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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. **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.
13. **Жанатаев А.К.**, Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Метод ДНК-комет в генотоксикологических исследованиях // Гигиена и санитария. – 2011. – № 5. – С. 86–90.
14. 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.

15. 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.

16. 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.

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

18. 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

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

20. Гончарова В., **Жанатаев А.**, Чайка З., Дурнев А., Богдан Н., Луценко Н., Морозова К., Лунина С., Доброхотова Ю., Макаров О. Анализ

показателей генотоксичности при невынашивании беременности // Врач – 2016. – № 3. – С. 21–24.

21. Оценка мутагенной активности пестицидов: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016. – 49 с.

22. 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.

23. **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.

24. **Zhanataev A.K.**, Eremina N.V., Chayka Z.V., Kazey V.I., Andrianova E.L., Pural 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.

25. Даугель 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.

26. Moroz V.V., Kuzovlev A.N., Boeva 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.

27. **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 триметазидина // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2018. – № 2. – С. 28–34.

28. **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.
29. 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.
30. Gajski G., Langie S., **Zhanataev A.** Recent applications of the comet assay: a report from the international comet assay workshop 2019 // *Toxicology Letters*. – 2020. – Т. 333. – P. 1–3.
31. **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.
32. **Жанатаев А.К.**, Дурнев А.Д. Генотоксикология лекарственных средств: современное состояние и перспективы // *Медицинская генетика*. – 2020. – т. 19, №9. – С. 60–62.
33. 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.
34. 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.
35. Даугель-Дауге Н.О., **Жанатаев А.К.**, Колик Л.Г. Генотоксичность опиатов: исследование морфина на мышах // *Вопросы наркологии*. – 2021. – №6. – С. 67–76.
36. 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.

37. 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.
38. 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.
39. Дурнев А.Д., **Жанатаев А.К.** Актуальные аспекты генетической токсикологии лекарственных средств // Ведомости Центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2022. – т. 12, № 1. – С. 90–109.
40. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Еремина Н.В. Генетическая токсикология. – Москва: ООО Типография Миттель Пресс, 2022. – 286 с.
41. 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.
42. **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.
43. 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.
44. Еремина Н.В., **Жанатаев А.К.**, Дурнев А.Д. Генотоксические эффекты противосудорожных лекарственных препаратов. Обзор литературы // Экологическая генетика. – 2022. – т. 20, № 4. – С. 295–313.

45. 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.

46. **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.

47. 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.

48. **Жанатаев А.К.**, Дурнев А.Д. Актуальные задачи генотоксикологического тестирования // Медицинская генетика. – 2025. – Т.24, №7. – С. 37–39.

49. **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.

50. **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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бочков Н.П. Экологическая генетика человека // Экологическая генетика. – 2003. – Т. 1. – № 1. – С. 16–21.
2. Бочков Н.П., Чеботарев А.Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды. – Москва: Медицина, 1989. – 272 с.
3. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Еремина Н.В. Генетическая токсикология. – Москва: ООО Типография Миттель Пресс, 2022. – 286 с.
4. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Шредер О.В., Середенина В.С. Генотоксические поражения и болезни // Молекулярная медицина. – 2013. – № 3. – С. 3–19.
5. Siametis A., Garinis G.A. From Genome to Geroscience: How DNA Damage Shapes Systemic Decline // BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology. – 2025. – P. e70051.
6. Ren N., Atyah M., Chen W.-Y., Zhou C.-H. The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications // Journal of Translational Medicine. – 2017. – Vol. 15. – № 1. – P. 110.
7. Абилев С.К., Глазер В.М. Генетическая токсикология: итоги и перспективы // Генетика. – 2013. – Т. 49. – № 1. – С. 81–93.
8. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К. Актуальные аспекты генетической токсикологии лекарственных средств // Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2022. – Т. 12. – № 1. – С. 90–109.
9. Baldrick P. Genotoxicity test battery – An assessment of its utility in early drug development // Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2021. – Vol. 868–869. – P. 503388.
10. Luan Y., Honma M. Genotoxicity testing and recent advances // Genome Instability & Disease. – 2022. – Vol. 3. – No. 1. – P. 1–21.

11. Steiblen G., Benthem J. van, Johnson G. Strategies in genotoxicology: Acceptance of innovative scientific methods in a regulatory context and from an industrial perspective // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. – 2020. – T. 853. – Strategies in genotoxicology. – C. 503171.

12. Sun S., Osterman M.D., Li M. Tissue specificity of DNA damage response and tumorigenesis // *Cancer Biology & Medicine*. – 2019. – Vol. 16. – No. 3. – P. 396–414.

13. Menz J., Götz M.E., Gündel U., Gürtler R., Herrmann K., Hessel-Pras S., Kneuer C., Kolrep F., Nitzsche D., Pabel U., Sachse B., Schmeisser S., Schumacher D.M., Schwerdtle T., Tralau T., Zellmer S., Schäfer B. Genotoxicity assessment: opportunities, challenges and perspectives for quantitative evaluations of dose–response data // *Archives of Toxicology*. – 2023. – Vol. 97. – No. 9. – P. 2303–2328.

14. Beevers C., Uno Y., Meurer K., Hamada S., Hashimoto K., Kirkland D., LeBaron M.J., Le Curieux F., Le Hegarat L., Martus H.-J., Masumura K., Ohyama W., Roberts D.J., Vasquez M., Whitwell J., Witt K.L. *In vivo* genotoxicity testing strategies: Report from the 8th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT) // *Environmental and Molecular Mutagenesis*.

15. Yauk C.L., Aardema M.J., Benthem J. van, Bishop J.B., Dearfield K.L., DeMarini D.M., Dubrova Y.E., Honma M., Lupski J.R., Marchetti F., Meistrich M.L., Pacchierotti F., Stewart J., Waters M.D., Douglas G.R. Approaches for identifying germ cell mutagens: Report of the 2013 IWGT workshop on germ cell assays☆: Reports of the 6th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT), October 31 – November 1, 2013, Foz do Iguacu, Brazil // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. – 2015. – Vol. 783. – P. 36–54.

16. Thu H.E., Haider M., Khan S., Sohail M., Hussain Z. Nanotoxicity induced by nanomaterials: A review of factors affecting nanotoxicity and possible adaptations // *OpenNano*. – 2023. – T. 14. – P. 100190.

17. Andreoli C., Dusinska M., Bossa C., Battistelli C.L., Silva M.J., Louro H. Regulatory practices on the genotoxicity testing of nanomaterials and outlook for

the future // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. – 2025. – Vol. 162. – P. 105881.

18. Дурнев А.Д. Антимутагенез и антимутагены // *Физиология Человека*. – 2018. – Т. 44. – № 3. – С. 116–137.

19. Słoczyńska K., Powroźnik B., Pękala E., Waszkielewicz A.M. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action // *Journal of Applied Genetics*. – 2014. – Vol. 55. – № 2. – P. 273–285.

20. Mendelsohn M.L. Antimutagenic effects in humans // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 1992. – Vol. 267. – № 2. – P. 257–264.

21. Milic M., Frustaci A., Del Bufalo A., Sánchez-Alarcón J., Valencia-Quintana R., Russo P., Bonassi S. DNA damage in non-communicable diseases: A clinical and epidemiological perspective: DNA damage in chronic diseases and aging // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 2015. – Vol. 776. – P. 118–127.

22. Provasek V.E., Mitra J., Malojirao V.H., Hegde M.L. DNA Double-Strand Breaks as Pathogenic Lesions in Neurological Disorders // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – No. 9. – P. 4653.

23. Ishida M., Sakai C., Ishida T. Role of DNA damage in the pathogenesis of atherosclerosis // *Journal of Cardiology*. – 2023. – Vol. 81. – № 4. – P. 331–336.

24. De Bont R. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data // *Mutagenesis*. – 2004. – Vol. 19. – No. 3. – P. 169–185.

25. Cordelli E., Bignami M., Pacchierotti F. Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing // *Toxicology Research*. – 2021. – Vol. 10. – No. 1. – P. 68–78.

26. Azqueta A., Collins A.R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair // *Archives of Toxicology*. – 2013. – Vol. 87. – No. 6. – P. 949–968.

27. Илюшина Н.А. Генетическая токсикология в гигиене // *Токсикологический вестник*. – 2022. – Т. 30. – № 5. – С. 271–276.

28. Gutleb A.C., Murugadoss S., Stępnik M., SenGupta T., El Yamani N., Longhin E.M., Olsen A.-K.H., Wyrzykowska E., Jagiello K., Judzinska B., Cambier S., Honza T., McFadden E., Shaposhnikov S., Puzyn T., Serchi T., Weber P., Arnesdotter E., Skakalova V., Jirsova K., Grudzinski I.P., Collins A., Rundén-Pran E., Dusinska M. New Approach Methods (NAMs) for genotoxicity assessment of nano- and advanced materials; Advantages and challenges // *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. – 2025. – Vol. 904. – P. 503867.

29. Kirkland D., Uno Y., Luijten M., Beevers C., Van Benthem J., Burlinson B., Dertinger S., Douglas G.R., Hamada S., Horibata K., Lovell D.P., Manjanatha M., Martus H.-J., Mei N., Morita T., Ohyama W., Williams A. *In vivo* genotoxicity testing strategies: Report from the 7th International workshop on genotoxicity testing (IWGT) // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. – 2019. – Vol. 847. – P. 403035.

30. Ladeira C., Møller P., Giovannelli L., Gajski G., Haveric A., Bankoglu E.E., Azqueta A., Gerić M., Stopper H., Cabêda J., Tonin F.S., Collins A. The Comet Assay as a Tool in Human Biomonitoring Studies of Environmental and Occupational Exposure to Chemicals—A Systematic Scoping Review // *Toxics*. – 2024. – Vol. 12. – No. 4. – P. 270.

31. Vasquez M.Z., Dewhurst N.E. Reducing risk of false positives in the *in vivo* comet assay and improving result reliability // *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. – 2024. – Vol. 895. – P. 503750.

32. Forchhammer L., Johansson C., Loft S., Möller L., Godschalk R.W.L., Langie S.A.S., Jones G.D.D., Kwok R.W.L., Collins A.R., Azqueta A., Phillips D.H., Sozeri O., Stepnik M., Palus J., Vogel U., Wallin H., Routledge M.N., Handforth C., Allione A., Matullo G., Teixeira J.P., Costa S., Riso P., Porrini M., Møller P. Variation in the measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial // *Mutagenesis*. – 2010. – Vol. 25. – № 2. – P. 113–123.

33. Vasquez M.Z. Recommendations for safety testing with the *in vivo* comet assay // Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2012. – Vol.747. – № 1. – P. 142–156.

34. Azqueta A., Gutzkow K.B., Brunborg G., Collins A.R. Towards a more reliable comet assay: optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions // Mutation Research. – 2011. – Vol. 724. – № 1–2. – P. 41–45.

35. Azqueta A., Muruzabal D., Boutet-Robinet E., Milic M., Dusinska M., Brunborg G., Møller P., Collins A.R. Technical recommendations to perform the alkaline standard and enzyme-modified comet assay in human biomonitoring studies // Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2019. – Vol. 843. – P. 24–32.

36. Møller P., Azqueta A., Boutet-Robinet E., Koppen G., Bonassi S., Milić M., Gajski G., Costa S., Teixeira J.P., Costa Pereira C., Dusinska M., Godschalk R., Brunborg G., Gutzkow K.B., Giovannelli L., Cooke M.S., Richling E., Laffon B., Valdiglesias V., Basaran N., Del Bo' C., Zegura B., Novak M., Stopper H., Vodicka P., Vodenkova S., De Andrade V.M., Sramkova M., Gabelova A., Collins A., Langie S.A.S. Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results // Nature Protocols. – 2020. – Vol. 15. – No. 12. – P. 3817–3826.

37. Gajski G., Ravlić S., Godschalk R., Collins A., Dusinska M., Brunborg G. Application of the comet assay for the evaluation of DNA damage in mature sperm // Mutation Research/Reviews in Mutation Research. – 2021. – Vol. 788. – P. 108398.

