

Экологическая генетика.

*Лекция 6.*

---

Генетическая токсикология.

Обзор генетических тест-систем. Генетические эффекты малых доз облучения.

# Малые дозы облучения.

---

Два противоположных подхода к оценке действия малых доз облучения:

1. Проблемы малых доз не существует и все закономерности больших доз можно экстраполировать на малые.
  2. Малые дозы по эффекту принципиально отличаются от больших, поэтому методология их изучения должна отличаться от общепринятой в современной радиобиологии.
-

# Биологические эффекты малых доз облучения.

---

- 1962 г. Показана возможность использования дрозофилы в изучении генетических эффектов облучения в малых дозах.
  - Облучение в дозе 0,2 Гр ( $\approx 20$  Р) увеличивало частоту РСПЛМ в 2-4 раза по сравнению с контролем в зависимости от характеристики излучения.
-

# Малые дозы радиации

---

- Дозы мощностью не более **1 сГр\мин** ( для млекопитающих до 0,5 Гр)
  - Облучение в дозах такой мощности не приводит к вредным для организма последствиям, поскольку наблюдаемый уровень индуцированных повреждений ДНК в несколько раз ниже уровня спонтанных повреждений.
-

# Физический и биологический аспекты радиобиологических эффектов МДР

---

- Вероятность повреждения биологической структуры находится в линейной зависимости от дозы облучения. С физической точки зрения малые дозы соответствуют наименьшему воздействию на биологическую структуру, когда происходит только одно событие пролета ионизирующей частицы через заданный биологический объем.

# Индукция повреждений ДНК

---

- Происходит двумя путями:
    1. при непосредственном попадании ионизирующей частицы в молекулу ДНК (индуцируются повреждения ДНК типа повреждений оснований, сшивки ДНК-ДНК и ДНК-белок, одно- и двунитевые разрывы ДНК).
-

# Индукция повреждений ДНК

---

2. косвенно, через индукцию свободных радикалов (повреждения ДНК имеют сходную природу со спонтанными нарушениями: модифицированные основания, однонитевые разрывы)

Повреждения первого типа представляют наибольшую опасность для клетки, т.к. приводят к развитию мутаций и хромосомных перестроек, гибели клеток и формированию генетической нестабильности.

---

# Зависимости частоты индукции мутаций от диапазона доз

---

В клеточных культурах в диапазоне доз 0,1-100 сГр частота индуцированных мутаций имеет нелинейную зависимость эффекта от дозы

- При мощности экспозиционной дозы 0,1-1 сГр имеет место эффект обратной зависимости от дозы
  - При мощности 1-100 сГр – прямая зависимость
-



