

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора, академика РАН, заслуженного деятеля науки РФ Спасова Александра Алексеевича на диссертационную работу Жанатаева Алия Курмановича «**Значимость оценки повреждений ДНК в экспериментальных, доклинических и клинических исследованиях лекарственных средств**», представленную к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Актуальность темы выполненной работы

Одним из основополагающих принципов доклинических исследований безопасности лекарственных средств является использование методов, позволяющих получать результаты с высокой предиктивностью возможных негативных воздействий на здоровье человека. Особое внимание в этом плане имеют генотоксикологические исследования. Это обусловлено, во-первых, высокой и надежной трансляционностью их результатов, поскольку генетический код универсален для всех живых организмов, во-вторых, особой медицинской и биологической значимостью генотоксических поражений, которые имеют канцерогенную опасность.

Оценка мутагенности уже более 50 лет является неотъемлемой частью доклинических исследований вновь создаваемых лекарств. В этот период она развивалась, совершенствовалась и сегодня сложилась в систему комплексных исследований, которые позволяют надежно выявлять лекарственные средства, индуцирующие генные, хромосомные или геномные мутации. Однако, только сравнительно недавно во внимание стали принимать возможные генотоксические свойства лекарств и других химических соединений, т.е. их способность индуцировать первичные повреждения ДНК, которые ранее рассматривали исключительно как предмутационные события. Признание самостоятельной патогенетической роли повреждений ДНК потребовало дополнения сложившейся системы оценки безопасности лекарств, разработки новых методов, направленных на выявление повреждений ДНК *in vitro* и *in vivo*, методологии их применения.

Особое внимание в этом аспекте привлек метод ДНК-комет. Для его доведения до уровня экспертного метода требуется существенная практическая работа над особенностями его выполнения, влияющими на надежность, воспроизводимость и интерпретацию получаемых результатов. Актуальными направлениями приложения метода ДНК являются клинические исследования, в которых могут быть получены новые фундаментальные знания о поврежденности генома при ряде патологий, а также оценка органо- и тканеспецифичности антигенотоксических эффектов природных и синтетических соединений в рамках разработки средств защиты генома.

Таким образом, диссертационное исследование А.К.Жанатаева следует признать актуальным как для развития системы оценки безопасности новых лекарственных средств, так и для выявления новых генотоксически обусловленных звеньев патологий человека и поиска средств защиты генома человека от генотоксических воздействий.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Обоснованность положений и выводов диссертационной работы подтверждается результатами, полученными на релевантных тест-объектах и репрезентативных выборках с использованием валидированных методов и экспериментальных биомоделей, а также применением адекватных методов статистического анализа. Достоверность и полнота изложения материалов подтверждаются их апробацией на многочисленных научно-практических конференциях.

Наиболее значимые результаты были доложены на шести Международных школах по методу ДНК-комет «International Comet Assay Workshop» (ICAW), что свидетельствует о широком обсуждении работы специалистами в соответствующей области.

Достоверность и новизна полученных результатов, выводов и рекомендаций

В рамках выполнения диссертационной работы впервые предложено решение проблемы вариабельности данных в методе ДНК-комет, что повысило достоверность и воспроизводимость получаемых с его использованием экспериментальных данных.

Впервые показано, что индуцируемые в ооцитах повреждения ДНК выявляются у предимплантационных эмбрионов, полученных от экспонированных животных. Впервые установлены генотоксические эффекты морфина. Установлены закономерности проявления генотоксичности наноматериалов в зависимости от дозы, времени воздействия и типа исследуемых органов и тканей.

На экспериментальных биомоделях сахарного диабета и перинатальной иммунной активации впервые установлена и охарактеризована органоспецифичность эндогенной поврежденности ДНК, на модели диабета впервые продемонстрирована возможность ее фармакологической коррекции с использованием антигенотоксикантов. Получены пилотные экспериментальные данные, указывающие на потенциальную роль повреждений митохондриальной ДНК в патогенезе этих заболеваний.

Для ряда природных соединений с использованием двух различных генотоксических конечных точек установлены выраженные, характеризующиеся органо- и тканеспецифичностью антигенотоксические эффекты. Впервые предложен и экспериментально подтвержден принцип целевой антигенотоксической защиты органов и тканей организма – таргетного антимуtagenеза.

Впервые с использованием метода ДНК-комет у пациентов с тяжелой сочетанной травмой, невынашиванием беременности и системной красной волчанкой проведены оценка и мониторинг эндогенной генотоксичности в клетках крови. Впервые показано, что высокий уровень поврежденности ДНК в клетках крови пациентов с системной красной волчанкой связан с нарушением экспрессии гена *hOGG1*, отвечающего за репарацию окислительно-модифицированного гуанина. Снижение поврежденности ДНК и повышение устойчивости клеток крови к *ex vivo* генотоксическому воздействию у пациентов с системной красной волчанкой при приеме фабомотизола является первым примером успешной лекарственной антигенотоксической коррекции у человека в клинике.