38. Doak S.H., Andreoli C., Burgum M.J., Chaudhry Q., Bleeker E.A.J., Bossa C., Domenech J., Drobne D., Fessard V., Jeliaskova N., Longhin E., Rundén-Pran E., Stepnik M., El Yamani N., Catalán J., Dusinska M. Current status and future challenges of genotoxicity OECD Test Guidelines for nanomaterials: a workshop report // Mutagenesis. – 2023. – Vol. 38. – № 4. – P. 183–191.

39. Kunkel T.A. DNA Replication Fidelity // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – № 17. – P. 16895–16898.

40. Lynch A.M., Eastmond D., Elhajouji A., Froetschl R., Kirsch-Volders M., Marchetti F., Masumura K., Pacchierotti F., Schuler M., Tweats D. Targets and mechanisms of chemically induced aneuploidy. Part 1 of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases // *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. – 2019. – Vol. 847. – P. 403025.

41. Nian L., Xiaohua L., Rongcheng L., Song-Bai L. Types of DNA damage and research progress // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. – 2024. – Vol. 43. – No. 9. – P. 881–901.

42. Andrés C.M.C., Lastra J.M.P. de la, Juan C.A., Plou F.J., Pérez-Lebeña E. Chemical Insights into Oxidative and Nitrative Modifications of DNA // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – No. 20. – P. 15240.

43. Hsu C.W., Sowers M.L., Baljinnyam T., Herring J.L., Hackfeld L.C., Tang H., Zhang K., Sowers L.C. Measurement of deaminated cytosine adducts in DNA using a novel hybrid thymine DNA glycosylase // *Journal of Biological Chemistry*. – 2022. – Vol. 298. – № 3. – P. 101638.

44. Sriraman A., Debnath T.K., Xhemalce B., Miller K.M. Making it or breaking it: DNA methylation and genome integrity // *Essays in Biochemistry*. – 2020. – Vol. 64. – № 5. – P. 687–703.

45. Pegg A.E. Methylation of the O6 position of guanine in DNA is the most likely initiating event in carcinogenesis by methylating agents // *Cancer Investigation*. – 1984. – Vol. 2. – № 3. – P. 223–231.

46. de Almeida A.J.P.O., de Oliveira J.C.P.L., da Silva Pontes L.V., de Souza Júnior J.F., Gonçalves T.A.F., Dantas S.H., de Almeida Feitosa M.S., Silva A.O., de Medeiros I.A. ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling, and its Implications in Aging Pathways // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2022. – Vol. 2022. – P. 1225578.

47. Poetsch A.R. The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. – 2020. – Vol. 18. – P. 207–219.
48. Juan C.A., Pérez de la Lastra J.M., Plou F.J., Pérez-Lebeña E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 9. – P. 4642.
49. Hahm J.Y., Park J., Jang E.-S., Chi S.W. 8-Oxoguanine: from oxidative damage to epigenetic and epitranscriptional modification // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2022. – Vol. 54. – № 10. – P. 1626–1642.
50. Gorini F., Scala G., Cooke M.S., Majello B., Amente S. Towards a comprehensive view of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: Highlighting the intertwined roles of DNA damage and epigenetics in genomic instability // *DNA repair*. – 2021. – Vol. 97. – P. 103027.
51. Dedon P.C. The chemical toxicology of 2-deoxyribose oxidation in DNA // *Chemical Research in Toxicology*. – 2008. – Vol. 21. – № 1. – P. 206–219.
52. Wang Y. Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species // *Chemical Research in Toxicology*. – 2008. – Vol. 21. – № 2. – P. 276–281.
53. Halliwell B., Adhikary A., Dingfelder M., Dizdaroglu M. Hydroxyl radical is a significant player in oxidative DNA damage *in vivo* // *Chemical Society reviews*. – 2021. – Vol. 50. – № 15. – P. 8355–8360.
54. Fu D., Calvo J.A., Samson L.D. SERIES: Genomic instability in cancer Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents // *Nature reviews. Cancer*. – 2012. – Vol. 12. – № 2. – P. 104–120.
55. Gutierrez R., O'Connor T.R. DNA direct reversal repair and alkylating agent drug resistance // *Cancer Drug Resistance*. – 2021. – Vol. 4. – № 2. – P. 414–423.
56. Banaś A.K., Zgłobicki P., Kowalska E., Bażant A., Dziga D., Strzałka W. All You Need Is Light. Photorepair of UV-Induced Pyrimidine Dimers // *Genes*. – 2020. – Vol. 11. – No. 11. – P. 1304.

57. You Y.H., Lee D.H., Yoon J.H., Nakajima S., Yasui A., Pfeifer G.P. Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276. – № 48. – P. 44688–44694.

58. Yun B.H., Guo J., Bellamri M., Turesky R.J. DNA Adducts: formation, biological effects, and new biospecimens for mass spectrometric measurements in humans // *Mass spectrometry reviews*. – 2020. – Vol. 39. – № 1–2. – P. 55–82.

59. Ewa B., Danuta M.-Š. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts // *Journal of Applied Genetics*. – 2017. – Vol. 58. – № 3. – P. 321–330.

60. Naumenko N.V., Petrusheva I.O., Lavrik O.I. Bulky Adducts in Clustered DNA Lesions: Causes of Resistance to the NER System // *Acta Naturae*. – 2022. – Vol. 14. – № 4. – P. 38–49.

61. Nickoloff J.A., Sharma N., Taylor L. Clustered DNA Double-Strand Breaks: Biological Effects and Relevance to Cancer Radiotherapy // *Genes*. – 2020. – Vol. 11. – Clustered DNA Double-Strand Breaks. – № 1. – P. 99.

62. Thompson P.S., Cortez D. New insights into abasic site repair and tolerance // *DNA Repair*. – 2020. – Vol. 90. – P. 102866.

63. Szczepanski J.T., Jacobs A.C., Greenberg M.M. Self-promoted DNA interstrand cross-link formation by an abasic site // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – Vol. 130. – № 30. – P. 9646–9647.

64. Rana A., Yang K., Greenberg M.M. Reactivity of the Major Product of C5'-Oxidative DNA Damage in Nucleosome Core Particles // *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*. – 2019. – Vol. 20. – № 5. – P. 672–676.

65. Arichi N., Inase A., Eto S., Mizukoshi T., Yamamoto J., Iwai S. Mechanism of the alkali degradation of (6-4) photoproduct-containing DNA // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2012. – Vol. 10. – № 11. – P. 2318–2325.

66. Mullins E.A., Rodriguez A.A., Bradley N.P., Eichman B.F. Emerging Roles of DNA Glycosylases and the Base Excision Repair Pathway // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2019. – Vol. 44. – № 9. – P. 765–781.

67. Nitiss K.C., Bandak A., Berger J.M., Nitiss J.L. Genome Instability Induced by Topoisomerase Misfunction // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25. – № 19. – P. 10247.

68. Mehta A., Haber J.E. Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2014. – Vol. 6. – № 9. – P. a016428.

69. Cannan W.J., Pederson D.S. Mechanisms and Consequences of Double-strand DNA Break Formation in Chromatin // *Journal of cellular physiology*. – 2016. – Vol. 231. – № 1. – P. 3–14.

70. Balmain A. The critical roles of somatic mutations and environmental tumor-promoting agents in cancer risk // *Nature Genetics*. – 2020. – Vol. 52. – No. 11. – P. 1139–1143.

71. Mohiuddin M., Kooy R.F., Pearson C.E. De novo mutations, genetic mosaicism and human disease // *Frontiers in Genetics*. – 2022. – Vol. 13. – P. 983668.

72. Zhang S., Xiao X., Yi Y., Wang X., Zhu L., Shen Y., Lin D., Wu C. Tumor initiation and early tumorigenesis: molecular mechanisms and interventional targets // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2024. – Vol. 9. – No. 1. – P. 149.

73. Mutagens N.R.C. (US) C. on C.E. THE MUTAGENICITY OF CARCINOGENIC COMPOUNDS // *Quantitative Relationship between Mutagenic and Carcinogenic Potencies: A Feasibility Study*. – National Academies Press (US), 1983.

74. El Nacheif L., Bouchet A., Bourguignon M., Foray N. When DNA Mutations Interplay with Cellular Proliferation: A Narrative History of Theories of Carcinogenesis // *Cancers*. – 2024. – Vol. 16. – No. 11. – P. 2104.

75. Ostroverkhova D., Przytycka T.M., Panchenko A.R. Cancer driver mutations: predictions and reality // *Trends in Molecular Medicine*. – 2023. – Vol. 29. – № 7. – P. 554–566.

76. Sarasin A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis // *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. – 2003. – Vol. 544. – No. 2–3. – P. 99–106.

77. Dressler L., Bortolomeazzi M., Keddar M.R., Miletic H., Sartini G., Acha-Sagredo A., Montorsi L., Wijewardhane N., Repana D., Nulsen J., Goldman J., Pollitt M., Davis P., Strange A., Ambrose K., Ciccarelli F.D. Comparative assessment of genes driving cancer and somatic evolution in non-cancer tissues: an update of the Network of Cancer Genes (NCG) resource // *Genome Biology*. – 2022. – Vol. 23. – № 1. – P. 35.

78. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions // *Cancer Discovery*. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 31–46.

79. Gerstung M., Jolly C., Leshchiner I., D'Entrop S.C., Gonzalez S., Rosebrock D., Mitchell T.J., Rubanova Y., Anur P., Yu K., Tarabichi M., Deshwar A., Wintersinger J., Kleinheinz K., Vázquez-García I., Haase K., Jerman L., Sengupta S., Macintyre G., Malikic S., Donmez N., Livitz D.G., Cmero M., Demeulemeester J., Schumacher S., Fan Y., Yao X., Lee J., Schlesner M., Boutros P.C., Bowtell D.D., Zhu H., Getz G., Imielinski M., Beroukhi R., Sahinalp S.C., Ji Y., Peifer M., Markowitz F., Mustonen V., Yuan K., Wang W., Morris Q.D., Spellman P.T., Wedge D.C., Van Loo P. The evolutionary history of 2,658 cancers // *Nature*. – 2020. – Vol. 578. – № 7793. – P. 122–128.

80. Szilard L. On the Nature of the aging process // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1959. – Vol. 45. – № 1. – P. 30–45.

81. Moskalev A.A., Shaposhnikov M.V., Plyusnina E.N., Zhavoronkov A., Budovsky A., Yanai H., Fraifeld V.E. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria // *Ageing Research Reviews*. – 2013. – Vol. 12. – № 2. – P. 661–684.

82. MacRae S.L., Croken M.M., Calder R.B., Aliper A., Milholland B., White R.R., Zhavoronkov A., Gladyshev V.N., Seluanov A., Gorbunova V., Zhang Z.D.,

Vijg J. DNA repair in species with extreme lifespan differences // *Aging*. – 2015. – Vol. 7. – № 12. – P. 1171–1184.

83. Boerrigter M.E., Dollé M.E., Martus H.J., Gossen J.A., Vijg J. Plasmid-based transgenic mouse model for studying *in vivo* mutations // *Nature*. – 1995. – Vol. 377. – № 6550. – P. 657–659.

84. Maslov A.Y., Makhortov S., Sun S., Heid J., Dong X., Lee M., Vijg J. Single-molecule, quantitative detection of low-abundance somatic mutations by high-throughput sequencing // *Science Advances*. – 2022. – Vol. 8. – № 14. – P. eabm3259.

85. Ren P., Dong X., Vijg J. Age-related somatic mutation burden in human tissues // *Frontiers in Aging*. – 2022. – Vol. 3. – P. 1018119.

86. Sun S., Wang Y., Maslov A.Y., Dong X., Vijg J. SomaMutDB: a database of somatic mutations in normal human tissues // *Nucleic Acids Research*. – 2021. – Vol. 50. – № D1. – P. D1100–D1108.

87. Ren P., Zhang J., Vijg J. Somatic mutations in aging and disease // *GeroScience*. – 2024. – Vol. 46. – № 5. – P. 5171–5189.

88. Alexandrov L.B., Jones P.H., Wedge D.C., Sale J.E., Campbell P.J., Nik-Zainal S., Stratton M.R. Clock-like mutational processes in human somatic cells // *Nature Genetics*. – 2015. – Vol. 47. – № 12. – P. 1402–1407.