# Характер дозовой зависимости показателей силы связывания и микровязкости.

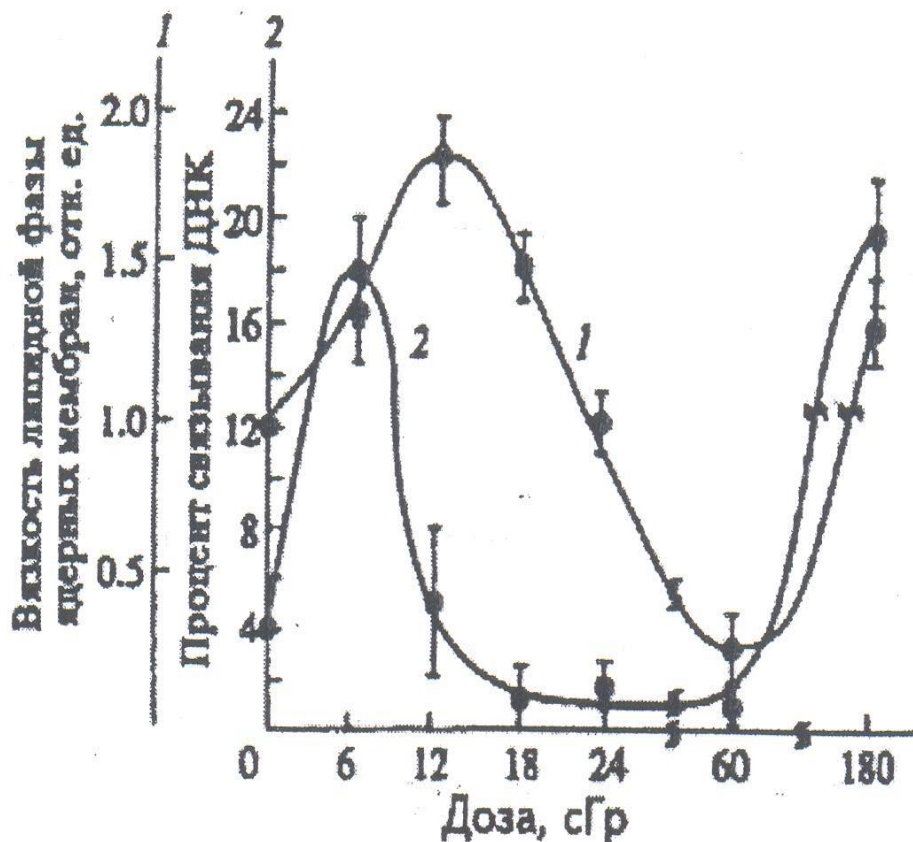


рис.1. Сила связывания (в %) с нитроцеллюлозными фильтрами ДНК селезенки (2) и микровязкость липидов ядерных мембран печени (1) облученных мышей в зависимости от дозы облучения (интенсивность облучения 6 сГр/сутки)

# Типы биологических реакций в диапазоне МДР

---

- *Адаптивный ответ* – характеризует способность клеток отвечать на облучение в малых дозах **снижением** уровня радиационно-индуцированных повреждений
- *Гормезис* – облучение в малых дозах может индуцировать **положительные** биологические процессы и оказывать стимулирующее действие на организм
- *Генетическая нестабильность* – широкий спектр клеточных реакций в ответ на облучение

# Адаптивный ответ: формы проявления

---

- **Однократное действие радиации** – ответ выражается в обратной дозовой зависимости: малое облучение острой дозой или воздействие при очень малой мощности дозы оказывается более эффективно при расчете эффекта на единицу дозы, чем воздействие более высокой дозой, вызывающей индукцию механизмов радиопротекции.
-

# Двукратное облучение

---

- Адаптивный ответ проявляется в том, что предварительное воздействие облучения в малой дозе (обычно ниже 30 сГр) может снизить эффект последующей радиационной обработки в высокой дозе.
  - Необходимое условие для этого вида адаптивного ответа – наличие временного интервала между воздействиями 4-6 часов.
-

## Характеристики адаптивного ответа при двукратном воздействии

---

- Непродолжительность ответа – в зависимости от индивидуальных показателей экспериментального объекта ответ может быть зафиксирован во временном интервале от 4-24 часов до нескольких недель после предварительного облучения.
  - Ответ отсутствует, если в промежутке между облучениями воздействовать на клетку веществами, ингибирующими синтез белка.
-

# Низкодозовая гиперчувствительность и индуцированная радиорезистентность

---

- Для рентгеновского излучения *низкодозовая гиперчувствительность* обычно наблюдается после однократного облучения в дозах, меньших **0,3 Гр**, а последующая индукция *радиорезистентности* происходит при дозах выше **1 Гр**.
- Повышенную чувствительность к облучению в малых дозах рассматривают как *защитную* реакцию клетки на опасность формирования трансформации.

