

# Экологическая генетика.

## *Лекция 7.*

---

Принципы количественной оценки  
эффективности тестирования.

Антимутагены.

# Обоснование необходимости разработки принципа тестирования.

---

Основная трудность при проведении оценки мутагенной активности химических соединений для человека связана с тем, что процесс мутирования имеет видо-, ткане- и даже тест-объект специфический характер. В специальных исследованиях показано, что, по крайней мере, 85% химических соединений являются мутагенами в одних тест-системах и не обладают этим свойством в других.

---

# «Золотой стандарт» токсикологии

---

В генетической токсикологии в качестве "золотого стандарта" используются результаты, полученные на мышах и крысах. В отношении генетических последствий у грызунов проводится **калибровка** (валидные исследования) всех других "суррогатных" тест-систем.

---

# Условия калибровки.

---

При проведении процедуры калибровки необходимо сформировать выборку стандартных, охарактеризованных соединений, включающих в себя группу веществ, показавших мутагенную, либо канцерогенную активность у грызунов (мутагены, либо канцерогены), и группу веществ, не показавших такую активность (немутагены, либо неканцерогены).

После тестирования отобранные химические соединения распределяются по четырем классам.

Распределение химических соединений по классам (1- мутаген, 2-немутген, 1-есть ответ, 2-нет ответа)

---

Категории	Ответ +	Ответ -
мутагены	$n_{11}$	$n_{12}$
немутагены	$n_{21}$	$n_{22}$

---

# Условные обозначения

---

- $n_{11}$ ,  $n_{22}$  – число химических соединений, показавших правильные позитивные и правильные негативные результаты
  - $n_{12}$ ,  $n_{21}$  – число химических соединений, показавших *ложные негативные и ложные позитивные* результаты.
-

# Чувствительность тест-системы

---

- $n_1 = n_{11} + n_{12}$  – число мутагенов
- $n_2 = n_{21} + n_{22}$  – число немутагенов
- $n = n_1 + n_2$  – общее число химических соединений
- $p_0 = n_1 / (n_1 + n_2)$  – доля мутагенов
- $q_0 = n_2 / (n_1 + n_2)$  – доля немутагенов
- $p_0 + q_0 = 1$

**Чувствительность** тест-системы

$$a = n_{11} / (n_{11} + n_{12})$$

---

---

**Чувствительность** тест-системы представляет собой условную вероятность получения позитивного результата при использовании данной тест-системы при условии, что испытанию подвергаются заведомо мутагены или канцерогены

---



# Специфичность тест-системы

---

$$\beta = n_{22} / (n_{21} + n_{22})$$

**Специфичность** представляет собой условную вероятность получения отрицательного результата при условии, что мы имеем дело с заведомо немутагенами.

Соответственно,  $(1-\alpha)$  и  $(1-\beta)$  - условные вероятности получения ложных негативных и ложных позитивных результатов.

Введя эти обозначения можно преобразовать ранее сформированные группы как:

---

# Преобразованные группы химических соединений

категории	Ответ +	Ответ -	сумма
мутагены	$np_0a$	$np_0(1-a)$	$np_0$
немутагены	$nq_0(1-\beta)$	$nq_0\beta$	$nq_0$
сумма	$np(+)$	$np(-)$	$N$

# Условные обозначения

---

- $pr(+)$  - доля соединений с положитель-ным ответом
- $pr(-)$  - доля соединений с отрицательным ответом

При проведении испытания конкретного химического соединения  $n=1$ , эта таблица может быть представлена как:

---

# Проведение испытания конкретного химического соединения.

Категория	Ответ +	Ответ -	сумма
Мутагены	$p_0\alpha$	$p_0(1-\alpha)$	$p_0$
Немутагены	$q_0(1-\beta)$	$q_0\beta$	$q_0$
сумма	$p(+)$	$p(-)$	1

# Прогноз по отношению к млекопитающим

---

- В ходе тестирования конкретного химического соединения встает вопрос о прогнозе его мутагенности по отношению к млекопитающим. Эти вероятности (положительного и отрицательного ответа на мутагенность) могут быть легко получены, зная значения специфичности, чувствительности и оценку априорной вероятности наличия или отсутствия мутагенной активности у данного соединения.