89. Kucab J.E., Zou X., Morganello S., Joel M., Nanda A.S., Nagy E., Gomez C., Degasperi A., Harris R., Jackson S.P., Arlt V.M., Phillips D.H., Nik-Zainal S. A Compendium of Mutational Signatures of Environmental Agents // *Cell*. – 2019. – Vol. 177. – № 4. – P. 821–836.e16.

90. Vijg J., Dong X. Pathogenic Mechanisms of Somatic Mutation and Genome Mosaicism in Aging // *Cell*. – 2020. – Vol. 182. – № 1. – P. 12–23.

91. Porubsky D., Dashnow H., Sasani T.A., Logsdon G.A., Hallast P., Noyes M.D., Kronenberg Z.N., Mokveld T., Koundinya N., Nolan C., Steely C.J., Guarracino A., Dolzhenko E., Harvey W.T., Rowell W.J., Grigorev K., Nicholas T.J., Goldberg M.E., Oshima K.K., Lin J., Ebert P., Watkins W.S., Leung T.Y., Hanlon V.C.T., McGee S., Pedersen B.S., Happ H.C., Jeong H., Munson K.M.,

Hoekzema K., Chan D.D., Wang Y., Knuth J., Garcia G.H., Fanslow C., Lambert C., Lee C., Smith J.D., Levy S., Mason C.E., Garrison E., Lansdorp P.M., Neklason D.W., Jorde L.B., Quinlan A.R., Eberle M.A., Eichler E.E. Human de novo mutation rates from a four-generation pedigree reference // *Nature*. – 2025. – Vol. 643. – No. 8071. – P. 427–436.

92. Peltonen L., McKusick V.A. Genomics and medicine. Dissecting human disease in the postgenomic era // *Science (New York, N.Y.)*. – 2001. – Vol. 291. – № 5507. – P. 1224–1229.

93. Saniotis A., Henneberg M., Mohammadi K. Genetic load and biological changes to extant humans // *Journal of Biosocial Science*. – 2021. – Vol. 53. – № 4. – P. 639–642.

94. Acuna-Hidalgo R., Veltman J.A., Hoischen A. New insights into the generation and role of de novo mutations in health and disease // *Genome Biology*. – 2016. – Vol. 17. – № 1. – P. 241.

95. Shukla V., Høffding M.K., Hoffmann E.R. Genome diversity and instability in human germ cells and preimplantation embryos // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2021. – Vol. 113. – P. 132–147.

96. Claussnitzer M., Cho J.H., Collins R., Cox N.J., Dermitzakis E.T., Hurles M.E., Kathiresan S., Kenny E.E., Lindgren C.M., MacArthur D.G., North K.N., Plon S.E., Rehm H.L., Risch N., Rotimi C.N., Shendure J., Soranzo N., McCarthy M.I. A brief history of human disease genetics // *Nature*. – 2020. – Vol. 577. – № 7789. – P. 179–189.

97. Collins R.L., Brand H., Karczewski K.J., Zhao X., Alföldi J., Francioli L.C., Khera A.V., Lowther C., Gauthier L.D., Wang H., Watts N.A., Solomonson M., O'Donnell-Luria A., Baumann A., Munshi R., Walker M., Whelan C.W., Huang Y., Brookings T., Sharpe T., Stone M.R., Valkanas E., Fu J., Tiao G., Laricchia K.M., Ruano-Rubio V., Stevens C., Gupta N., Cusick C., Margolin L., Genome Aggregation Database Production Team, Genome Aggregation Database Consortium, Taylor K.D., Lin H.J., Rich S.S., Post W.S., Chen Y.-D.I., Rotter J.I., Nusbaum C., Philippakis A., Lander E., Gabriel S., Neale B.M., Kathiresan S., Daly

M.J., Banks E., MacArthur D.G., Talkowski M.E. A structural variation reference for medical and population genetics // *Nature*. – 2020. – Vol. 581. – № 7809. – P. 444–451.

98. Soler A., Morales C., Mademont-Soler I., Margarit E., Borrell A., Borobio V., Muñoz M., Sánchez A. Overview of Chromosome Abnormalities in First Trimester Miscarriages: A Series of 1,011 Consecutive Chorionic Villi Sample Karyotypes // *Cytogenetic and Genome Research*. – 2017. – Vol. 152. – № 2. – P. 81–89.

99. Girardi L., Serdarogullari M., Patassini C., Poli M., Fabiani M., Caroselli S., Coban O., Findikli N., Boynukalin F.K., Bahceci M., Chopra R., Canipari R., Cimadomo D., Rienzi L., Ubaldi F., Hoffmann E., Rubio C., Simon C., Capalbo A. Incidence, Origin, and Predictive Model for the Detection and Clinical Management of Segmental Aneuploidies in Human Embryos // *American Journal of Human Genetics*. – 2020. – Vol. 106. – № 4. – P. 525–534.

100. Macklon N.S., Geraedts J.P.M., Fauser B.C.J.M. Conception to ongoing pregnancy: the «black box» of early pregnancy loss // *Human Reproduction Update*. – 2002. – Vol. 8. – № 4. – P. 333–343.

101. Barati T., Mirzaei Z., Ebrahimi A., Ghavi D., Shekari Khaniani M., Mansoori Derakhshan S. An investigation on genetic mutations affecting embryo, oocyte, and sperm quality: An IVF failure perspective // *Human Gene*. – 2025. – Vol. 43. – P. 201384.

102. Ehrenberg L., Brookes P., Druckrey H., Lagerlf B., Litwin J., Williams G. The Relation of Cancer Induction and Genetic Damage (Report of Group 3) // *Ambio Special Report*. – 1973. – № 3. – P. 15–16.

103. Li Q., Qian W., Zhang Y., Hu L., Chen S., Xia Y. A new wave of innovations within the DNA damage response // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2023. – Vol. 8. – No. 1. – P. 338.

104. Blackford A.N., Jackson S.P. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response // *Molecular Cell*. – 2017. – Vol. 66. – № 6. – P. 801–817.

105. Mah L.-J., El-Osta A., Karagiannis T.C. γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair // *Leukemia*. – 2010. – Vol. 24. – No. 4. – P. 679–686.
106. Hustedt N., Durocher D. The control of DNA repair by the cell cycle // *Nature Cell Biology*. – 2016. – Vol. 19. – № 1. – P. 1–9.
107. Chang H.H.Y., Pannunzio N.R., Adachi N., Lieber M.R. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair // *Nature reviews. Molecular cell biology*. – 2017. – Vol. 18. – № 8. – P. 495–506.
108. Chakraborty S., Schirmeisen K., Lambert S.A. The multifaceted functions of homologous recombination in dealing with replication-associated DNA damages // *DNA Repair*. – 2023. – Vol. 129. – P. 103548.
109. Bhargava R., Onyango D.O., Stark J.M. Regulation of Single Strand Annealing and its role in genome maintenance // *Trends in genetics : TIG*. – 2016. – Vol. 32. – № 9. – P. 566–575.
110. Dhoonmoon A., Ambrose J.R., Garg S., Lascarez-Espana C., Rebok A., Spratt T.E., Moldovan G.-L., Nicolae C.M. Translesion-synthesis-mediated bypass of DNA lesions occurs predominantly behind replication forks restarted by PrimPol // *Cell Reports*. – 2025. – Vol. 44. – № 3. – P. 115360.
111. Marteijn J.A., Lans H., Vermeulen W., Hoeijmakers J.H.J. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2014. – Vol. 15. – No. 7. – P. 465–481.
112. Li G.-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair // *Cell Research*. – 2008. – Vol. 18. – No. 1. – P. 85–98.
113. Gohil D., Sarker A.H., Roy R. Base Excision Repair: Mechanisms and Impact in Biology, Disease, and Medicine // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 18. – P. 14186.
114. Caldecott K.W. DNA single-strand break repair and human genetic disease // *Trends in Cell Biology*. – 2022. – Vol.32. – № 9. – P. 733–745.

115. Surova O., Zhivotovsky B. Various modes of cell death induced by DNA damage // *Oncogene*. – 2013. – Vol. 32. – No. 33. – P. 3789–3797.

116. Prokhorova E.A., Egorshina A.Y., Zhivotovsky B., Kopeina G.S. The DNA-damage response and nuclear events as regulators of nonapoptotic forms of cell death // *Oncogene*. – 2020. – Vol. 39. – No. 1. – P. 1–16.

117. Roufayel R., Younes K., Al-Sabi A., Murshid N. BH3-Only Proteins Noxa and Puma Are Key Regulators of Induced Apoptosis // *Life*. – 2022. – Vol. 12. – No. 2. – P. 256.

118. Dashzeveg N., Yoshida K. Cell death decision by p53 via control of the mitochondrial membrane // *Cancer Letters*. – 2015. – Vol. 367. – № 2. – P. 108–112.

119. Huang P., Chen G., Jin W., Mao K., Wan H., He Y. Molecular Mechanisms of Parthanatos and Its Role in Diverse Diseases // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 13. – P. 7292.

120. Yang L., Guttman L., Dawson V.L., Dawson T.M. Parthanatos: Mechanisms, modulation, and therapeutic prospects in neurodegenerative disease and stroke: Enna Legacy of Excellence // *Biochemical Pharmacology*. – 2024. – Vol. 228. – Parthanatos. – P. 116174.

121. Czarny P., Pawlowska E., Bialkowska-Warzecha J., Kaarniranta K., Blasiak J. Autophagy in DNA Damage Response // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – Vol. 16. – No. 2. – P. 2641–2662.

122. Juretschke T., Beli P. Causes and consequences of DNA damage-induced autophagy: Extracellular matrix and Autophagy // *Matrix Biology*. – 2021. – Vol. 100–101. – P. 39–53.

123. Eliopoulos A.G., Havaki S., Gorgoulis V.G. DNA Damage Response and Autophagy: A Meaningful Partnership // *Frontiers in Genetics*. – 2016. – Vol. 7.

124. Tenev T., Bianchi K., Darding M., Broemer M., Langlais C., Wallberg F., Zachariou A., Lopez J., MacFarlane M., Cain K., Meier P. The Ripoptosome, a Signaling Platform that Assembles in Response to Genotoxic Stress and Loss of IAPs // *Molecular Cell*. – 2011. – Vol. 43. – № 3. – P. 432–448.

125. Zhang Q., Kang R., Zeh, III H.J., Lotze M.T., Tang D. DAMPs and autophagy // *Autophagy*. – 2013. – Vol. 9. – № 4. – P. 451–458.
126. Gire V., Dulić V. Senescence from G2 arrest, revisited // *Cell Cycle*. – 2015. – Vol. 14. – № 3. – P. 297–304.
127. Yan J., Chen S., Yi Z., Zhao R., Zhu J., Ding S., Wu J. The role of p21 in cellular senescence and aging-related diseases // *Molecules and Cells*. – 2024. – Vol. 47. – № 11. – P. 100113.
128. Mijit M., Caracciolo V., Melillo A., Amicarelli F., Giordano A. Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10. – № 3. – P. 420.
129. Zhao J., Zhang L., Lu A., Han Y., Colangelo D., Bukata C., Scibetta A., Yousefzadeh M.J., Li X., Gurkar A.U., McGowan S.J., Angelini L., O’Kelly R., Li H., Corbo L., Sano T., Nick H., Pola E., Pilla S.P.S., Ladiges W.C., Vo N., Huard J., Niedernhofer L.J., Robbins P.D. ATM is a key driver of NF- κ B-dependent DNA-damage-induced senescence, stem cell dysfunction and aging // *Aging*. – 2020. – Vol. 12. – No. 6. – P. 4688–4710.
130. von Zglinicki T., Wan T., Miwa S. Senescence in Post-Mitotic Cells: A Driver of Aging? // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2021. – Vol. 34. – № 4. – P. 308–323.
131. Kumari R., Jat P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – Vol. 9.
132. Mohamad Kamal N.S., Safuan S., Shamsuddin S., Foroozandeh P. Aging of the cells: Insight into cellular senescence and detection Methods // *European Journal of Cell Biology*. – 2020. – Vol. 99. – № 6. – P. 151108.
133. Alqahtani S., Alqahtani T., Venkatesan K., Sivadasan D., Ahmed R., Sirag N., Elfadil H., Abdullah Mohamed H., T.A. H., Elsayed Ahmed R., Muralidharan P., Paulsamy P. SASP Modulation for Cellular Rejuvenation and Tissue Homeostasis: Therapeutic Strategies and Molecular Insights // *Cells*. – 2025. – Vol. 14. – № 8. – P. 608.