# Механизм адаптивного ответа.

---

- Точный механизм не известен до настоящего времени, возможно имеет место:
  - Механизмы безошибочной репарации, к которым относятся эксцизионная репарация оснований и эксцизионная репарация нуклеотидов. Показано, что в дозовом диапазоне 0-1 Гр активация процесса репарации происходит с участием белка *поли(АДФ-рибозо)полимераза* (защита от чрезмерного количества разрывов в ДНК). Белок имеет критическое значение для процесса формирования адаптивного ответа, поскольку при его ингибировании адаптивный ответ не наблюдается.
-

# Гены, участвующие в адаптивном ответе.

---

- При адаптивном ответе изменяется экспрессия ряда генов в течение нескольких часов после облучения. Ионизирующая радиация индуцирует ряд неспецифических генов клеточного ответа на повреждение ДНК. *Центральная роль – ген **p53***, продукт которого является фактором активации транскрипции для генов репарации, контроля клеточного цикла и апоптоза.



# Гены, участвующие в адаптивном ответе.

---

- На начальном этапе облучения происходит индукция генов раннего ответа, к которым относятся ***c-jun, c-fos, NF-κB***.
- Их функция заключается в транскрипционной активации генов, имеющих важное значение в адаптации клеток и тканей к повреждающему действию радиации.
- Ген ***DIRI*** – сходство продукта с семейством белков теплового шока

# Гормезис

---

- ❑ Малые дозы могут индуцировать положительные биологические процессы и оказывать стимулирующее действие на организм.
  - ❑ Отмечается при дозах меньше 10сГр
  - ❑ Увеличивается уровень выживания клеток, репарации ДНК, роста клеток.
  - ❑ Снижается частота регистрации различных нарушений до спонтанного уровня или меньше его.
-

# Внутриклеточные механизмы гормезиса

---

- Аналогичны механизмам  
адаптивного ответа:

Репарация повреждений ДНК

Система белков клеточного  
ответа

---

# Индуцированная генетическая нестабильность

---

- Широкий спектр клеточных реакций в ответ на облучение:
    - генные мутации
    - амплификация генов
    - дестабилизация хромосом
    - нарушение процессов репарации
    - опухолевая трансформация  
клеток
-

# Основная характеристика индуцированной клеточной нестабильности

---

- Проявление на протяжении многих клеточных поколений у потомков облученной клетки после воздействия радиационного фактора.
  - Наблюдается в пределах доз 2-12 Гр, но есть данные об эффективности малых доз облучения (0,18 Гр).
  - Проявление геномной нестабильности – хромосомная нестабильность, точковые мутации, летальные мутации.
-

# Эффекты МДР у человека

---

- Увеличение числа заболеваний, характерных для «ликвидаторов» Чернобыльской аварии: вегетососудистая дистония, нервные болезни, психические расстройства, болезни желудочно-кишечного тракта и другие.
- Немонотонный, нелинейный характер зависимости от дозы, как и в лабораторных экспериментах

