

Экологическая генетика.
Лекция 5.

Генетическая
ТОКСИКОЛОГИЯ.

Структура экологической генетики

Генетические подходы	Синэкология	Аутэкология
Генетический контроль признаков (наследственность)	Эколого-генетические модели	Генетика устойчивости к факторам среды
Влияние различных факторов на генетические процессы (изменчивость)	Биологические факторы изменчивости (мутагенеза)	Генетическая токсикология

Проблема обеспечения безопасности человека возникла уже на первых этапах развития генетики как экспериментальной науки.

- А.С.Серебровский, 20-е годы высказал опасения, что возникающие и накапливающиеся в генофонде популяций человека мутации могут быть причиной различных патологий и, в конечном счете, привести к вырождению человека как биологического вида.
-

Индукция мутаций

- Г.А. Надсон и Г.С. Филиппов, 1925 г. при облучении дрожжей излучением радия были получены первые индуцированные мутации.
-

Генетическая безопасность приобрела особую актуальность

□ Г.Меллер, 1927 г.

Открытие способности ионизирующего излучения индуцировать мутации - впервые на дрозофиле показана возможность влияния на наследственный аппарат организма с помощью внешних факторов.

□ Л.Стадлер, 1928 г.

Продемонстрирована способность ионизирующего излучения вызывать не только генные мутации, но и хромосомные aberrации.

В 1930-х гг. был открыт химический мутагенез.

- В.В. Сахаров, 1932 г., М.Е. Лобашев, Ф.А. Смирнов, 1934 г. показали, что некоторые химические вещества (йод, уксусная кислота, аммиак) способны индуцировать мутации у дрозофилы.
 - С.М. Гершензон, 1939 г. установил, что чистая ДНК является сильным мутагеном.
 - И.А. Рапопорт, Ш. Ауэрбах, Дж. Робсон, 1940-х доказали, что сильными мутагенами могут быть самые разнообразные вещества: этиленимин, азотистый иприт.
-

60-е годы

- Процесс осознания угрозы генетическому здоровью человечества со стороны химических мутагенов был связан с фактом индукции хромосомных aberrаций в клетках крови людей, подвергшихся воздействию иприта.
-

Генетическая токсикология

- **Александр Холендер, 1969 г.** -
Директор Биологического отдела
Окриджской национальной
лаборатории США создал Общество
по изучению мутагенов
окружающей среды. Этот момент
можно считать рождением
генетической токсикологии как
науки.
-

Задача генетической ТОКСИКОЛОГИИ

- Выявление и устранение генетически активных факторов среды обитания человека, либо разработка мероприятий, направленных на снижение генетических последствий действия факторов среды.
-

Генотоксичность – СМЫСЛ ПОНЯТИЯ

- 1989 г. СОМ (международная организация по изучению мутагенов и канцерогенов)

В широком понимании - свойство вещества, которое является вредным для генетического материала.

В узком – способность вещества реагировать с ДНК либо прямо, либо после метаболической активации.

- 1993 г. Д"Арсиде, Харрон

Любое вредное изменение в генетическом материале независимо от механизма, с помощью которого это изменение возникло.

Генотоксичность – смысл понятия

- **Друкри** – действие любого агента, который благодаря его физическим или химическим свойствам может индуцировать или быть причиной наследуемых изменений в тех частях генетического аппарата, которые осуществляют гомеостатический контроль над соматическими клетками, тем самым определяя их злокачественную трансформацию.
-

Генотоксичность – смысл понятия

□ Ю.А.Ревазова, 1997 г.

Генетическая токсикология -
это

научное направление, связанное с изучением действия факторов окружающей среды на генетические структуры организма.

Что такое **генетически активные факторы** и понятие **генотоксичность**

С.Г.Инге-Вечтомов, 1998 г.