134. Artemyeva O.V., Gankovskaya L.V. Inflammaging as the basis of age-associated diseases // *Medical Immunology (Russia)*. – 2020. – Vol. 22. – № 3. – P. 419–432.
135. Zierhut C. Potential cGAS-STING pathway functions in DNA damage responses, DNA replication and DNA repair // *DNA Repair*. – 2024. – Vol. 133. – P. 103608.
136. Gehrke N., Mertens C., Zillinger T., Wenzel J., Bald T., Zahn S., Tüting T., Hartmann G., Barchet W. Oxidative damage of DNA confers resistance to cytosolic nuclease TREX1 degradation and potentiates STING-dependent immune sensing // *Immunity*. – 2013. – Vol. 39. – № 3. – P. 482–495.
137. Lugrin J., Martinon F. The AIM2 inflammasome: Sensor of pathogens and cellular perturbations // *Immunological Reviews*. – 2018. – Vol. 281. – № 1. – P. 99–114.
138. Wunderlich R., Ruehle P.-F., Deloch L., Unger K., Hess J., Zitzelsberger H., Lauber K., Frey B., Gaipf U.S. Interconnection between DNA damage, senescence, inflammation, and cancer // *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*. – 2017. – Vol. 22. – № 2. – P. 348–369.
139. Pezone A., Olivieri F., Napoli M.V., Procopio A., Avvedimento E.V., Gabrielli A. Inflammation and DNA damage: cause, effect or both // *Nature Reviews. Rheumatology*. – 2023. – Vol.19. – № 4. – P. 200–211.
140. Lonkar P., Dedon P.C. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: Reconciling chemical mechanisms and biological fates // *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer*. – 2011. – Vol. 128. – № 9. – P. 1999–2009.
141. Kay J., Thadhani E., Samson L., Engelward B. Inflammation-Induced DNA Damage, Mutations and Cancer // *DNA repair*. – 2019. – Vol. 83. – P. 102673.
142. Bartsch H., Nair J. Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis // *Cancer Detection and Prevention*. – 2004. – Vol. 28. – № 6. – P. 385–391.

143. Welch G., Tsai L. Mechanisms of DNA damage-mediated neurotoxicity in neurodegenerative disease // *EMBO Reports*. – 2022. – Vol. 23. – № 6. – P. e54217.

144. Dash U.C., Bhol N.K., Swain S.K., Samal R.R., Nayak P.K., Raina V., Panda S.K., Kerry R.G., Duttaroy A.K., Jena A.B. Oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of neurological disorders: Mechanisms and implications // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2025. – T. 15. – № 1. – P. 15–34.

145. Ishida M., Sakai C., Ishida T. Role of DNA damage in the pathogenesis of atherosclerosis // *Journal of Cardiology*. – 2023. – Vol. 81. – № 4. – P. 331–336.

146. Manolakou T., Verginis P., Boumpas D.T. DNA Damage Response in the Adaptive Arm of the Immune System: Implications for Autoimmunity // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 11. – P. 5842.

147. Kumar V., Yildirim A.Ö., Nawroth P.P. The role of DNA damage in diabetic complications // *Nature Reviews. Endocrinology*. – 2024. – Vol. 20. – № 11. – P. 629–630.

148. Nedosugova L.V., Markina Y.V., Bochkareva L.A., Kuzina I.A., Petunina N.A., Yudina I.Y., Kirichenko T.V. Inflammatory Mechanisms of Diabetes and Its Vascular Complications // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10. – No. 5. – P. 1168.

149. Zhao W., Angspatt A., Kitkumthorn N., Meevassana J. Advances in cGAS-STING Signaling in Fibrosis Diseases: Therapeutic Target in Pathological Scars // *Journal of Inflammation Research*. – 2025. – Vol. 18. – P. 10777–10793.

150. Tilg H., Moschen A.R. Inflammatory Mechanisms in the Regulation of Insulin Resistance // *Molecular Medicine*. – 2008. – Vol. 14. – № 3–4. – P. 222–231.

151. Livshits G., Kalinkovich A. A cross-talk between sestrins, chronic inflammation and cellular senescence governs the development of age-associated sarcopenia and obesity // *Ageing Research Reviews*. – 2023. – Vol. 86. – P. 101852.

152. Kell L., Simon A.K., Alsaleh G., Cox L.S. The central role of DNA damage in immunosenescence // *Frontiers in Aging*. – 2023. – Vol. 4. – P. 1202152.

153. Ahmad A., Braden A., Khan S., Xiao J., Khan M.M. Crosstalk between the DNA damage response and cellular senescence drives aging and age-related diseases // *Seminars in Immunopathology*. – 2024. – Vol. 46. – № 3–4. – P. 10.
154. Liu Z., Liang Q., Ren Y., Guo C., Ge X., Wang L., Cheng Q., Luo P., Zhang Y., Han X. Immunosenescence: molecular mechanisms and diseases // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2023. – Vol. 8. – No. 1. – P. 200.
155. Huang Y., Jiang W., Zhou R. DAMP sensing and sterile inflammation: intracellular, intercellular and inter-organ pathways // *Nature Reviews Immunology*. – 2024. – Vol. 24. – No. 10. – P. 703–719.
156. Becher B., Spath S., Goverman J. Cytokine networks in neuroinflammation // *Nature Reviews Immunology*. – 2017. – Vol. 17. – № 1. – P. 49–59.
157. Hou J., Chen K.-X., He C., Li X.-X., Huang M., Jiang Y.-Z., Jiao Y.-R., Xiao Q.-N., He W.-Z., Liu L., Zou N.-Y., Huang M., Wei J., Xiao Y., Yang M., Luo X.-H., Zeng C., Lei G.-H., Li C.-J. Aged bone marrow macrophages drive systemic aging and age-related dysfunction via extracellular vesicle-mediated induction of paracrine senescence // *Nature Aging*. – 2024. – Vol. 4. – № 11. – P. 1562–1581.
158. Cinat D., Coppes R.P., Barazzuol L. DNA Damage-Induced Inflammatory Microenvironment and Adult Stem Cell Response // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – Vol. 9. – P. 729136.
159. Михеев Р.К., Андреева Е.Н., Григорян О.Р., Шереметьева Е.В., Абсатарова Ю.С., Одарченко А.С., Оплетаева О.Н. Молекулярные и клеточные механизмы старения: современные представления (обзор литературы) // *Проблемы Эндокринологии*. – 2023. – Т. 69. – № 5. – С. 45–54.
160. Vijg J. From DNA damage to mutations: All roads lead to aging // *Ageing Research Reviews*. – 2021. – Vol. 68. – P. 101316.
161. Bujarrabal-Dueso A., Garinis G.A., Robbins P.D., Vijg J., Schumacher B. Targeting DNA damage in ageing: towards supercharging DNA repair // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2025.

162. Kawanishi S., Wang G., Ma N., Murata M. Cancer Development and Progression Through a Vicious Cycle of DNA Damage and Inflammation // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025. – Vol. 26. – No. 7. – P. 3352.
163. Yu W., Tu Y., Long Z., Liu J., Kong D., Peng J., Wu H., Zheng G., Zhao J., Chen Y., Liu R., Li W., Hai C. Reactive Oxygen Species Bridge the Gap between Chronic Inflammation and Tumor Development // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2022. – Vol. 2022. – P. 2606928.
164. Grivennikov S.I., Karin M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection // *Current opinion in genetics & development*. – 2010. – Vol. 20. – № 1. – P. 65.
165. Nihira N.T., Kudo R., Ohta T. Inflammation and tumor immune escape in response to DNA damage // *Seminars in Cancer Biology*. – 2025. – Vol. 110. – P. 36–45.
166. Fishbein A., Hammock B.D., Serhan C.N., Panigrahy D. Carcinogenesis: Failure of resolution of inflammation? // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2021. – Vol. 218. – P. 107670.
167. Pavinato L., Baggiolini A. Oncogenic competence: balancing mutations, cellular state, and microenvironment: Special Issue: 10th anniversary // *Trends in Cancer*. – 2025. – Vol. 11. – № 4. – P. 276–285.
168. Дурнев А.Д., Лапицкая А.С. Генотоксикология соединений растительного происхождения // *Экологическая генетика*. – 2012. – Т. 10. – № 3. – С. 41–52.
169. Das S., Thakur S., Korenjak M., Sidorenko V.S., Chung F.F.-L., Zavadil J. Aristolochic acid-associated cancers: a public health risk in need of global action // *Nature Reviews. Cancer*. – 2022. – Vol. 22. – № 10. – P. 576–591.
170. Mitchell C.A., Dever J.T., Gafner S., Griffiths J.C., Marsman D.S., Rider C., Welch C., Embry M.R. The Botanical Safety Consortium: A public-private partnership to enhance the botanical safety toolkit // *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP*. – 2022. – Vol. 128. – P. 105090.

171. Witt K.L., van Benthem J., Kobets T., Chen G., Kelber O., Krzykwa J., MacGregor J.T., Mei N., Mitchell C.A., Rietjens I., Sarigol-Kilic Z., Smith-Roe S.L., Stopper H., Thakkar Y., Zeiger E., Pfuhler S. A proposed screening strategy for evaluating the genotoxicity potential of botanicals and botanical extracts // *Food and Chemical Toxicology*. – 2025. – Vol. 197. – P. 115277.
172. Mandal P., Rai A., Mishra S., Tripathi A., Das M. Mutagens in Food // *Mutagenicity: Assays and Applications*. – Elsevier, 2018. – P. 133–160.
173. Merugu N.K., Manapuram S., Chakraborty T., Karanam S.K., Imandi S.B. Mutagens in commercial food processing and its microbial transformation // *Food Science and Biotechnology*. – 2023. – Vol. 32. – № 5. – P. 599–620.
174. Shoeb M., Zarus G.M., Abadin H.E. Profiling Metal-Induced Genotoxic Endpoints // *Journal of environmental health*. – 2023. – Vol. 86. – № 5. – P. 30–35.
175. Илюшина Н.А., Егорова О.В., Масальцев Г.В., Аверьянова Н.С., Ревазова Ю.А. Мутагенность и канцерогенность пестицидов, опасность для здоровья человека. Систематический обзор // *Здравоохранение Российской Федерации*. – 2017. – Т. 61. – № 2. – С. 96–102.
176. Zhou W., Li M., Achal V. A comprehensive review on environmental and human health impacts of chemical pesticide usage // *Emerging Contaminants*. – 2025. – Vol. 11. – No. 1. – P. 100410.
177. Alshannaq A., Yu J.-H. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2017. – Vol. 14. – № 6. – P. 632.
178. Yamada M., Honma M. Summarized data of genotoxicity tests for designated food additives in Japan // *Genes and Environment*. – 2018. – Vol. 40. – P. 27.
179. Recoules C., Touvier M., Pierre F., Audebert M. Evaluation of the toxic effects of food additives, alone or in mixture, in four human cell models // *Food and Chemical Toxicology*. – 2025. – Vol. 196. – P. 115198.
180. DeMarini D.M. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review: The Sources and Potential Hazards of Mutagens in Complex

Environmental Matrices // Mutation Research/Reviews in Mutation Research. – 2004. – Vol. 567. – № 2. – P. 447–474.

181. Oliveira N.G., Ramos D.L., Dinis-Oliveira R.J. Genetic toxicology and toxicokinetics of arecoline and related areca nut compounds: an updated review // Archives of Toxicology. – 2021. – Vol. 95. – No. 2. – P. 375–393.

182. Kruman I.I., Henderson G.I., Bergeson S.E. DNA damage and neurotoxicity of chronic alcohol abuse // Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.). – 2012. – Vol. 237. – № 7. – P. 740–747.

183. Vitorino J.D., Costa P.M. After a Century of Research into Environmental Mutagens and Carcinogens, Where Do We Stand? // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2023. – Vol. 20. – № 2. – P. 1040.

184. Jan N., Majeed N., Ahmad M., Ahmad Lone W., John R. Nano-pollution: Why it should worry us // Chemosphere. – 2022. – Vol. 302. – P. 134746.