По совокупности проведенных исследований повреждение ДНК определен как универсальный трансляционный биомаркер генотоксичности в экспериментальных, доклинических и клинических исследованиях лекарственных средств.

Научно-практическая значимость

Предложены методические решения, обеспечивающие сходимость и воспроизводимость данных метода ДНК-комет, что повышает точность и надежность получаемых с его использованием результатов при решении широкого круга задач в области биомедицинских исследований.

Разработаны экспериментальные приемы оценки повреждений ДНК методом ДНК-комет в половых и эмбриональных клетках, что заполняет существующий на сегодня методический пробел по определению у лекарственных средств потенциальных наследуемых генотоксических нарушений.

Определены критические моменты методологии проведения доклинической оценки генотоксичности лекарственных средств на основе наноматериалов – оценка эффектов при длительных сроках экспозиции, приоритетность оценки повреждений ДНК методом ДНК-комет, позволяющим выявить органо- и тканеспецифические эффекты, использование цельной периферической крови в качестве *in vitro* чувствительной тест-системы.

Экспериментальные данные, полученные на биомоделях сахарного диабета и перинатальной иммунной активации, позволяют перейти к целенаправленному поиску фармакологических корректоров генотоксических эффектов при этих патологиях и обосновывают актуальность подобных исследований для широкого спектра заболеваний, сопровождающихся повреждением ДНК. Сведения о специфике спонтанной поврежденности ДНК и клеточной гибели в кардиомиоцитах определяют новое перспективное направление исследований в области разработки кардиопротективных средств.

Продемонстрирована перспективность разработки бетанина и апигенина, а также их вновь синтезированных производных, в качестве сопроводительных лекарственных средств, предназначенных для защиты нецелевых органов/тканей от побочных эффектов противоопухолевой терапии.

В клинических исследованиях показана высокая эффективность метода ДНК-комет для оценки и мониторинга эндогенной генотоксичности. При этом дополнительная *ex vivo* оценка резистентности клеток крови к индуцированным окислительным стрессом генотоксическим эффектам может служить косвенным маркером состояния антиоксидантной защиты и повышает информативность исследований.

Важную практическую значимость диссертационной работы составляет разработанная на основе экспериментальных исследований и опыта доклинической оценки лекарственных средств-кандидатов серия методических рекомендаций и методические указания по оценке генотоксичности *in vitro* и *in vivo* методом ДНК-комет в щелочной версии.

Предложена концепция гибкой (открытой) методологической платформы, объединяющей различные биомаркеры генотоксичности, включая повреждения ДНК, в

единую систему, позволяющую проводить комплексную оценку безопасности лекарственных средств с точки зрения их генотоксического потенциала и эффективности с точки зрения антигенотоксической активности.

Общая оценка содержания и оформления диссертационной работы

Диссертационная работа имеет традиционную структуру и включает: введение; главы «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследований и обсуждение» и «Заключение»; выводы; практические рекомендации; список публикаций по теме диссертации; список литературы. Материалы диссертации изложены на 312 страницах компьютерного текста, проиллюстрированы 81 рисунком и 39 таблицами. Список цитируемой литературы включает 374 работ отечественных и зарубежных авторов.

Во введении представлены актуальность и степень разработанности темы исследования, цель и поставленные для ее решения задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту, информация о степени достоверности, апробации и полноте опубликования представленных результатов, личном вкладе автора, объеме и структуре диссертации.

В главе «Обзор литературы» приведены современные представления о молекулярных механизмах возникновения повреждений ДНК, медицинских последствиях индуцированного мутагенеза и самостоятельной патогенетической роли повреждений ДНК, сведения об источниках генотоксических воздействий; описана сформированная на сегодня методология оценки генотоксичности лекарственных средств, обозначены нерешенные вопросы по оценке эффектов в половых клетках и исследованию генотоксичности лекарственных средств на основе наноматериалов, приведены преимущества и недостатки методических подходов к регистрации повреждений ДНК; представлены экспериментальные и практические наработки в области антигенотоксической защиты организма. Обзор литературы выстроен логично, написан хорошим языком и дает четкое понимание актуальности проблемы, решаемой в диссертационной работе.

В главе «Материалы и методы» детально описан основной метод диссертационного исследования – метод ДНК-комет в различных версиях и модификациях, включая инструментальный анализ его технических параметров, метод цитогенетического анализа и оценки повреждений митохондриальной ДНК с использованием real-time ПЦР, описано получение экспериментальных биомоделей стрептозоцин-индуцированного диабета, алкогольной кардиомиопатии и перинатальной иммунной активации. Приведены подробно данные о когортах пациентов в клинических исследованиях.

В главе «Результаты исследований и их обсуждение», содержащей 8 разделов, приведены данные собственных исследований. В первом разделе представлено методическое решение проблемы вариабельности получаемых методом ДНК-комет, что позволило успешно его принять для решения поставленных в работе задач.

Во втором разделе представлены результаты разработки методических приемов регистрации повреждений ДНК методом ДНК-комет в половых и эмбриональных клетках.