Показателями генотоксичности или генетической активности исследуемого фактора являются:

- 1. мутагенез
 - 2. рекомбиногенез
 - 3. индукция репаративного синтеза
-

Соотношение понятий мутагенность и генотоксичность

- Генотоксичность в узком смысле включает в себя лишь косвенные события, связанные в большей или меньшей степени с мутагенностью. Сами понятия мутагенности, либо генотоксичности, не являются абсолютными, а определены лишь в отношении конкретной тест-системы.
-

Мутагены (генотоксиканты) для одной системы являются потенциальными мутагенами (генотоксикантами) для другой:

Анализ характера ответов в 85 используемых при регистрации генотоксичности тест-системах показал:

- 6-8% случаев химические вещества дают либо позитивные, либо негативные ответы во всех тест-системах
 - Около 85% показывают позитивные ответы в одних системах и негативные – в других.
-

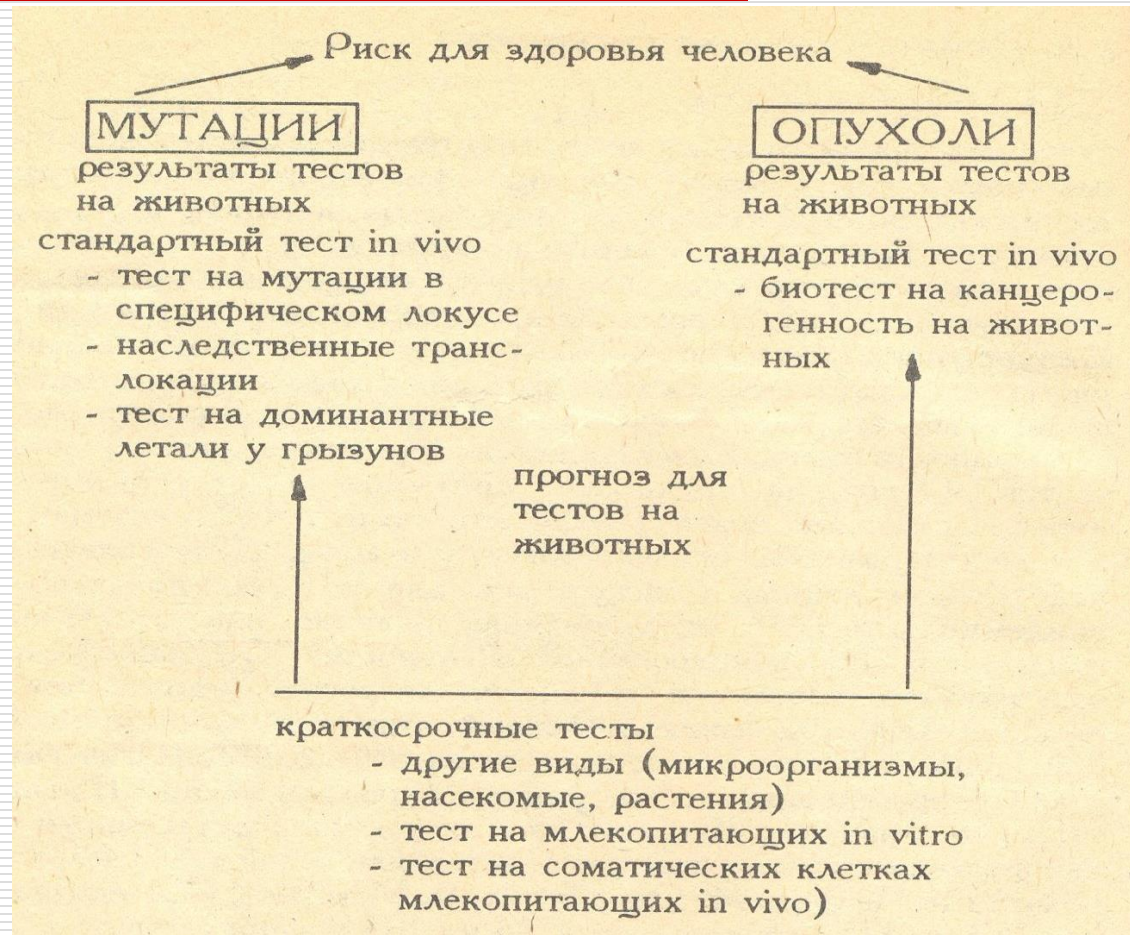
Мак Кенн, 1975 г.