185. Дурнев А.Д. Оценка генотоксичности наночастиц при использовании в медицине // Гигиена и санитария. – 2014. – № 2. – С. 76–83.

186. Brambilla G., Martelli A. Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals // Mutation Research. – 2009. – Vol. 681. – № 2–3. – P. 209–229.

187. Turnell A.S., Grand R.J. DNA viruses and the cellular DNA-damage response // Journal of General Virology. – 2012. – Vol. 93. – № 10. – P. 2076–2097.

188. Szewczyk-Roszczenko O., Roszczenko P., Vassetzky Y., Sjakste N. Genotoxic consequences of viral infections // npj Viruses. – 2025. – Vol. 3. – No. 1. – P. 1–13.

189. Chen Y., Williams V., Filippova M., Filippov V., Duerksen-Hughes P. Viral Carcinogenesis: Factors Inducing DNA Damage and Virus Integration // Cancers. – 2014. – Vol. 6. – № 4. – P. 2155–2186.

190. Letafati A., Taghiabadi Z., Zafarian N., Tajdini R., Mondeali M., Aboofazeli A., Chichiarelli S., Saso L., Jazayeri S.M. Emerging paradigms:

unmasking the role of oxidative stress in HPV-induced carcinogenesis // *Infectious Agents and Cancer*. – 2024. – Vol. 19. – No. 1. – P. 30.

191. Kayesh M.E.H., Kohara M., Tsukiyama-Kohara K. Effects of oxidative stress on viral infections: an overview // *npj Viruses*. – 2025. – T. 3. – P. 27.

192. Wang M., Zhao Y., Liu J., Fan R., Tang Y., Guo Z., Li T. The role of the cGAS-STING signaling pathway in viral infections, inflammatory and autoimmune diseases // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2024. – Vol. 45. – No. 10. – P. 1997–2010.

193. J. Heath J., D. Grant M. The Immune Response Against Human Cytomegalovirus Links Cellular to Systemic Senescence // *Cells*. – 2020. – Vol. 9. – No. 3. – P. 766.

194. Gioia U., Tavella S., Martínez-Orellana P., Cicio G., Colliva A., Ceccon M., Cabrini M., Henriques A.C., Fumagalli V., Paldino A., Presot E., Rajasekharan S., Iacomino N., Pisati F., Matti V., Sepe S., Conte M.I., Barozzi S., Lavagnino Z., Carletti T., Volpe M.C., Cavalcante P., Iannaccone M., Rampazzo C., Bussani R., Tripodo C., Zacchigna S., Marcello A., d'Adda di Fagagna F. SARS-CoV-2 infection induces DNA damage, through CHK1 degradation and impaired 53BP1 recruitment, and cellular senescence // *Nature Cell Biology*. – 2023. – Vol. 25. – № 4. – P. 550–564.

195. Weitzman M.D., Fradet-Turcotte A. Virus DNA Replication and the Host DNA Damage Response // *Annual review of virology*. – 2018. – Vol. 5. – № 1. – P. 141–164.

196. Xiao Q., Liu Y., Li T., Wang C., He S., Zhai L., Yang Z., Zhang X., Wu Y., Liu Y. Viral oncogenesis in cancer: from mechanisms to therapeutics // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2025. – Vol. 10. – No. 1. – P. 151.

197. Kgatle M.M., Spearman C.W., Kalla A.A., Hairwadzi H.N. DNA Oncogenic Virus-Induced Oxidative Stress, Genomic Damage, and Aberrant Epigenetic Alterations // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 3179421.

198. Kawanishi S., Ohnishi S., Ma N., Hiraku Y., Oikawa S., Murata M. Nitrate and oxidative DNA damage in infection-related carcinogenesis in relation to cancer stem cells // *Genes and Environment*. – 2017. – Vol. 38. – No. 1. – P. 26.
199. Дружинин В.Г., Баранова Е.Д., Буслаев В.Ю., Мацкова Л.В., Толстикова А.В. Бактериальные эффекторы повреждений ДНК в клетках организма хозяина // *Экологическая генетика*. – 2018. – Т. 16. – № 3. – С. 26–36.
200. Шлапакова Т.И., Костин Р.К., Тягунова Е.Е. Активные формы кислорода: участие в клеточных процессах и развитии патологии // *Биоорганическая химия*. – 2020. – Т. 46. – Активные формы кислорода. – № 5. – С. 466–485.
201. Yu W., Tu Y., Long Z., Liu J., Kong D., Peng J., Wu H., Zheng G., Zhao J., Chen Y., Liu R., Li W., Hai C. Reactive Oxygen Species Bridge the Gap between Chronic Inflammation and Tumor Development // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2022. – Vol. 2022. – P. 2606928.
202. Backert S., Linz B., Tegtmeyer N. Helicobacter pylori-Induced Host Cell DNA Damage and Genetics of Gastric Cancer Development // *Helicobacter pylori and Gastric Cancer*/ ed. S. Backert. – 2023. – P. 185–206.
203. Machicado C., Marcos L.A. Carcinogenesis associated with parasites other than Schistosoma, Opisthorchis and Clonorchis: A systematic review // *International Journal of Cancer*. – 2016. – Vol. 138. – No. 12. – P. 2915–2921.
204. Бекиш В.Я., Зорина В.В. Генотоксические и цитотоксические эффекты в клетках хозяина при тениидозах // *Российский паразитологический журнал*. – 2016. – № 3. – С. 45–52.
205. Du L., Song J. Delivery, structure, and function of bacterial genotoxins // *Virulence*. – 2022. – Vol. 13. – No. 1. – P. 1199–1215.
206. Mäklin T., Taira A., Arredondo-Alonso S., Shao Y., Stratton M.R., Lawley T.D., Aaltonen L.A., Corander J. Geographical variation in the incidence of colorectal cancer and urinary tract cancer is associated with population exposure to

colibactin-producing *Escherichia coli* // *The Lancet Microbe*. – 2025. – Vol. 6. – № 5.

207. Wu L., Sowers J.R., Zhang Y., Ren J. Targeting DNA damage response in cardiovascular diseases: from pathophysiology to therapeutic implications // *Cardiovascular Research*. – 2023. – Vol. 119. – № 3. – P. 691–709.

208. Delint-Ramirez I., Madabhushi R. DNA damage and its links to neuronal aging and degeneration // *Neuron*. – 2025. – Vol. 113. – No. 1. – P. 7–28.

209. Souliotis V.L., Vlachogiannis N.I., Pappa M., Argyriou A., Ntouros P.A., Sfikakis P.P. DNA Damage Response and Oxidative Stress in Systemic Autoimmunity // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – No. 1. – P. 55.

210. Sohn J., Lee S.-E., Shim E.-Y. DNA Damage and Repair in Eye Diseases // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – No. 4. – P. 3916.

211. Milić M., Kazensky L., Matovinović M. The Impact of the Metabolic Syndrome Severity on the Appearance of Primary and Permanent DNA Damage // *Medicina*. – 2024. – Vol. 61. – № 1. – P. 21.

212. Котова Ю.А., Дугушева В.А., Анохина Ю.М., Шевцова В.И., Федорова С.А., Мельникова В.А. Оценка повреждения ДНК методом ДНК-комет у коморбидных пациентов кардиологического и эндокринологического профиля // *Качественная клиническая практика*. – 2025. – Т. 0. – № 2. – С. 74–81.

213. Neofytou E., Tzortzaki E.G., Chatziantoniou A., Siafakas N.M. DNA Damage Due to Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2012. – Vol. 13. – No. 12. – P. 16853–16864.

214. Czarny P., Wigner P., Galecki P., Sliwinski T. The interplay between inflammation, oxidative stress, DNA damage, DNA repair and mitochondrial dysfunction in depression: Peripheral markers of inflammation, oxidative & nitrosative stress pathways and memory functions as a new target of

pharmacotherapy in depression // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 2018. – Vol. 80. – P. 309–321.

215. Raza M.U., Tufan T., Wang Y., Hill C., Zhu M.-Y. DNA damage in major psychiatric diseases // *Neurotoxicity research*. – 2016. – Vol. 30. – № 2. – P. 251–267.

216. Chavda V.P., Feehan J., Apostolopoulos V. Inflammation: The Cause of All Diseases // *Cells*. – 2024. – Vol. 13. – № 22. – P. 1906.

217. Furman D., Campisi J., Verdin E., Carrera-Bastos P., Targ S., Franceschi C., Ferrucci L., Gilroy D.W., Fasano A., Miller G.W., Miller A.H., Mantovani A., Weyand C.M., Barzilai N., Goronzy J.J., Rando T.A., Effros R.B., Lucia A., Kleinstreuer N., Slavich G.M. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span // *Nature medicine*. – 2019. – Vol. 25. – № 12. – P. 1822–1832.

218. Chandimali N., Bak S.G., Park E.H., Lim H.-J., Won Y.-S., Kim E.-K., Park S.-I., Lee S.J. Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: a review // *Cell Death Discovery*. – 2025. – Vol. 11. – P. 19.

219. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: Часть первая. – Москва: Гриф и К, 2012. – 944 с.

220. ICH S2 (R1) Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. – 2012.

221. ICH M3(R2) Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals. – 2009.

222. ГОСТ Р 57130-2016. Лекарственные средства для медицинского применения. Исследование генотоксичности и интерпретация полученных данных. – Москва, Стандартинформ, 2016.

223. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26 ноября 2019 г. N 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов» (в ред. от 11.10.2022 г.).

224. Elespuru R., Pfuhler S., Aardema M.J., Chen T., Doak S.H., Doherty A., Farabaugh C.S., Kenny J., Manjanatha M., Mahadevan B., Moore M.M., Ouédraogo

G., Stankowski L.F. Jr, Tanir J.Y. Genotoxicity Assessment of Nanomaterials: Recommendations on Best Practices, Assays, and Methods // Toxicological Sciences. – 2018. – Vol. 164. – № 2. – P. 391–416.

225. Elespuru R.K., Doak S.H., Collins A.R., Dusinska M., Pfuhler S., Manjanatha M., Cardoso R., Chen C.L. Common Considerations for Genotoxicity Assessment of Nanomaterials // Frontiers in Toxicology. – 2022. – Vol. 4. – P. 859122.

226. OECD. Study Report and Preliminary Guidance on the Adaptation of the *In Vitro* Micronucleus Assay (OECD TG 487) for Testing of Manufactured Nanomaterials. Series on Testing and Assessment No. 359. – ENV/CBC/MONO(2022)15, 2022.

227. Kang H., Park H.J., Kang J., Hwang Y., Lee Y., Park S.-U., Kim J., Lee K.H., Jang S. Advances in DNA damage detection: Current progress, challenges, and future directions // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2025. – Vol. 189. – P. 118246.

228. Yu Y., Wang P., Cui Y., Wang Y. Chemical Analysis of DNA Damage // Analytical chemistry. – 2018. – Vol. 90. – № 1. – P. 556–576.

229. Tretyakova N., Villalta P.W., Kotapati S. Mass Spectrometry of Structurally Modified DNA // Chemical reviews. – 2013. – Vol. 113. – № 4. – P. 2395–2436.

230. Liu S., Wang Y. Mass spectrometry for the assessment of the occurrence and biological consequences of DNA adducts // Chemical Society Reviews. – 2015. – Vol. 44. – No. 21. – P. 7829–7854.

231. Kohn K.W., Grimek-Ewig R.A. Alkaline elution analysis, a new approach to the study of DNA single-strand interruptions in cells // Cancer Research. – 1973. – Vol. 33. – № 8. – P. 1849–1853.

232. Birnboim H.C., Jevcak J.J. Fluorometric method for rapid detection of DNA strand breaks in human white blood cells produced by low doses of radiation // Cancer Research. – 1981. – Vol. 41. – № 5. – P. 1889–1892.

233. Ostling O., Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1984. – Vol. 123. – № 1. – P. 291–298.

234. Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells // Experimental Cell Research. – 1988. – Vol. 175. – № 1. – P. 184–191.

235. Muruzabal D., Collins A., Azqueta A. The enzyme-modified comet assay: Past, present and future // Food and Chemical Toxicology. – 2021. – Vol. 147. – P. 111865.