# Вероятность прогноза мутагенности после проведения испытания.

---

Ответ (+)	Ответ (-)
$P(m/+)=p_{oa}/p_{oa} + q_o(1-\beta)$	$p(nm/-)=q_o\beta/q_o\beta+p_o(1-\alpha)$
$p(nm/+)=1-p(m/+)$	$p(m/-)=1-p(nm/-)$

---

# Условные обозначения.

---

- $p_0$  – доля мутагенов
  - $q_0$  – доля немутагенов
  - $\alpha$  – вероятность позитивного ответа (чувствительность)
  - $\beta$  – вероятность отрицательного ответа (специфичность)
  - $(1 - \alpha)$  – вероятность ложно негативного ответа
  - $(1 - \beta)$  – вероятность ложно позитивного ответа
-

# Мутагенез и антимутагенез

---

- Проблема антимутагенеза теснейшим образом связана с проблемами мутагенеза.
- Ш.Ауэрбах в истории развития мутационной теории выделяет 5 периодов: 1.изучение спонтанного мутагенеза; 2.открытие возможности искусственно вызывать мутации; 3.разработка теории мишени; 4.выяснение молекулярных механизмов мутагенеза; 5.осознание того факта, что мутации – это опосредованное через биологические системы внешнее воздействие на клетку



# 50-60е годы 20 века

---

- Начало исследований в области антимутагенеза и активный поиск факторов, защищающих наследственный аппарат от повреждающего действия ионизирующих излучений
  - Сложилось представление, что есть:
    1. вещества-протекторы, работающие против индуцированного мутагенеза (гл.обр., радиационного)
-

- 
- 2. вещества-антимутагены, снижающие спонтанный уровень мутирования
  - Позднее стали считать **антимутагенами** – все вещества, снижающие, по крайней мере, наполовину уровень мутаций, вызванных тем или другим активным химическим мутагеном.

# 1952 г. А.Новик, Л.Сциллард

---

- Добавка пуриновых нуклеозидов в питательную среду *E.coli* снижала частоту спонтанных мутаций на 60-70%. Такое уменьшение числа мутаций под воздействием каких-либо факторов стали называть антимутагенезом, а сами факторы – антимутагенами.
-

# 50-70е годы

---

Были выявлены антимуtagenные свойства таких соединений , как

- ❑ Пуриновые нуклеозиды;
  - ❑ Фенотиазиновые транквилизаторы;
  - ❑ Дибензоциклогептановые антидепрессанты;
  - ❑ Сульфаниламидные препараты;
  - ❑ Аминокислоты;
  - ❑ Синтетические и природные антиоксиданты
-

# Механизмы антимутагенеза

---

- Трудность в изучении механизма действия антимутагенов заключается в их **разнородности** – будучи соединениями самых разных классов, антимутагены могут включаться в самые различные биологические процессы, приводя тем не менее к одному и тому же результату – антимутагенному эффекту.
-

# Классификация антимутагенов по Т.Кадо

---

- 1. **дисмутагены** – вещества, связывающие мутагены до начала их биологического действия в организме или до поступления в организм
  - 2. **биоантимутагены** – вещества, определенным образом изменяющие реакцию организма на мутагены
-

# Классификация антимуутагенов по Г.Г.Порошенко

---

**Биоантимуутагены** – в зависимости от этапа мутагенеза, на котором они эффективны:

- *мембранные антимуутагены* (изменяют проницаемость мембран для мутагенов, стероидные гормоны и их производные)
  - *метаболические антимуутагены* (вливают на метаболическую активацию или дезактивацию мутагенов)
  - *связывание токсических метаболитов* (свободные радикалы)
  - *репарационные антимуутагены*
-

# Механизмы антимутагенеза

---

- 1. **дисмутагенизация** – способность антимутагенов инактивировать действие конкретных мутагенных соединений или продуктов их метаболизма. Таким свойством обладает целый ряд органических соединений растительного происхождения, характеризующихся пероксидазной или НАДФ-оксидазной активностями. Некоторые пестициды крайне чувствительны к веществам, содержащим сульфгидрильную группу, например, цистеин, гомогенат печени, кровь.
-



# Механизмы антимутагенеза

---

## □ 2. **Участие антимутагенов в репарации ДНК.**

Впервые указание на участие антимутагенов в репарации было получено в работах по изучению влияния генотипа на внеплановый синтез в клетках *Crepis capillaris*. Позднее при использовании специфических мутагенов и штаммов м/о, дефектных по ферментам репарации, подтвердили наличие подобного механизма действия.