# Дозовые зависимости показателей состояния здоровья при низкоинтенсивном облучении

общее инвалидирование  
на 1000  
человек

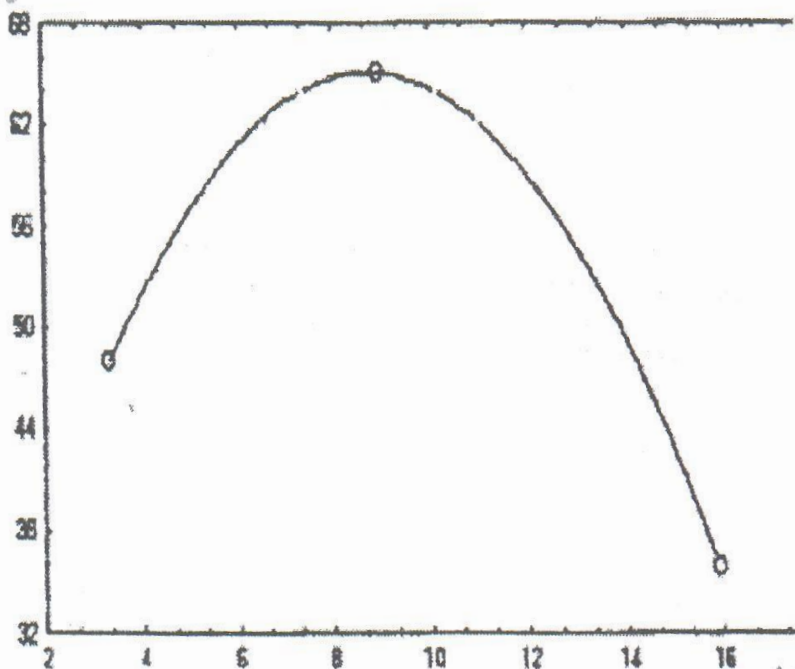


Рис. 2. Зависимость показателя общей инвалидности на 1000 человек "ликвидаторов" (по оси ординат) от дозы облучения (в сГр по оси абсцисс) через 5 лет после их работы по ликвидации последствий аварии на ЧАЭС

доза облучения  
в сГр

# Заключение

---

- Ионизирующая радиация индуцирует повреждения ДНК при сколь угодно малых величинах облучения.
- Малые дозы являются индуктором ряда генетических и эпигенетических механизмов, которые не имеют линейной зависимости от дозы.
- Эти два аспекта не позволяют предсказать природу дозовой зависимости для конечных радиобиологических реакций



# Генетические тест-системы

---

- **Методологической** основой генетической токсикологии является разработка и использование генетических тест-систем с целью выявления в окружающей среде человека факторов, обладающих генетической активностью.
-

# Принципы формирования стратегии тестирования

---

- ❑ 1. большое количество веществ, которые необходимо тестировать на мутагенную активность, требует использования на первых этапах достаточно оперативных краткосрочных тест-систем
  - ❑ 2. необходимо выбирать удобные биологические стандарты, по отношению к которым можно было бы реально проводить процедуру **валидации** (*оценка пригодности для использования*) всей совокупности имеющихся в нашем распоряжении краткосрочных тестов
-

# Биологические стандарты тестирования

---

- Очевидны трудности, связанные с установлением непосредственной связи между ответами в тест-системах и интересующими нас последствиями у человека.
  - В связи с этим по **филогенетическим** критериям и критериям **СТОИМОСТИ** на эту роль биологических стандартов подходят мелкие грызуны (мыши и крысы)
-

# Классификация генетических тест-систем

---

В основе классификации заложены два параметра:

1. степень филогенетической близости к половым клеткам млекопитающих *in vivo*

2. степень скоррелированности ответов в тестах по отношению к наследуемым изменениям и канцерогенезу у человека.

---

# Характеристика прогностической эффективности тест-систем

---

- **Чувствительность** тест-системы – оценивается как отношение числа мутагенов, показавших положительный ответ в данной тест-системе, к полному числу мутагенов в выборке
- **Специфичность** тест-системы – оценивается как число немутагенов, показавших отрицательный ответ в данной тест-системе, к полному числу немутагенов в выборке

## Трудности оценки параметров чувствительности и специфичности

---

- Значения показателей для конкретной тест-системы могут меняться при переходе от одного класса химических веществ к другому. Даже в случае наиболее изученного в этом отношении теста Эймса оценки, проведенные разными авторами в разное время существенно отличаются друг от друга и это связано в основном с различиями в выборках веществ.
-

# Чувствительность и специфичность теста Эймса

Источник (год)	Чувствительность	Специфичность
1935	90% (157/175)	87%(94/108)
1978	85%(136/160)	74%(60/81)
1979	91%(53/58)	97%(60/62)
1980	76%(62/82)	57%(4/7)
1981	42-68%	54-69%
1987	54%(66/123)	68%(51/75)
1987	45%(20/44)	86%(25/29)

# Структура тест-системы

---

- Тест-объект
  - Фиксируемый генетический эффект
  - Требования к тест-объектам:
    - высокая чувствительность
    - специфичность ответа
    - возможность быстрой регистрации ответа
    - простота содержания в лабораторных условиях
    - идентичность или близость филогенетических и иных биохимических параметров тест-организмов к индикаторным или мониторным объектам
-