236. Muruzabal D., Sanz-Serrano J., Sauvaigo S., Treillard B., Olsen A.-K., López de Cerain A., Vettorazzi A., Azqueta A. Validation of the *in vitro* comet assay for DNA cross-links and altered bases detection // Archives of Toxicology. – 2021. – Vol. 95. – No. 8. – P. 2825–2838.

237. Glei M., Hovhannisyanyan G., Pool-Zobel B.L. Use of Comet-FISH in the study of DNA damage and repair: Review: Celebrating the 20th Anniversary of the Invention of the Comet Assay // Mutation Research/Reviews in Mutation Research. – 2009. – Vol. 681. – № 1. – P. 33–43.

238. Lorenzo Y., Costa S., Collins A.R., Azqueta A. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead // Mutagenesis. – 2013. – Vol. 28. – № 4. – P. 427–432.

239. Beevers C., Uno Y., Meurer K., Hamada S., Hashimoto K., Kirkland D., LeBaron M.J., Le Curieux F., Le Hegarat L., Martus H.-J., Masumura K., Ohyama W., Roberts D.J., Vasquez M., Whitwell J., Witt K.L. *In vivo* genotoxicity testing strategies: Report from the 8th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT) // Environmental and Molecular Mutagenesis. – 2023.

240. Kelly C.M., Latimer J.J. Unscheduled DNA Synthesis // Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). – 2005. – Vol. 291. – P. 303–320.

241. Nesslany F. Unscheduled DNA synthesis (UDS) test with mammalian liver cells *in vivo* // Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.). – 2013. – Vol. 1044. – P. 373–387.

242. Quillardet P., de Bellecombe C., Hofnung M. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds // *Mutation Research*. – 1985. – Vol. 147. – № 3. – P. 79–95.

243. Игони́на Е.В., Марсова М.В., Аби́лев С.К. Лух-биосенсоры: скрининг биологически активных соединений на генотоксичность // *Экологическая генетика*. – 2016. – Т. 14. – № 4. – С. 52–62.

244. Luzy A.-P., Orsini N., Linget J.-M., Bouvier G. Evaluation of the GADD45 α -GFP GreenScreen HC assay for rapid and reliable *in vitro* early genotoxicity screening // *Journal of applied toxicology: JAT*. – 2013. – Vol. 33. – № 11. – P. 1303–1315.

245. Simpson K., Bevan N., Hastwell P., Eidam P., Shah P., Gogo E., Rees S., Brown A. The BlueScreen-384 assay as an indicator of genotoxic hazard potential in early-stage drug discovery // *Journal of Biomolecular Screening*. – 2013. – Vol. 18. – № 4. – P. 441–452.

246. Końca K., Lankoff A., Banasik A., Lisowska H., Kuszewski T., Gózdź S., Koza Z., Wojcik A. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay // *Mutation Research*. – 2003. – Vol. 534. – № 1–2. – P. 15–20.

247. Gureev A.P., Shaforostova E.A., Starkov A.A., Popov V.N. Simplified qPCR method for detecting excessive mtDNA damage induced by exogenous factors // *Toxicology*. – 2017. – Vol. 382. – P. 67–74.

248. Preston R.J., Dean B.J., Galloway S., Holden H., McFee A.F., Shelby M. Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells // *Mutation Research*. – 1987. – Vol. 189. – № 2. – P. 157–165.

249. Savage J.R. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. // *Journal of Medical Genetics*. – 1976. – Vol. 13. – № 2. – P. 103–122.

250. Furman B.L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats // *Current Protocols in Pharmacology*. – 2015. – Vol. 70. – P. 5.47.1–5.47.20.

251. Кры́жановский С.А., Ко́лик Л.Г., Цо́рин И.Б., Столя́рук В.Н., Ви́тинова М.Б., Ио́нова Е.О., Со́рокина А.В., Ду́рнев А.Д. Алкогольная

кардиомиопатия: трансляционная модель // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 163. – № 5. – С. 582–586.

252. Janssen K., Schlink K., Götte W., Hippler B., Kaina B., Oesch F. DNA repair activity of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) in human lymphocytes is not dependent on genetic polymorphism Ser326/Cys326 // *Mutation Research*. – 2001. – Vol. 486. – № 3. – P. 207–216.

253. Wood J.P., DeSantis L., Chao H.M., Osborne N.N. Topically applied betaxolol attenuates ischaemia-induced effects to the rat retina and stimulates BDNF mRNA // *Experimental Eye Research*. – 2001. – Vol. 72. – № 1. – P. 79–86.

254. Brunborg G., Rolstadaas L., Gutzkow K.B. Electrophoresis in the comet assay // *Electrophoresis - Life Sciences Practical Applications*. – London: Intech Open, 2018. – P. 63–80.

255. Sambrook J., Russel D.W. *Molecular Cloning - A Laboratory manual*. – 3. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – 565 P.

256. Olive P.L., Banáth J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells // *Nature Protocols*. – 2006. – Vol. 1. – № 1. – P. 23–29.

257. OECD. Test No. 489: *In Vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay. – OECD Publishing, 2016.

258. Gutzkow K.B., Langleite T.M., Meier S., Graupner A., Collins A.R., Brunborg G. High-throughput comet assay using 96 minigels // *Mutagenesis*. – 2013. – Vol. 28. – № 3. – P. 333–340.

259. Azqueta A., Muruzabal D., Boutet-Robinet E., Milic M., Dusinska M., Brunborg G., Møller P., Collins A.R. Technical recommendations to perform the alkaline standard and enzyme-modified comet assay in human biomonitoring studies // *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. – 2019. – Vol. 843. – P. 24–32.

260. Collins A.R., El Yamani N., Lorenzo Y., Shaposhnikov S., Brunborg G., Azqueta A. Controlling variation in the comet assay // *Frontiers in Genetics*. – 2014. – Vol. 5. – P. 359.

261. Roy M., Hamel A., Cardoso R. Effect of slide positioning in electrophoresis chamber over comet assay results. – Charles River Laboratories, 2015.

262. Brody J.R., Kern S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis // *BioTechniques*. – 2004. – Vol. 36. – № 2. – P. 214–216.

263. Dertinger S.D., Li D., Beevers C., Douglas G.R., Heflich R.H., Lovell D.P., Roberts D.J., Smith R., Uno Y., Williams A., Witt K.L., Zeller A., Zhou C. Assessing the Quality and Making Appropriate Use of Historical Negative Control Data: A Report of the International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT) // *Environmental and molecular mutagenesis*. – 2023. – P. 10.1002/em.22541.

264. Ариффулин Е.А., Брагина Е.Е., Замятина В.А., Волкова Е.Г., Шеваль Е.В., Гольшев С.А., Кинцурашвили Л.Н., Кирьянов Г.И., Прусов А.Н., Поляков Ю.В. Компактизация ДНК в сперматогенезе человека. I. Динамика компактизации нуклеогистонного и нуклеопротаминного хроматина в дифференцирующихся сперматидях // *Онтогенез*. – 2012. – Т. 43. – № 2. – С. 143–153.

265. Miyamae Y., Iwasaki K., Kinae N., Tsuda S., Murakami M., Tanaka M., Sasaki Y.F. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay.: 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. – 1997. – Vol. 393. – № 1. – P. 107–113.

266. Thiyagarajan B., Valivittan K. Ameliorating effect of vitamin E on *in vitro* development of preimplantation buffalo embryos // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2009. – Vol. 26. – № 4. – P. 217–225.

267. Fabian D., Reháč P., Czikková S., Il'ková G., Baran V., Koppel J. Induced cell death of preimplantation mouse embryos cultured *in vitro* evaluated by comet assay // *Theriogenology*. – 2003. – Vol. 60. – № 4. – P. 691–706.

268. Sturmeý R.G., Hawkhead J.A., Barker E.A., Leese H.J. DNA damage and metabolic activity in the preimplantation embryo // *Human Reproduction* (Oxford, England). – 2009. – Vol. 24. – № 1. – P. 81–91.

269. Rolland L., Courbiere B., Tassistro V., Sansoni A., Orsière T., Liu W., Di Giorgio C., Perrin J. Comet assay on thawed embryos: An optimized technique to evaluate DNA damage in mouse embryos // *Toxicology in Vitro*. – 2017. – Vol. 44. – P. 266–272.

270. Gajski G., Ravlić S., Godschalk R., Collins A., Dusinska M., Brunborg G. Application of the comet assay for the evaluation of DNA damage in mature sperm // *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*. – 2021. – Vol. 788. – P. 108398.

271. Zini A., Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction // *CMAJ: Canadian Medical Association journal*. – 2006. – Vol. 175. – № 5. – P. 495–500.

272. Cortés-Gutiérrez E.I., López-Fernández C., Fernández J.L., Dávila-Rodríguez M.I., Johnston S.D., Gosálvez J. Interpreting sperm DNA damage in a diverse range of mammalian sperm by means of the two-tailed comet assay // *Frontiers in Genetics*. – 2014. – Vol. 5. – P. 404.

273. Singh N.P., Danner D.B., Tice R.R., McCoy M.T., Collins G.D., Schneider E.L. Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm // *Experimental Cell Research*. – 1989. – Vol. 184. – № 2. – P. 461–470.

274. Harrouk W., Codrington A., Vinson R., Robaire B., Hales B.F. Paternal exposure to cyclophosphamide induces DNA damage and alters the expression of DNA repair genes in the rat preimplantation embryo // *Mutation Research/DNA Repair*. – 2000. – Vol. 461. – № 3. – P. 229–241.

275. Barton T.S., Robaire B., Hales B.F. DNA damage recognition in the rat zygote following chronic paternal cyclophosphamide exposure // *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*. – 2007. – Vol. 100. – № 2. – P. 495–503.

276. Dutson S.M., Booth G.M., Schaalje G.B., Castle R.N., Seegmiller R.E. Comparative developmental dermal toxicity and mutagenicity of carbazole and benzo[a]carbazole // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 1997. – Vol. 16. – No. 10. – P. 2113–2117.

277. Jha A.M., Singh A.C., Bharti M.K. Clastogenicity of carbazole in mouse bone marrow cells *in vivo* // *Mutation Research*. – 2002. – Vol. 521. – № 1–2. – P. 11–17.

278. Noll D.M., Mason T.M., Miller P.S. Formation and Repair of Interstrand Cross-Links in DNA // *Chemical reviews*. – 2006. – Vol. 106. – № 2. – P. 277–301.

279. Azqueta A., Arbillaga L., López de Cerain A., Collins A. Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG // *Mutagenesis*. – 2013. – Vol. 28. – № 3. – P. 271–277.

280. Каратеев А.Е. Простой анальгетик парацетамол // *Русский медицинский журнал*. – 2010. – № 9. – С. 581–591.

281. Зайцева О.В. Применение анальгетиков-антипиретиков в педиатрии // *Педиатрическая фармакология*. – 2008. – № 2. – С. 76–81.

282. Oshida K., Iwanaga E., Miyamoto-Kuramitsu K., Miyamoto Y. An *in vivo* comet assay of multiple organs (liver, kidney and bone marrow) in mice treated with methyl methanesulfonate and acetaminophen accompanied by hematology and/or blood chemistry // *The Journal of Toxicological Sciences*. – 2008. – Vol. 33. – № 5. – P. 515–524.

283. Hongslo J.K., Smith C.V., Brunborg G., Söderlund E.J., Holme J.A. Genotoxicity of paracetamol in mice and rats // *Mutagenesis*. – 1994. – Vol. 9. – № 2. – P. 93–100.

284. Li J.H., Lin L.F. Genetic toxicology of abused drugs: a brief review // *Mutagenesis*. – 1998. – Vol. 13. – № 6. – P. 557–565.

285. Guillot E., de Mazancourt P., Durigon M., Alvarez J.-C. Morphine and 6-acetylmorphine concentrations in blood, brain, spinal cord, bone marrow and bone after lethal acute or chronic diacetylmorphine administration to mice // *Forensic Science International*. – 2007. – Vol. 166. – № 2–3. – P. 139–144.

286. Nicolae C.-L., Pîrvulescu D.-C., Antohi A.M., Niculescu A.G., Grumezescu A.M., Croitoru G.-A. Silica nanoparticles in medicine: overcoming pathologies through advanced drug delivery, diagnostics, and therapeutic strategies // *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. – 2024. – Vol. 65. – № 2. – P. 173–184.