---

# Репарогенез – частный случай антимутагенеза

---

- Пара-аминобензойная кислота снижает действие алкилирующих химических мутагенов, ультрафиолетового и гамма-облучения только на штаммы, дефектные по ферментам репарации.
  - Активирующее действие на репарацию оказывают некоторые растительные экстракты.
  - **Репароген** – обозначение фактора, повышающего интенсивность репарации.
-

# α- токоферол

---

- Оказывает комбинированное действие:
    - активирует репарацию и
    - одновременно подавляет мутации.
-

# Механизмы антимутагенеза

---

## □ 3. Иммунная система

Выбраковка мутантных клеток с изменениями поверхностных рецепторов. Ряд веществ, принимающих участие в иммунном процессе, например, интерфероны, усиливают процесс репарации ДНК, снижая тем самым уровень мутаций.

---

# Механизмы антимутагенеза

---

## □ 4. регуляция активности ферментов

Многие мутагены нуждаются в метаболической активации. Одной из систем, участвующих в такой активации, выступает система микросомальных ферментов цитохромов P-450.

Ингибиторы активности микросомальных ферментов выступают в качестве антимутагенов.

---

# Возможные механизмы антимутагенеза

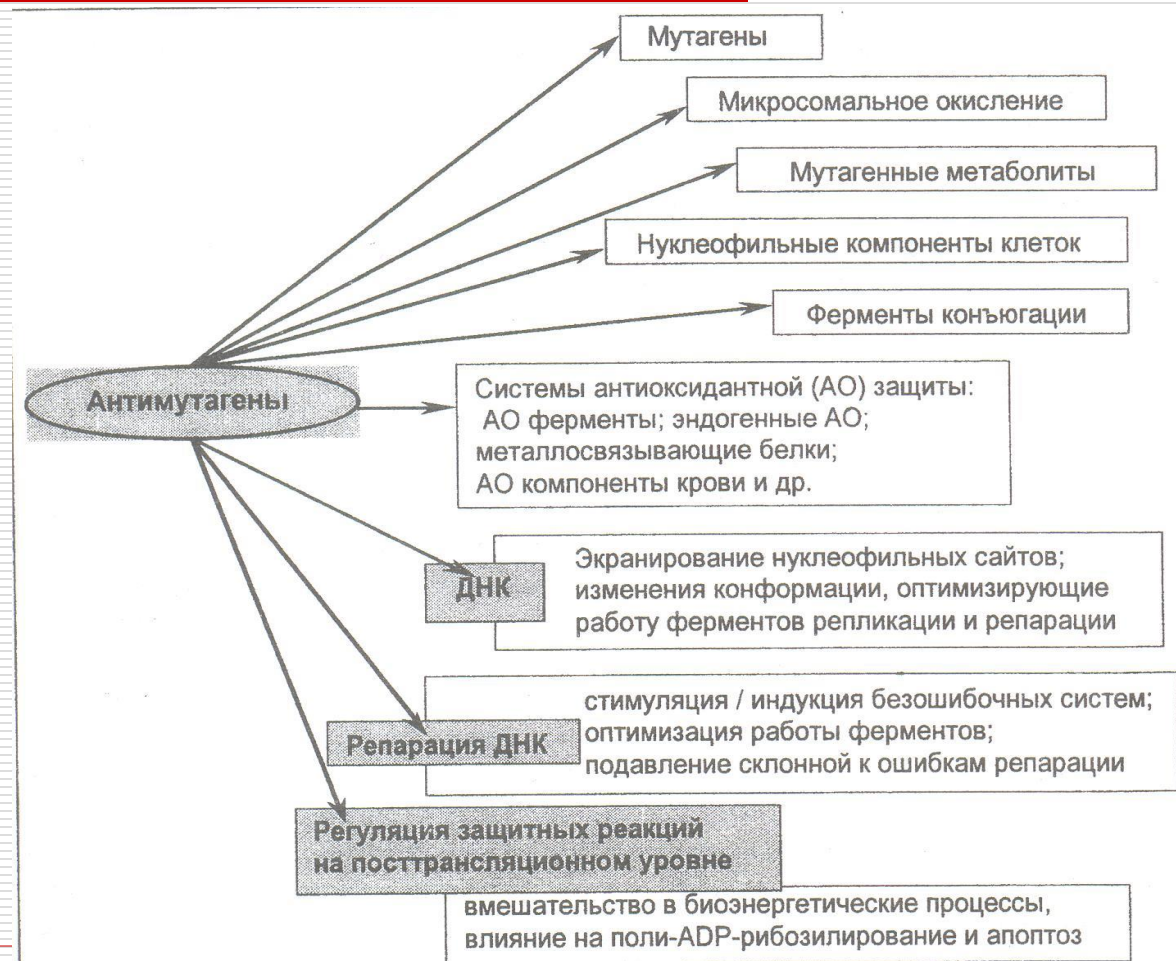


Рис. 15. Механизмы действия антимутагенов при химическом мутагенезе у высших эукариотических организмов

# Критерии оценки действия антимутагенов

---

- 1. *универсальность* – способность одного и того же соединения снижать мутабельность на разных объектах (м\о, клетки растений, животных и человека) при индукции мутаций физическими, химическими и биологическими факторами.

**Индекс универсальности** (Алекперов) – один из критериев количественной оценки антимутагенеза. За единицу принимают антимутагенный эффект исследуемого препарата по каждому из мутационных тестов (генные мутации и ХрА) на различных объектах (м\о, растения, млк и культура клеток человека)

# Универсальность антимуутагенов

---

- Из испытанных препаратов: пуриновые рибозиды, акридин, метионин, ионол, *альфа-токоферол*, *аскорбиновая кислота*, *селенит натрия*, наибольший индекс – 8 – у трех последних соединений. Они подавляют самые различные мутации (возникающие спонтанно, вызванные химическим или радиационным воздействием) на всех объектах и проявляются на генном и хромосомном уровне.
-



- 