- 157 из 175 канцерогенов и 94 из 108 неканцерогенов дали в тесте Эймса положительный и отрицательный ответы, соответственно.
-

Субнаправления генетической ТОКСИКОЛОГИИ

- 1. оценка собственно генетического мутационного риска – эффектов в половых клетках человека
 - 2. оценка генетических эффектов в соматических клетках человека в связи с их потенциальной канцерогенной опасностью
-

Общая схема биотестирования



Основная задача, которую решает генетическая токсикология – это оценка риска возникновения мутаций в половых и соматических клетках.

- В процессе становления генетической токсикологии была сформулирована своя **методология** и свои собственные **методы** анализа.
 - В то же время генетическая токсикология **не учитывает механизмы** становления мутаций как таковые, механизмы интересны ей только с точки зрения оценки генетических последствий.
-

Генетически активные факторы:

- 1. физические – температура, ионизирующая радиация, УФ-свет, ультразвук, высокочастотное электромагнитное поле
 - 2. химические – любые вещества, прямо или косвенно нарушающие структуру и воспроизведение молекул ДНК: алкилирующие соединения или радиомиметики (выхлопные газы автотранспорта и выбросы производств), органические соединения ртути, полициклические углеводороды, соли тяжелых металлов и др.
-

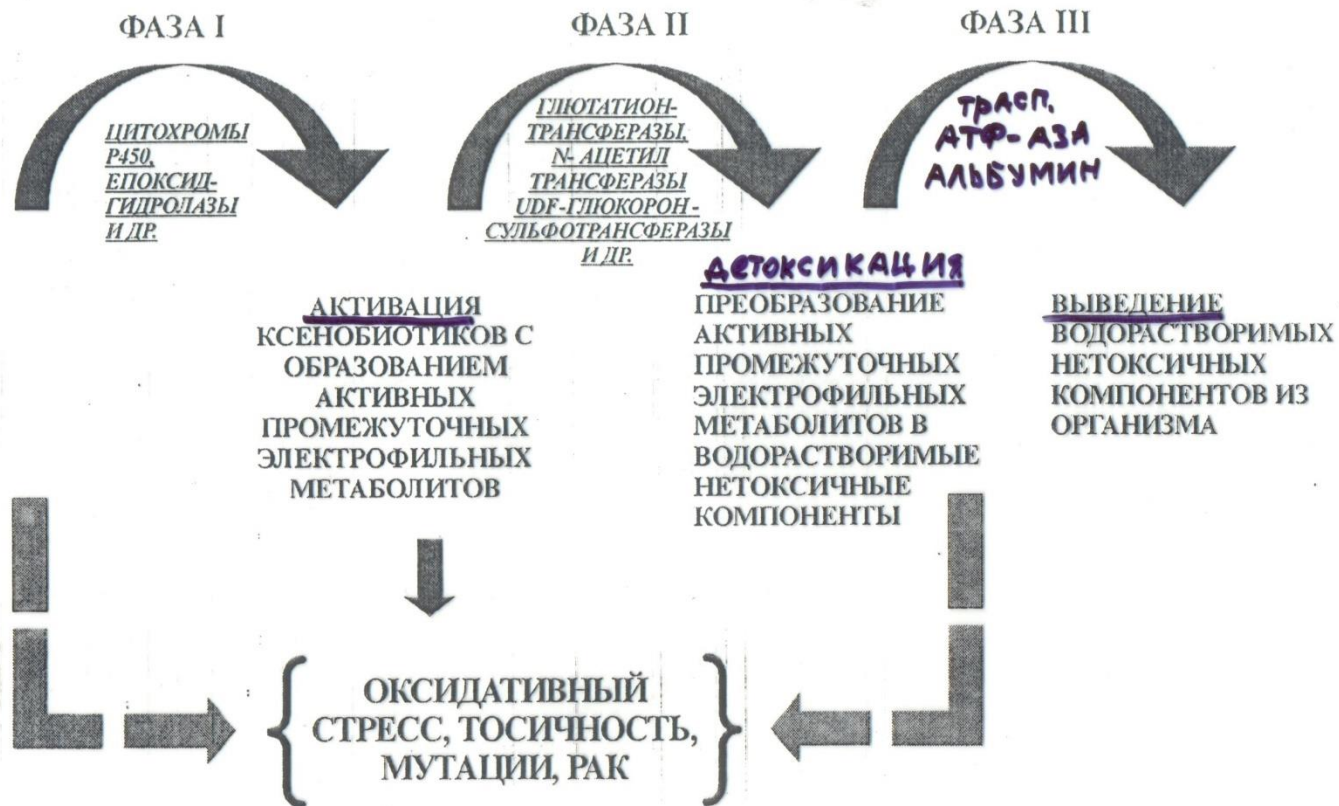
Ксенобиотики – чужеродные для организма вещества (ранжирование)