287. Koloskova O.O., Gileva A.M., Drozdova M.G., Grechihina M.V., Suzina N.E., Budanova U.A., Sebyakin Y.L., Kudlay D.A., Shilovskiy I.P., Sapozhnikov A.M., Kovalenko E.I., Markvicheva E.A., Khaitov M.R. Effect of lipopeptide structure on gene delivery system properties: Evaluation in 2D and 3D models // *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*. – 2018. – Vol. 167. – P. 328–336.

288. Cullis A.G., Canham L.T., Calcott P.D.J. The structural and luminescence properties of porous silicon // *Journal of Applied Physics*. – 1997. – Vol. 82. – № 3. – P. 909–965.

289. Тимошенко В.Ю., Кудрявцев А.А., Осминкина Л.А., Воронцов А.С., Рябчиков Ю.В., Белогорохов И.А., Ковалев Д.К., Кашкаров П.К. Кремниевые нанокристаллы как фотосенсибилизаторы активного кислорода для биомедицинских применений // *Письма в Журнал экспериментальной и теоретической физики*. – 2006. – № 9. – С. 492–495.

290. Durnev A.D., Daugel-Dauge N.O., Korkina L.G., Seredenin S.B. Peculiarities of the clastogenic properties of chrysotile-asbestos fibers and zeolite particles // *Mutation Research/Genetic Toxicology*. – 1993. – Vol. 319. – № 4. – P. 303–308.

291. Турецкий Е.А., Колоскова О.О., Носова А.С., Шиловский И.П., Себякин Ю.Л., Хаитов М.Р. Физико-химические свойства комплексов молекул миРНК и липосом на основе липопептидов // *Биомедицинская химия*. – 2017. – Т. 63. – № 5. – С. 472–475.

292. Смирнов В.В., Раменская Г.В., Красных Л.М., Колоскова О.О., Ковчина В.И., Шиловский И.П., Хаитов М.Р. Фармакокинетика инновационного липосомального препарата для лечения гепатита С //

Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81. – № 12. – С. 20–24.

293. Osaka G., Carey K., Cuthbertson A., Godowski P., Patapoff T., Ryan A., Gadek T., Mordenti J. Pharmacokinetics, tissue distribution, and expression efficiency of plasmid [³³P]DNA following intravenous administration of DNA/cationic lipid complexes in mice: use of a novel radionuclide approach // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1996. – Vol. 85. – № 6. – P. 612–618.

294. Landsiedel R., Kapp M.D., Schulz M., Wiench K., Oesch F. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations--many questions, some answers // Mutation Research. – 2009. – Vol. 681, № 2–3. – P. 241–258.

295. Manke A., Wang L., Rojanasakul Y. Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity // BioMed Research International. – 2013. – Vol. 2013. – P. 942916.

296. Gustafson H.H., Holt-Casper D., Grainger D.W., Ghandehari H. Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem // Nano Today. – 2015. – Vol. 10. – № 4. – P. 487–510.

297. Liu X., Sui B., Sun J. Blood-brain barrier dysfunction induced by silica NPs *in vitro* and *in vivo*: Involvement of oxidative stress and Rho-kinase/JNK signaling pathways // Biomaterials. – 2017. – Vol. 121. – P. 64–82.

298. Doktorovova S., Silva A.M., Gaivão I., Souto E.B., Teixeira J.P., Martins-Lopes P. Comet assay reveals no genotoxicity risk of cationic solid lipid nanoparticles // Journal of applied toxicology: JAT. – 2014. – Vol. 34. – № 4. – P. 395–403.

299. Omidi Y., Barar J., Heidari H.R., Ahmadian S., Yazdi H.A., Akhtar S. Microarray analysis of the toxicogenomics and the genotoxic potential of a cationic lipid-based gene delivery nanosystem in human alveolar epithelial a549 cells // Toxicology Mechanisms and Methods. – 2008. – Vol. 18. – № 4. – P. 369–378.

300. Bausinger J., Speit G. The impact of lymphocyte isolation on induced DNA damage in human blood samples measured by the comet assay // *Mutagenesis*. – 2016. – Vol. 31. – № 5. – P. 567–572.

301. Юсупова А.О. Алкогольная кардиомиопатия: основные аспекты эпидемиологии, патогенеза и лекарственной терапии // *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. – 2014. – Т. 10. – № 6. – С. 651–658.

302. Румянцев А.Г. Иммунные механизмы повреждений и последствий перинатальных инфекций для матери и ребенка // *Педиатрия им. Г.Н. Сперанского*. – 2025. – Т. 104. – № 3. – С. 8–15.

303. Lydholm C.N., Köhler-Forsberg O., Nordentoft M., Yolken R.H., Mortensen P.B., Petersen L., Benros M.E. Parental Infections Before, During, and After Pregnancy as Risk Factors for Mental Disorders in Childhood and Adolescence: A Nationwide Danish Study // *Biological Psychiatry*. – 2019. – Vol. 85. – № 4. – P. 317–325.

304. Bucknor M.C., Gururajan A., Dale R.C., Hofer M.J. A comprehensive approach to modeling maternal immune activation in rodents // *Frontiers in Neuroscience*. – 2022. – Vol. 16.

305. Островская Р.У., Ягубова С.С., Жанатаев А.К., Анисина Е.А., Гудашева Т.А., Дурнев А.Д. Нейропротективный дилепт ноопепт предотвращает повреждения ДНК на модели преддиабета у мышей // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – Т. 168. – № 8. – С. 185–190.

306. Chen J., Kadlubar F.F., Chen J.Z. DNA supercoiling suppresses real-time PCR: a new approach to the quantification of mitochondrial DNA damage and repair // *Nucleic Acids Research*. – 2007. – Vol. 35. – № 4. – P. 1377–1388.

307. Буеверов А.О., Зилов А.В. Поражение печени при сахарном диабете 1-го типа // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. – 2021. – Т. 31. – № 2. – С. 7–13.

308. Маслова О.В., Сунцов Ю.И., Шестакова М.В., Казаков И.В., Викулова О.К., Сухарева О.Ю., Мартынов С.А., Трубицына Н.П.

Распространенность поражения почек при сахарном диабете 1 и 2 типов в Российской Федерации // Сахарный диабет. – 2009. – Т. 12. – № 4. – С. 47–51.

309. 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.

310. 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.

311. Wang S., Ren J. Role of autophagy and regulatory mechanisms in alcoholic cardiomyopathy // Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease. – 2018. – Vol. 1864. – № 6 Pt A. – P. 2003–2009.

312. Tu X., Wang C., Ru X., Jing L., Zhou L., Jing L. Therapeutic effects of rapamycin on alcoholic cardiomyopathy // Experimental and Therapeutic Medicine. – 2017. – Vol. 14. – № 4. – P. 2763–2770.

313. Saito T., Asai K., Sato S., Hayashi M., Adachi A., Sasaki Y., Takano H., Mizuno K., Shimizu W. Autophagic vacuoles in cardiomyocytes of dilated cardiomyopathy with initially decompensated heart failure predict improved prognosis // Autophagy. – 2016. – Vol. 12. – № 3. – P. 579–587.

314. Shimomura H., Terasaki F., Hayashi T., Kitaura Y., Isomura T., Suma H. Autophagic degeneration as a possible mechanism of myocardial cell death in dilated cardiomyopathy // Japanese Circulation Journal. – 2001. – Vol. 65. – № 11. – P. 965–968.

315. Мирошкина И.А. Оценка кардиопротективных свойств фабомотизола на моделях инфаркта миокарда и алкогольной кардиомиопатии : Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / И.А. Мирошкина. – Москва: ГУ Научно-исследовательский институт общей реаниматологии РАМН, 2022. – 173 с.

316. McEwan F., Glazier J.D., Hager R. The impact of maternal immune activation on embryonic brain development // *Frontiers in Neuroscience*. – 2023. – Vol. 17. – P. 1146710.

317. Lanté F., Meunier J., Guiramand J., Maurice T., Cavalier M., de Jesus Ferreira M.-C., Aimar R., Cohen-Solal C., Vignes M., Barbanel G. Neurodevelopmental damage after prenatal infection: Role of oxidative stress in the fetal brain // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2007. – Vol. 42. – № 8. – P. 1231–1245.

318. Simões L.R., Sangiogo G., Tashiro M.H., Generoso J.S., Faller C.J., Dominguni D., Mastella G.A., Scaini G., Giridharan V.V., Michels M., Florentino D., Petronilho F., Réus G.Z., Dal-Pizzol F., Zugno A.I., Barichello T. Maternal immune activation induced by lipopolysaccharide triggers immune response in pregnant mother and fetus, and induces behavioral impairment in adult rats // *Journal of Psychiatric Research*. – 2018. – Vol. 100. – P. 71–83.

319. He S., Wang J., Cao S., Wang A., Wang Y., Li P., Cao X., Cheng R., Chen R., Wang Y., Yang F., Fu Y., Peng Y., Li H., Xia W., Zhu Z., Liu H., Xu S. Maternal oxidative stress throughout pregnancy and early childhood neurodevelopment at different stages: insights from a prospective cohort study // *BMC Medicine*. – 2025. – Vol. 23. – P. 463.

320. Craig S.A.S. Betaine in human nutrition // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2004. – Vol. 80. – № 3. – P. 539–549.

321. Zhao G., He F., Wu C., Li P., Li N., Deng J., Zhu G., Ren W., Peng Y. Betaine in Inflammation: Mechanistic Aspects and Applications // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1070.

322. Khodayar M.J., Kalantari H., Khorsandi L., Rashno M., Zeidooni L. Betaine protects mice against acetaminophen hepatotoxicity possibly via mitochondrial complex II and glutathione availability // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2018. – Vol. 103. – P. 1436–1445.

323. Patel D., Yadav P., Singh S.K., Tanwar S.S., Sehrawat A., Khurana A., Bhatti J.S., Navik U. Betaine alleviates doxorubicin-induced nephrotoxicity by

preventing oxidative insults, inflammation, and fibrosis through the modulation of Nrf2/HO-1/NLRP3 and TGF- β expression // Journal of Biochemical and Molecular Toxicology. – 2024. – Vol. 38. – № 1. – P. e23559.

324. Jaiswal A., Rawat P.S., Singh S.K., Bhatti J.S., Khurana A., Navik U. Betaine Intervention as a Novel Approach to Preventing Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity // Advances in Redox Research. – 2023. – Vol. 9. – P. 100084.

325. Kimura S., Hayatsu H., Arimoto-Kobayashi S. Glycine betaine in beer as an antimutagenic substance against 2-chloro-4-methylthiobutanoic acid, the sanma-fish mutagen // Mutation Research. – 1999. – Vol. 439. – № 2. – P. 267–276.

326. Merk O., Speit G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity // Environmental and Molecular Mutagenesis. – 1999. – Vol. 33. – № 2. – P. 167–172.

327. Madadi E., Mazloun-Ravasan S., Yu J.S., Ha J.W., Hamishehkar H., Kim K.H. Therapeutic Application of Betalains: A Review // Plants (Basel, Switzerland). – 2020. – Vol. 9. – № 9. – P. 1219.

328. Edenharder R., Frangart J., Hager M., Hofmann P., Rauscher R. Protective effects of fruits and vegetables against *in vivo* clastogenicity of cyclophosphamide or benzo[a]pyrene in mice // Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association. – 1998. – Vol. 36. – № 8. – P. 637–645.

329. Tan M.L., Hamid S.B.S. Beetroot as a Potential Functional Food for Cancer Chemoprevention, a Narrative Review // Journal of Cancer Prevention. – 2021. – Vol. 26. – № 1. – P. 1–17.

330. Lechner J.F., Stoner G.D. Red Beetroot and Betalains as Cancer Chemopreventative Agents // Molecules. – 2019. – Vol. 24. – № 8. – P. 1602.

331. Park R., Amin M., Trikalinos N.A. Temozolomide duration and secondary hematological neoplasms: A literature review and implications for patients with neuroendocrine neoplasms // Journal of Neuroendocrinology. – 2022. – Vol. 34. – № 7. – P. e13178.