- Сейчас не известен ни один антимуtagen, полностью подавляющий мутационный процесс, но установлено, что степень влияния на мутагенез разных антимутагенов различна. Это связано с тем, что при полном подавлении мутабельности организмов они перестали бы эволюционировать, так как исчезла бы основа для естественного отбора.

# Критерии антимуутагенеза

---

- 2. *эффективность* – отношение разницы между частотами спонтанных и модифицированных (оставшихся после действия антимуутагенов) мутаций к исходному уровню спонтанной мутабельности. Числовое значение эффективности действия антимуутагенов рассчитывается для их максимальных и минимальных концентраций, при которых проявляется антимуутагенное действие.

# Критерии антимутагенеза

- 3. *Физиологичность* действия – характеристика антимутагенов в зависимости от их концентраций. Многие химические соединения обладают антимутагенными свойствами в низких концентрациях, а в высоких дозах могут действовать как мутагены. Эта особенность типична для ряда соединений: аргинин, глутаминовая кислота, селенит натрия, стрептомицин, производные галловой кислоты, ионол и др.

# Аутоантимутагены

---

- Клеточные метаболиты, влияющие на поддержание стабильности генетического аппарата.

Естественный метаболит клетки, препятствующий действию внутренних мутагенов – **каталаза**, которая разрушает перекись водорода, обладающую мутагенным эффектом.

---

# Роль аутоантигенов в адаптации

---

- Дикорастущий злак эгилопс, произрастающий в разных экологических условиях: обнаружена различная чувствительность к мутагенам в зависимости от концентрации токоферолов:
    - 375мг% - 2% ХрА (высокогорье)
    - 125мг% - 4% ХрА
-

# Биологические особенности видов и аутоантигены

---

- Азербайджан (Апшеронский полуостров), два вида овса, произрастающие в одном биоценозе, характеризуются различной спонтанной и индуцированной мутабельностью (НММ и гамма-излучение). Увядающий вид более чувствителен к мутагенам и содержит значительно меньше аутоантигенов, чем процветающий вид.
-

## Специфика действия антимуутагенов.

### □ **1. высокая избирательность действия**

N-ацетилцистеин снижает индукцию бенз(а)пиреном микроядер в печени и легких крыс, но не влияет на аналогичную активность диметилбензантрацена в клетках костного мозга мышей.