- 1. пестициды
 - 2. тяжелые металлы
 - 3. диоксид углерода
 - 4. диоксид серы и продукты ее окисления
 - 5. сточные воды промышленных предприятий
 - 6. разливы нефти
 - ... 12. радиоактивные отходы
-

Биотрансформация ксенобиотиков

- **Биотрансформация** – это ферментативное превращение жирорастворимых экзогенных или эндогенных соединений в полярные водорастворимые метаболиты, легко выводимые из организма.
 - Гены детоксикации ксенобиотиков получили название генов «внешней среды»
 - В трехэтапном процессе биотрансформации ксенобиотиков принимает участие более 200 различных ферментов
-

Механизм биотрансформации ксенобиотиков



Фаза 1 активации

- Обеспечивается многочисленным семейством ферментов – цитохромов P450, а также микросомальной эпоксидгидролазой, эстеразами, амидазами, алкогольдегидрогеназой и альдегиддегидрогеназой.
- Основная функция – образование в молекуле гидрофильных групп
- Особенность системы ферментов: избирательная локализация, высокая мощность, многообразие путей метаболизма.

Фаза 2 детоксикация

- Принимают участие ферменты глутатионтрансферазы, глюкоронилтрансферазы, сульфотрансферазы, ацетилтрансферазы, метилтрансферазы и т.д.
- Основные ферменты данной фазы – гидролазы и трансферазы осуществляют нейтрализацию гидрофильных и зачастую токсичных продуктов фазы 1, превращая их в полярные, водорастворимые, нетоксичные соединения
- ~~□ Ферменты фазы 2 есть во всех клетках~~

Фаза 3 выведения

- Важная роль белка плазмы крови – альбумина, связывает и транспортирует метаболиты экзогенных и эндогенных субстратов
 - Фаза связана с выведением продуктов детоксикации через легкие, почки, кишечник с помощью транспортной АТФ-азы, осуществляющей гидролиз продуктов детоксикации
-

Значение биотрансформации

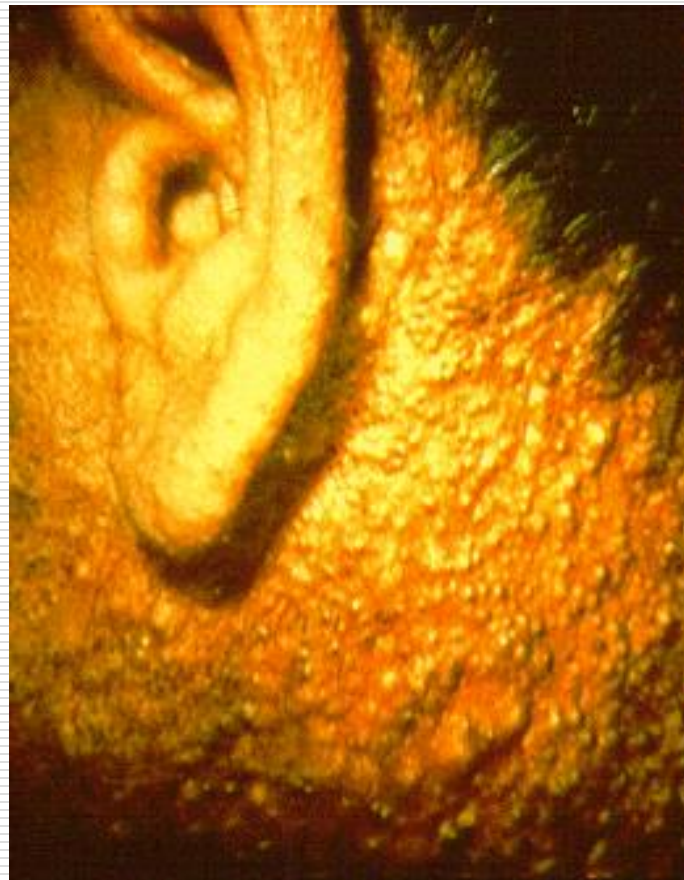
Генетически запрограммированная система биотрансформации, деградаци и выведения ксенобиотиков делает уникальным каждого индивидуума в отношении его адаптационных способностей, т.е. **устойчивости к повреждающим внешним факторам** (раздел экологической генетики).