332. Luca V.S., Miron A., Aprotosoiaie A.C. The antigenotoxic potential of dietary flavonoids // *Phytochemistry Reviews*. – 2016. – Vol. 15. – No. 4. – P. 591–625.

333. Shimazu R., Anada M., Miyaguchi A., Nomi Y., Matsumoto H. Evaluation of Blood-Brain Barrier Permeability of Polyphenols, Anthocyanins, and Their Metabolites // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2021. – Vol. 69. – № 39. – P. 11676–11686.

334. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), Turck D., Bresson J., Burlingame B., Dean T., Fairweather-Tait S., Heinonen M., Hirsch-Ernst K.I., Mangelsdorf I., McArdle H.J., Naska A., Neuhäuser-Berthold M., Nowicka G., Pentieva K., Sanz Y., Siani A., Sjödin A., Stern M., Tomé D., Vinceti M., Willatts P., Engel K., Marchelli R., Pöting A., Poulsen M., Schlatter J.R., Turla E., van Loveren H. Safety of betaine as a novel food pursuant to Regulation (EC) No 258/97 // *EFSA Journal*. – 2017. – Vol. 15. – No. 11.

335. EFSA Panel on Food Additives and Flavourings (FAF), Younes M., Aquilina G., Castle L., Degen G., Engel K., Fowler P.J., Frutos Fernandez M.J., Fürst P., Gundert-Remy U., Gürtler R., Husøy T., Manco M., Moldeus P., Passamonti S., Shah R., Waalkens-Berendsen I., Wright M., Benigni R., Bolognesi C., Chipman K., Cordelli E., Nørby K., Svendsen C., Carfi M., Dino B., Gagliardi G., Mech A., Multari S., Mennes W. Flavouring Group Evaluation 413 (FGE.413): Naringenin // *EFSA Journal*. – 2024. – Vol. 22. – No. 5.

336. Wang M., Firman J., Liu L., Yam K. A Review on Flavonoid Apigenin: Dietary Intake, ADME, Antimicrobial Effects, and Interactions with Human Gut Microbiota // *BioMed Research International*. – 2019. – Vol. 2019. – P. 7010467.

337. EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA), Turck D., Bohn T., Castenmiller J., De Henauw S., Hirsch-Ernst K.I., Maciuk A., Mangelsdorf I., McArdle H.J., Naska A., Pentieva K., Siani A., Thies F., Tsabouri S., Vinceti M., Aguilera-Gómez M., Cubadda F., Frenzel T., Heinonen M., Neuhäuser-Berthold M., Poulsen M., Maradona M.P., Schlatter J.R., Siskos A., van Loveren H., Kouloura E., Matijević L., Knutsen H.K. Safety of glucosyl

hesperidin as a Novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283 // *EFSA Journal*. – 2024. – Vol. 22. – No. 8.

338. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) Scientific Opinion on the re-evaluation of beetroot red (E 162) as a food additive // *EFSA Journal*. – 2015. – Vol. 13. – No. 12.

339. Забродина В.В., Шредер О.В., Шредер Е.Д., Дурнев А.Д. Влияние “Афобазола” и бетаина на нарушения когнитивных способностей у потомства крыс со стрептозотоциновым диабетом и их связь с повреждениями ДНК // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2016. – Т. 161. – № 3. – С. 335–342.

340. Durnev A.D., Tjurina L.S., Guseva N.V., Oreshchenko A.V., Volgareva G.M., Seredenin S.B. The influence of two carotenoid food dyes on clastogenic activities of cyclophosphamide and dioxidine in mice // *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. – 1998. – Vol. 36. – № 1. – P. 1–5.

341. Takata J., Kiura K., Nakasuka T., Hirabae A., Arimoto-Kobayashi S. Chemo-preventive effects and antitumorigenic mechanisms of beer and nonalcoholic beer toward 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) - induced lung tumorigenesis in A/J mice // *Genes and Environment*. – 2023. – Vol. 45. – № 1. – P. 19.

342. Schwinn K.E. The dope on L-DOPA formation for betalain pigments // *The New Phytologist*. – 2016. – Vol. 210. – № 1. – P. 6–9.

343. Billacura M.B., Lydia M.B. Antimutagenic potentials of L-tyrosine and its metabolites on the genotoxic activity induced by methyl methanesulfonate // *International Journal of Advanced and Applied Sciences*. – 2017. – Vol. 4. – No. 11. – P. 104–109.

344. Krajka-Kuźniak V., Szaefer H., Ignatowicz E., Adamska T., Baer-Dubowska W. Beetroot juice protects against N-nitrosodiethylamine-induced liver injury in rats // *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published*

for the British Industrial Biological Research Association. – 2012. – Vol. 50. – № 6. – P. 2027–2033.

345. Szaefer H., Krajka-Kuźniak V., Ignatowicz E., Adamska T., Baer-Dubowska W. Evaluation of the effect of beetroot juice on DMBA-induced damage in liver and mammary gland of female Sprague-Dawley rats // *Phytotherapy research: PTR.* – 2014. – Vol. 28. – № 1. – P. 55–61.

346. Wang Y., Adekolurejo O.O., Wang B., McDermott K., Do T., Marshall L.J., Boesch C. Bioavailability and excretion profile of betacyanins - Variability and correlations between different excretion routes // *Food Chemistry.* – 2024. – Vol. 437. – № Pt 1. – P. 137663.

347. Williamson G., Kay C.D., Crozier A. The Bioavailability, Transport, and Bioactivity of Dietary Flavonoids: A Review from a Historical Perspective // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* – 2018. – Vol. 17. – № 5. – P. 1054–1112.

348. Huang W., Zhong Y., Gao B., Zheng B., Liu Y. Nrf2-mediated therapeutic effects of dietary flavones in different diseases // *Frontiers in Pharmacology.* – 2023. – Vol. 14. – P. 1240433.

349. Dresen E., Pimiento J.M., Patel J.J., Heyland D.K., Rice T.W., Stoppe C. Overview of oxidative stress and the role of micronutrients in critical illness // *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition.* – 2023. – Vol. 47. – No. S1. – P. S38–S49.

350. Капитонов В.М., Остапченко Д.А. Окислительный стресс и его коррекция у больных с тяжелой сочетанной травмой // *Общая реаниматология.* – 2010. – Т. 6. – № 4. – С. 70.

351. Шабанов А.К., Евсеев А.К., Горончаровская И.В., Бадыгов С.А., Черпаков Р.А., Кулабухов В.В., Клычникова Е.В., Боровкова Н.В., Гребенчиков О.А., Петриков С.С. Динамика показателей окислительного стресса и апоптоза у пострадавших с тяжелой сочетанной травмой // *Политравма.* – 2022. – № 4. – С. 56–65.

352. Ayala J.C., Grismaldo A., Sequeda-Castañeda L.G., Aristizábal-Pachón A.F., Morales L. Oxidative Stress in ICU Patients: ROS as Mortality Long-Term Predictor // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. 10. – No. 12. – P. 1912.

353. Servia L., Serrano J.C.E., Pamplona R., Badia M., Montserrat N., Portero-Otin M., Trujillano J. Location-dependent effects of trauma on oxidative stress in humans // *PLOS ONE*. – 2018. – Vol. 13. – No. 10. – P. e0205519.

354. Schuermans S., Kestens C., Marques P.E. Systemic mechanisms of necrotic cell debris clearance // *Cell Death & Disease*. – 2024. – Vol. 15. – № 8. – P. 557.

355. Мягкова Е.А. Повреждение клеток крови при травме и кровопотере : Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Е.А. Мягкова. – Москва: ГУ Научно-исследовательский институт общей реаниматологии РАМН, 2014. – 88 с.

356. Муравьева М.Ю. Повреждения ДНК клеток крови при тяжелой сочетанной травме : Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / М.Ю. Муравьева. – Москва: ГУ Научно-исследовательский институт общей реаниматологии РАМН, 2009. – 119 с.

357. Макаров О.В., Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Бахерева И.В., Ганковская О.А. Невынашивание беременности, инфекция, врожденный иммунитет. Невынашивание беременности, инфекция, врожденный иммунитет. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 175 с.

358. Zejnullahu V.A., Zejnullahu V.A., Kosumi E. The role of oxidative stress in patients with recurrent pregnancy loss: a review // *Reproductive Health*. – 2021. – Vol. 18. – P. 207.

359. Assani A.-D., Boldeanu L., Siloși I., Boldeanu M.V., Dijmărescu A.L., Assani M.-Z., Manolea M.-M., Văduva C.-C. Pregnancy Under Pressure: Oxidative Stress as a Common Thread in Maternal Disorders // *Life*. – 2025. – Vol. 15. – No. 9. – P. 1348.

360. Furness D.L.F., Dekker G.A., Roberts C.T. DNA damage and health in pregnancy // *Journal of Reproductive Immunology*. – 2011. – Vol. 89. – № 2. – P. 153–162.

361. Ibrahim A., Khoo M.I., Ismail E.H.E., Hussain N.H.N., Zin A.A.M., Noordin L., Abdullah S., Mahdy Z.A., Lah N.A.Z.N. Oxidative stress biomarkers in pregnancy: a systematic review // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2024. – Vol. 22. – № 1. – P. 93.

362. Гончарова В.С. Генотоксические проявления окислительного стресса в генезе невынашивания беременности : Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / В.С. Гончарова. – Москва: Рос. нац. исслед. мед. ун-т им. Н.И. Пирогова, 2016.

363. Dai X., Fan Y., Zhao X. Systemic lupus erythematosus: updated insights on the pathogenesis, diagnosis, prevention and therapeutics // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2025. – Vol. 10. – № 1. – P. 102.

364. Yan Z., Chen Q., Xia Y. Oxidative Stress Contributes to Inflammatory and Cellular Damage in Systemic Lupus Erythematosus: Cellular Markers and Molecular Mechanism // *Journal of Inflammation Research*. – 2023. – Vol. 16. – P. 453–465.

365. Lee H.-T., Wu T.-H., Lin C.-S., Lee C.-S., Wei Y.-H., Tsai C.-Y., Chang D.-M. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus - From the viewpoint of oxidative stress and mitochondrial dysfunction // *Mitochondrion*. – 2016. – Vol. 30. – P. 1–7.

366. Souliotis V.L., Vlachogiannis N.I., Pappa M., Argyriou A., Ntouros P.A., Sfikakis P.P. DNA Damage Response and Oxidative Stress in Systemic Autoimmunity // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 21. – № 1. – P. 55.

367. Ahsan H., Ali A., Ali R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2003. – Vol. 131. – № 3. – P. 398–404.

368. Lunec J., Herbert K., Blount S., Griffiths H.R., Emery P. 8-Hydroxydeoxyguanosine. A marker of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus // *FEBS letters*. – 1994. – Vol. 348. – № 2. – P. 131–138.

369. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Шредер О.В., Середенин С.Б. Антимутагенные и антитератогенные свойства афобазола // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2009. – Т. 72. – № 1. – С. 46–51.

370. Bashir S., Harris G., Denman M.A., Blake D.R., Winyard P.G. Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases // *Annals of the Rheumatic Diseases*. – 1993. – Vol. 52. – № 9. – P. 659–666.

371. Nishioka K., Ohtsubo T., Oda H., Fujiwara T., Kang D., Sugimachi K., Nakabeppu Y. Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs // *Molecular Biology of the Cell*. – 1999. – Vol. 10. – № 5. – P. 1637–1652.

372. Nishioka K., Ohtsubo T., Oda H., Fujiwara T., Kang D., Sugimachi K., Nakabeppu Y. Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs // *Molecular Biology of the Cell*. – 1999. – Vol. 10. – № 5. – P. 1637–1652.

373. Mireles-Canales M.P., González-Chávez S.A., Quiñonez-Flores C.M., León-López E.A., Pacheco-Tena C. DNA Damage and Deficiencies in the Mechanisms of Its Repair: Implications in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus // *Journal of Immunology Research*. – 2018. – Vol. 2018. – P. 8214379.

374. Ene C.D., Georgescu S.R., Tampa M., Matei C., Mitran C.I., Mitran M.I., Penescu M.N., Nicolae I. Cellular Response against Oxidative Stress, a Novel Insight into Lupus Nephritis Pathogenesis // *Journal of Personalized Medicine*. – 2021. – Vol. 11. – № 8. – P. 693.