Третий раздел посвящен описанию практического опыта применения метода ДНК-комет для доклинической оценки генотоксичности лекарственных средств-кандидатов и средств с неоднозначными данными по их генотоксическому потенциалу.

В четвертом разделе изложены результаты, полученные в ходе оценки генотоксичности нанокристаллов кремния и катионных липосомальных наночастиц.

В пятом разделе, состоящем из трех подразделов, представлены результаты по оценке эндогенно-индуцированной генотоксичности на экспериментальных биомоделях сахарного диабета, алкогольной кардиомиопатии и перинатальной иммунной активации, и ее антигенотоксической коррекции на модели сахарного диабета.

Шестой раздел посвящен описанию результатов исследования органо- и тканеспецифичности антигенотоксических эффектов ряда соединений природного происхождения.

В двух последних разделах представлены результаты исследований эндогенной генотоксичности у пациентов с различными патологиями. Седьмой раздел посвящен описанию результатов исследований применимости метода ДНК-комет для оценки и мониторинга поврежденности ДНК в клетках крови пациентов с тяжелой сочетанной травмой или невынашиванием беременности. В восьмом разделе изложены результаты исследований по оценке поврежденности ДНК в клетках крови пациентов с системной красной волчанкой и ее антигенотоксической коррекции путем введения в стандартную терапию лекарственного антигенотоксиканта фабомотизола.

Глава написана хорошим языком, результаты наглядно проиллюстрированы. Каждый раздел предваряет краткое введение, актуализирующее цели исследования, полученные результаты подробно обсуждаются и интерпретируются с привлечением современных данных по проблематике, и завершается раздел кратким заключением. Это обеспечивает четкое понимание ключевых моментов полученных результатов.

В заключении автор на основе анализа совокупности полученных результатов обосновывает роль повреждения ДНК как универсального трансляционного биомаркера генотоксичности в экспериментальных, доклинических и клинических исследованиях лекарственных средств и выдвигает концепцию методологической платформы для сквозной комплексной оценки генотоксического и антигенотоксического потенциала лекарственных средств.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации и включает общую характеристику, основное содержание работы, выводы и список работ соискателя по теме диссертации.

Полнота изложения результатов в опубликованных работах

Основные результаты диссертационного исследования изложены в 50 печатных работах, включающих 26 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России. В журналах, индексируемых в Web of Science или Scopus, опубликована

21 статья, в журналах, индексируемых РИНЦ – 20 статей. Опубликовано 6 методических рекомендаций и 1 методические указания, издана 1 монография, получен 1 патент на изобретение. Публикации достаточно полно отражают основные научные положения диссертации.

Замечания и вопросы по диссертации

1. При обсуждении результатов, полученных на модели алкогольной кардиомиопатии, отмечено, что наблюдаемый в норме высокий показатель поврежденности ДНК в кардиомиоцитах может быть связан со структурными особенностями строения их хроматина. С позиций современных представлений об архитектуре хроматина в кардиомиоцитах, каковы возможные механизмы, объясняющие данный феномен?
2. Помимо метода ДНК-комет, для оценки тканеспецифичности генотоксических эффектов могут быть использованы такие известные методы, как детекция γ H2AX-фокусов (маркер двунитевых разрывов ДНК) и микроядерный тест (показатель хромосомных нарушений). Как Вы можете охарактеризовать информативность, чувствительность и техническую реализуемость этих методов в контексте совершенствования предложенной методологической платформы?

Заключение

Диссертационная работа Жанатаева Алия Курмановича на тему «Значимость оценки повреждений ДНК в экспериментальных, доклинических и клинических исследованиях лекарственных средств», представленная к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой сформулированы научные положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области фармакологии, заключающееся в концептуальной разработке методологии оценки генотоксичности и антигенотоксичности на основе практического опыта анализа поврежденности ДНК, что вносит существенный вклад в развитие системы оценки безопасности новых лекарственных средств.

Рассмотренные в диссертации Жанатаева Алия Курмановича вопросы соответствуют направлениям исследований, включенных в паспорт специальности 3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология, в частности: п.№2; п.№3; п.№7; п.№16; п.№21.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Жанатаева Алия Курмановича полностью соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор – Жанатаев Алий Курманович – заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

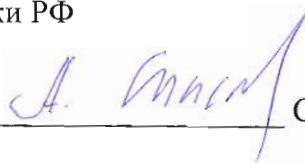
Официальный оппонент:

Заведующий кафедрой фармакологии и
биоинформатики ФГБОУ ВО «Волгоградский
государственный медицинский университет»

Минздрава России,

доктор медицинских наук, профессор,

академик РАН, заслуженный деятель науки РФ



Спасов Александр Алексеевич

Сведения об учреждении, где работает оппонент:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Адрес: 400066, Волгоградская область, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, зд.1

Тел.: +7 (8442) 38-50-05

E-mail: post@volgmed.ru

Web-сайт: <https://www.volgmed.ru>

E-mail оппонента: aspasov@mail.ru

Личную подпись А.А.Спасова заверяю