Диоксины.

- «Приоритетными» органическими загрязнителями окружающей среды являются полихлорированные диоксины, относящиеся к особому классу токсикантов.
 - Характеристика - особый класс гормоноподобных, полифункциональных, дисрегуляторных, дезадаптогенных суперэкоотоксикантов.
-

Исторический аспект

- 30-е годы
заболевание
хлоракне –
результат
воздействия сильных
антисептиков –
хлорфенолов



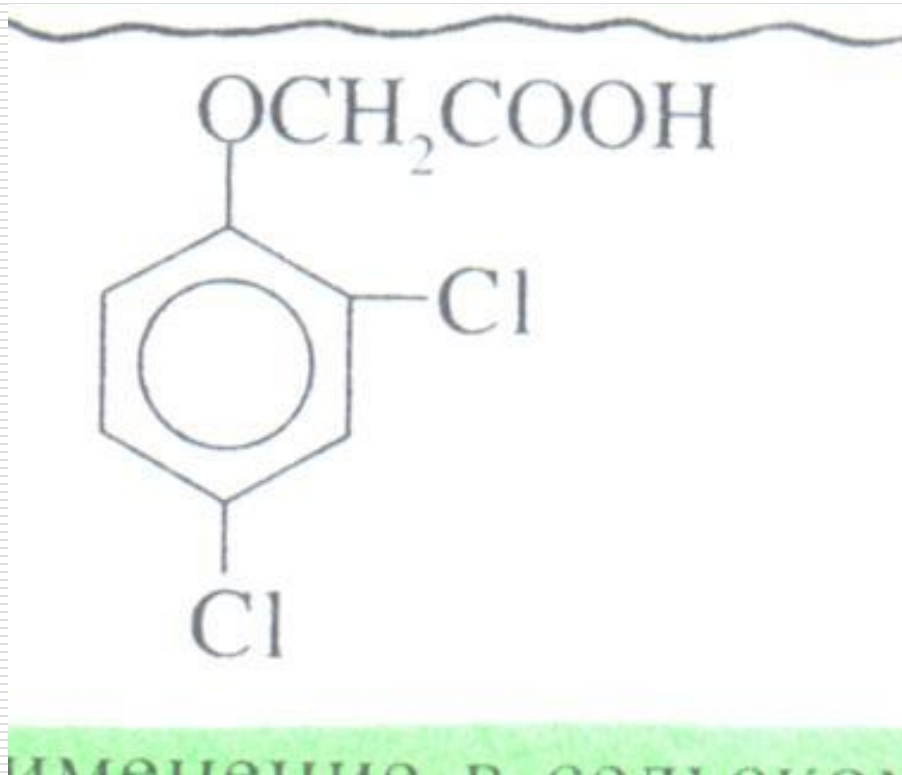
Виктор Ющенко, экс-президент Украины



1962 – 1971 гг. война во Вьетнаме

- Американские войска широко использовали дефолиант agent orange. Всего над джунглями было распылено 57 тыс.тонн этого препарата, в котором в качестве примесей содержалось около 170 кг диоксина. Сейчас этот дефолиант известен под названием 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота)
-