# Популярные краткосрочные тесты

---

---

# Общая стратегия биотестирования

---

# Служба изучения токсических веществ США

---

# Департамент здоровья Великобритании



# Микробиологические тест-системы

---

- 1. оценивают мутирование
- 2. оценивают повреждение ДНК

Тест Эймса

SOS – хромотест

Comet assay

триптофановый тест на кишечной палочке

грибные тест-системы (дрожжи сахаромицеты, аспергилл, нейроспора)

---

# Тест Эймса

---

- Учет обратных мутаций в his-опероне *Salmonella typhimurium*
  - Тестерные штаммы различаются по одной из четырех мутаций в гистидиновом опероне с известными повреждениями ДНК:
    - 1). замена пар оснований
    - 2). различные типы сдвига рамки считывания
-

# Модифицированные штаммы

---

- Выключение работы системы репарации за счет делеций по гену *uvrB*.
- Повышение проницаемости клеточной оболочки и перевод бактерии в категорию непатогенной за счет мутации в гене *rfa*, которая ведет к утрате липополисахаридного барьера.

# SOS-хромотест

---

- Превосходит тест Эймса по экономичности и оперативности.
  - Во всех модификациях теста под контроль промоторов различных *din*-генов (*damage inducible genes* – *sfi*, *umuS*, *sea polB*) подставлен структурный ген  $\beta$ -галактозидазы *lacZ* оперона.
-



# Количественная оценка генотоксического эффекта тестируемых веществ

---

Определяется  $\beta$ -галактозидазная активность через расчет

**коэффициента индукции  $K_i$ :**

величина индуцированной

**$K_i$**  = ферментативной активности/уровень ферментативной активности / спонтанной активности

---

# Модификация SOS-хромостеста

---

- Первоначально SOS-региструющая плазмида находилась в клетках *E.coli*, затем в силу хорошей адаптированности для целей тестирования *S.typhimurium* за счет мутации *rfa*, определяющей проницаемость клеточных мембран, плазмида была перенесена в клетки сальмонеллы.
-

# Прогностическая значимость

---

- Положительная оценка теста на сальмонелле для грызунов на канцерогенность составляет 80-90%, то есть положительный ответ у сальмонеллы имеет высокую вероятность развития рака у грызунов.
  - Из всех канцерогенов, известных к середине 70-х годов 20 века, приблизительно 90% являются мутагенами.
-

# Comet assay

---

Метод берет начало в 1984 году. В основе метода – электрофорез в микрогеле (single cell gel – SCG) = comet method

Эукариотические клетки смешивают с расплавленной агарозой при 37°C и помещают на замороженное предметное стекло. Происходит затвердевание под покровным стеклом. Детергенты и сильные соли вызывают лизис клеток, а освободившаяся ДНК подвергается электрофорезу в течение короткого промежутка времени при  $\text{pH}=7$  или  $\text{pH}>13$ .

# Генетические критерии повреждения.

---

- ДНК окрашивают специфическим красителем.
  - Уровень повреждения ДНК оценивается с помощью флюорисцентного микроскопа:  
у клеток с поврежденной ДНК увеличивается длина пробега к аноду, причем при  $pH=7$  (нейтральная среда) тест чувствителен к двунитевым разрывам ДНК, а при  $pH>13$  (щелочная среда) ДНК расплетается, поэтому тест чувствителен к однонитевым разрывам.
-

# Анализ изображений.

---

---

# Растительные тест-системы

---

- Классический объект генетических исследований – скерда *Crepis capillaris*, 1905 г. Джуэл
  - Виды рода *Crepis* обладают малым количеством хромосом, что является чрезвычайно важным для цитогенетических исследований.
-