Даже в экспериментах *in vitro* на одних и тех же объектах антимуутагены избирательно ингибируют эффекты одних повреждающих факторов и неэффективны по отношению к другим мутагенным соединениям.

---

- 
- Мирцен в культуре клеток V79 в зависимости от концентрации ингибирует образование СХО под действием циклофосфамида и афлотоксина В1, но не влияет на действие бенз(а)пирена и бензантрацена.
-



# Универсальные антимуутагены

---

- Увеличение концентраций других антимуутагенов - альфа-токоферола, бета-каротина, филлохинона и прочих даже на **несколько порядков** не изменяет характер их действия.
-

- 
- Чем ближе граница концентраций, определяющих смену эффекта, тем менее физиологичен данный антимуtagen.

По данным Алекперова альфа-токоферол проявляет в любых концентрациях только антимуtagenную активность, а наиболее эффективен в очень узкой области концентраций.

# Специфика действия антимуутагенов

---

## □ 2. сложная дозовая зависимость антимуутагенных эффектов

Имеет место зависимость защитного эффекта от дозы и типа индуктора мутагенеза, выбранного объекта исследования и пути введения исследуемого вещества.

---

# Специфика действия антимуутагенов

## □ 3. неоднозначность действия

Практически все антимуутагены, уменьшая эффекты одних, потенцируют мутагенное действие других ксенобиотиков, а при определенных условиях обладают собственным мутагенным потенциалом.

*Каротиноиды* – прекрасные антиоксиданты, обладающие антимуутагенным действием, в ряде случаев оказывают мутагенный или мутаген-потенцирующий эффект вследствие изменения антиоксидантного эффекта в прооксидантный.

# Практические пути профилактики генетических последствий загрязнения окружающей среды

---

- 1. *Технологический уровень* – реорганизация промышленности в замкнутые циклы, конечные продукты не должны обладать мутагенными свойствами.
- 2. *Компонентный уровень* – оценка по полным или просеивающим программам десятков тысяч факторов, выявление среди них мутагенов и замену их безопасными аналогами или гигиеническое нормирование мутагенов.

# Практические пути профилактики генетических последствий загрязнения окружающей среды

---

□ 3. *Компенсационный уровень* - нейтрализация генетических последствий загрязнения среды за счет антимутагенеза.

□ Направления использования компенсационных свойств антимутагенеза:

дисмутагенизация, профилактическое введение антимутагенов, создание препаратов с антимутагенными свойствами, активация репарации, получение новых сортов растений с повышенным содержанием аутоантимутагенов

# Требования к использованию антимутагенов

---

- Антимутагены должны быть эффективными, универсальными и безвредными;
  - Обладать свойствами, позволяющими использовать их как компоненты натуральных пищевых продуктов или добавок к ним;
  - Быть недорогими и доступными
-

# Мутагены и антимутагены в продуктах питания

---

- Международная организация по исследованию канцерогенного риска сделала **заключение**, что пища является источником сложной смеси мутагенов и канцерогенов различной природы.
  - С другой стороны, с пищей в организм поступают соединения, имеющие антимутагенные свойства
-



# Направления практического использования антимуутагенов

---

- ❑ 1. разработка фармакологических средств защиты генетических структур от мутагенных воздействий
  - ❑ 2. исследование влияния различных (в основном растительных) пищевых продуктов на индуцированный мутагенез
  - ❑ 3. изучение возможности использования пищевых добавок в качестве **превенторов**, обладающих профилактическими, в частности, антимуутагенными свойствами
-

Известно более 25 различных классов химопревенторов, содержащихся практически во всех типах пищи.