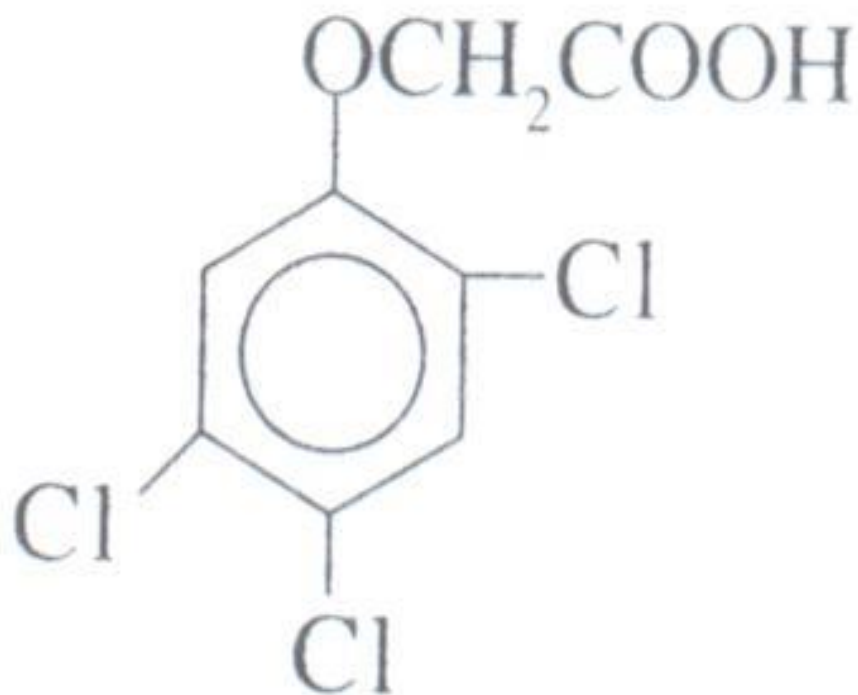
2,4 Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) = agent orange



1976 г. Севезо (Италия)

- Авария на заводе химических продуктов привела к распылению в окружающей среде предприятия и населенного пункта сотни тонн пестицида 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты. Это привело к гибели большого количества людей и сельскохозяйственных животных. Резко возросла частота онкологических заболеваний.
-

2,4,5-Т (2,4,5 - трихлорфеноксиуксусная кислота)



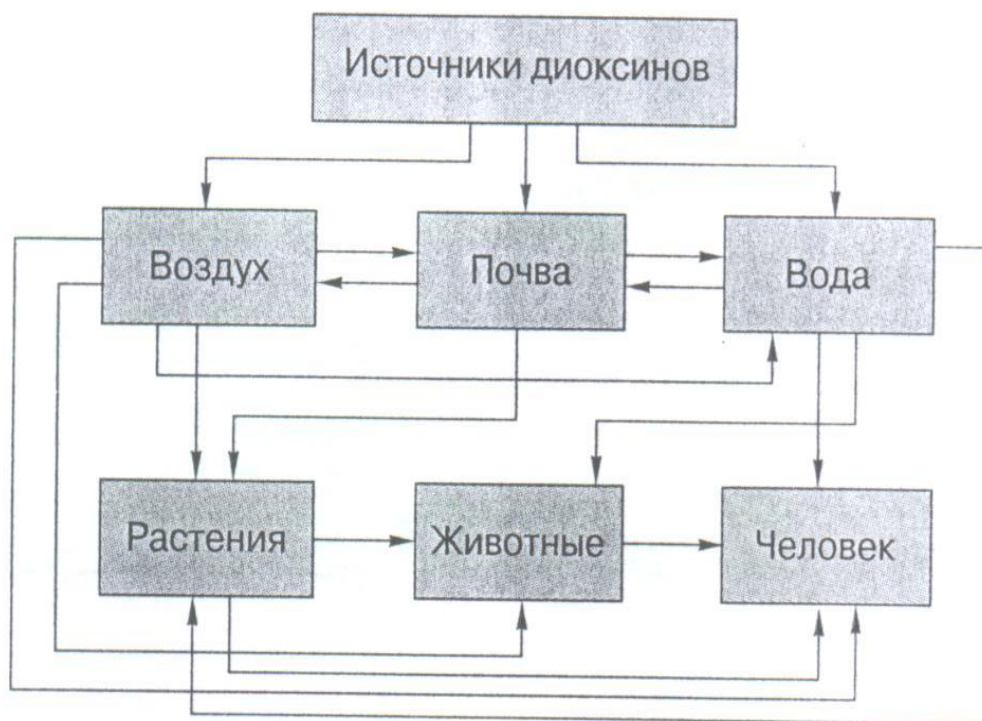
Распространение диоксинов (диоксиновый фон)