# Характеристика кариотипа *Crepis capillaris*

---

- Три пары хромосом – А, С, D
  - Возможно наличие дополнительных В-хромосом
  - Строгая морфологическая индивидуальность
  - Наличие элементов внутрихромосомной дифференцировки
-



# Хромосомы скерды

---

- Хромосома А – самая большая, неравноплечая
  - Хромосома D – акроцентрическая, равна длине большого плеча хромосомы А, со спутником и ядрышкообразующим районом на коротком плече
  - Хромосома С – телоцентрическая
-

# Микроядерный тест

---

- Предложен в 1970-1973 гг., для анализа подходят клетки растений, животных, человека
  - Микроядра образуются из отстающих ацентрических фрагментов, возникающих при разрыве хромосом – **кластогенный эффект** или из отстающих хромосом – **анеугенный эффект**
-

# Микрофотография микроядра

---

---

# Метод определения и оценки частоты микроядер

---

- ❑ Преимущественно используется метод блокирования цитокинеза, при котором возможно определять клетки, подвергшиеся одному клеточному делению после экспозиции мутагеном.
  - ❑ Цитохолазин В – действует на актин и блокирует цитокинез в митоген-стимулиро-ванных клетках
  - ❑ Обязателен в странах Европейского экономического сообщества и в Японии
-

# Животные тест-системы

---

- Методы выявления мутаций у дрозофилы
  - Метод доминантных леталей у мышей
  - Спот-тест на мышах
  - Цитогенетический анализ соматических и половых клеток ЖИВОТНЫХ
-

# Метод доминантных мутаций у мышей.

---

- 2,5-4 мес.самцы мышей облучаются быстрыми нейтронами и спариваются с необработанными самками
  - 14-18 дневных беременных самок вскрывают и подсчитывают число желтых тел в яичниках, число мест имплантации, число эмбрионов в матке.
-

# Метод ДЛ у мышей

---

- **Общая выживаемость** – соотношение живых эмбрионов и желтых тел
- **Постимплантационная гибель** – соотношение погибшие эмбрионы и число мест имплантации
- Основной тип генетических повреждений, приводящих к ДЛ, – **реципрокные транслокации**

# Спот-тест на мышах

---

- Используется при оценке генотоксического эффекта в соматических клетках мышей (генные мутации и рекомбинация) – учет результата *in vivo*.
  - Гетерозиготных по рецессивным мутациям окраски шерсти эмбрионов, *in utero*, между 9 и 11 днями развития плода подвергают действию мутагена путем внутрибрюшинной инъекции, либо per os матери.
  - При изменении или потери аллели дикого типа развивается цветное пятно.
-



# Теоретическая основа теста.

---

- ❑ У эмбрионов примордиальные меланобласты развиваются из нервного гребня по обе стороны спины.
- ❑ В течение их миграции к средней линии живота между 6 и 12 днями развития плода они продолжают делиться.
- ❑ Каждый клон пигментных клеток (меланоцитов), происходящий от одного меланобласта, ответственен за пигментацию определенной полосы или участка кожи.
- ❑ Всего у мышей существует 34 клона.

# Значение спот-теста

---

- Чувствителен не только к стандартным мутагенам, но и к мутагенам, которые с трудом определяются *in vivo*.
  - Способен различать канцерогены и неканцерогены.
  - Используется для определения соответствия позитивных данных *in vitro* ситуации *in vivo* и применимости этих данных к человеку.
-

*Tradescantia sp.*, клон 02, общий вид (слева) и цветущее растение (справа)

---



# Оценка мутагенного действия факторов среды.

---

Учет соматических мутаций в клетках волосков тычиночных нитей: изменение голубой окраски клеток волосков на розовую оценивается как фенотипическое проявление мутации в гетерозиготных по окраске клетках волосков тычинок.

---

# Общий вид тычиночной нити с волосками (увеличение x40)

---



# Клетки пыльцы на разных стадиях деления (увеличение x40)

---