---

- Создание пищевых продуктов, обогащенных антимутагенными компонентами, имеет большие перспективы не только для профилактики увеличения генетического груза, но и как агенты, предупреждающие индукцию и развитие злокачественных новообразований.
-

# Антимутагены – пищевые продукты

Таблица 1. Пищевые продукты с наиболее значимыми химиопреventорами [54]

Тип пищи	Химиопреventоры
Фрукты	Витамины, флавоноиды, полифенольные аминокислоты, волокна, каротиноиды, монотерпеноиды ( <i>d</i> -лимонин)
Овощи	Витамины, флавоноиды, растительные фенолы, волокна, хлорофилл, алифатические сульфиды, каротиноиды, ароматические изотиоционаты, растительные кислоты, дитиолтионы, кальций
Злаки	Волокна, токоферолы, растительные кислоты, селен
Мясо, рыба, яйца, птица	Конъюгированные изомеры линолеиновой кислоты, витамины А и Е, селен
Жиры и масла	Жирные кислоты, витамин Е и другие токоферолы
Молоко	Ферментированные продукты, кальций, свободные жирные кислоты
Орехи, фасоль, зерно	Полифенолы, волокна, витамин Е, растительные кислоты, кумарины, протеины
Пряности	Кумарины, куркумин, сизаминол
Чай	Растительные фенолы, эпигаллокатехины
Кофе	Полифенольные кислоты, дитерпены, меланоиды
Вино	Флавоноиды
Вода	Селен

# Антимутагенность ряда пищевых веществ в экспериментах *in vivo*

Вещество	Мутаген	Тест-система
Витамин А	Бенз(а)пирен, циклофосфан	Мыши, МЯ
β-каротин	р-облучение, циклофосфан, ММС, тиоТЭФ	Мыши МЯ, ХрА, китайские хомячки, ХрА
Витамин С	Пестициды, циклофосфан, хром, дихлордигидрокси- хинолин	Мыши, ХрА, кролики МЯ, морские свинки
поливитамины	гама-облучение	Мыши, ХрА
пищевые антиоксиданты	циклофосфан	Мыши, ХрА
ванилин	Митомицин С	дрозофила

флавоноиды	Бенз(а)пирен, диоксидин, фотрин	Мыши, МЯ, ХрА
<del>Растительные фенолы</del>	<del>Бенз(а)пирен</del>	<del>Мыши, ХрА</del>
хлорофиллин	тиоТЭФ, диметилнитрозоамин	Китайский хомячок, ХрА, дрозофила
Мочевая кислота	циклофофан	Мыши, МЯ
аспартам	Диоксидин, циклофосфан	Мыши, МЯ
убихинон	Диоксидин, фотрин, циклофосфан	Мыши, ХрА
кумарин	Бенз(а)пирен, диоксидин	Мыши, МЯ, ХрА

**Таблица 2.** Вещества, действующие как антикластогены в культурах клеток человека и животных, и возможные механизмы их действия [92]

Декластогены	Биоантикластогены		
	изменяющие метаболизм	блокирующие реактивные молекулы	изменяющие синтез ДНК
L-цистеин	L-цистеин	L-цистеин	Таннины
Цистеамины	Цистеамины	Цистеамины	Новобиоцин
Гомоциклические тиолактоны	Гомоциклические тиолактоны	Гомоциклические тиолактоны	Интерферон
N-ацетилцистеин	N-ацетилцистеин	N-ацетилцистеин	Стрептовитацин
Тиолы	Тиолы	Тиолы	Спермин
Унитиол	Унитиол	Унитиол	Полиамины
Цистафос	Цистафос	Цистафос	Циклогексимид
Гаммафос	Гаммафос	Гаммафос	Хлорамфеникол
Витамин С	Таннины	Витамин С	
Витамин Е	Амилобарбитан	Витамин Е	
Растительные фенолы	Фенобарбитал	Бутилгидроксианизол (ВНТ)	
Маннитол	Хлорамфеникол	Бутилгидрокситолуол (ВНА)	
	Индометацин	Антиоксидантные ферменты	
	Ретинол	Селен	
		Селенцистеин	
		$\beta$ -каротин	
		Маннитол	
		Ретинол	

# Пищевые соединения с антимутагенными свойствами

---

- ❑ Растительные пищевые волокна
  - ❑ Пигменты и флавоноиды (рутин, кверцетин, мирацетин)
  - ❑ Витамины С, Е, А
  - ❑ β-каротин
  - ❑ Экстракты ряда культурных и дикорастущих растений (зеленового и черного чая, капусты, зеленого перца, баклажанов, яблок, лопуха, лука, имбиря, мяты и др.)
  - ❑ Пищевые добавки (бутилокситолуол, бутилоксианизол, пропилгаллат, этоксихинин)
-