- Проблема диоксинов приобрела глобальный характер благодаря тому, что их стали выявлять в качестве примесей в различных местах:
 - почвы (гербициды, хлорфенолы)
 - выхлопные газы
 - продукты сжигания мусора
 - грудное молоко кормящих женщин
 - выбросы целлюлозно-бумажной промышленности
 - водные экосистемы (рыба)
-

Свойства диоксинов

- Хорошо растворимы в органических растворителях и практически нерастворимы в воде;
 - Характеризуются высокой химической устойчивостью, сохраняющейся даже при высокой температуре;
 - Высокая адгезия к частицам почвы, золы, донным отложениям
-

Круговорот диоксинов

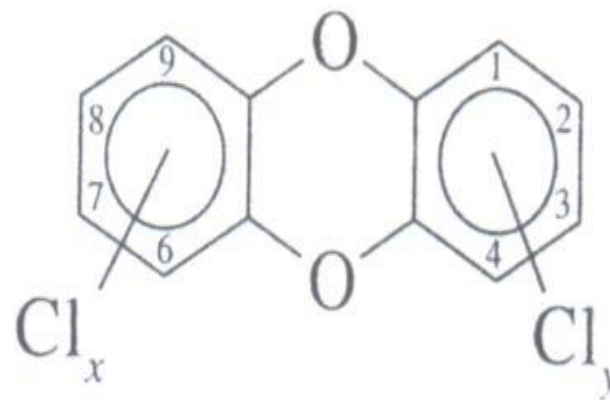


Источники полихлорированных органических соединений

- ❑ 1. предприятия промышленного хлорорганического синтеза
 - ❑ 2. целлюлозо-бумажное производство (салфетки, детские пеленки, носовые платки, упаковка). Отбеливание бумаги без использования хлора маркируется "chlorine free"
 - ❑ 3. горящие свалки отходов
 - ❑ 4. золоотвалы ТЭЦ
-

Физико-химические свойства ДИОКСИНОВ

- Дибензо-*p*-диоксины относятся к гетероциклическим полихлорированным соединениям



ные им дибензофураны, соде

Токсическое действие диоксинов:

- Зависит от числа атомов хлора и их положения в структуре молекулы.
 - Максимальной токсичностью обладает 2,3,7,8-тетрахлордибензодиоксин.
 - Ряд диоксинов по токсическому действию близки к отравляющим веществам типа зарина, зомана, табуна.
-

Биологические эффекты диоксинов:

- *Первичные эффекты* – в организме человека их действие связывают с высокой специфичностью к цитозольному Ah-рецептору (особый представитель систем сигнальной трансдукции), контролирующему активацию генов A1 и A2 на 15 хромосоме человека и накоплению неспецифических монооксигеназ P4501A1 и P4501A2. Комплекс диоксина с рецептором может подавлять работу гена монодиокси-редуктазы на 16 хромосоме, отвечающего за восстановление диоксиновой группировки, с которой реагируют радикалы.

Биологические эффекты диоксинов:

- *Вторичные эффекты* – связаны с биокатализаторами – гемопротеинами. Их накопление опасно, т.к. в комплексе с диоксинами они включают механизм расхода энергетических ресурсов клетки на превращение свободных радикалов, которые ведут к мутагенезу, биодеградации гормонов, витаминов, липидов, разрушению биомембран.
-

Предельно допустимые концентрации диоксинов

- В 80-е годы величины безопасного поступления ДПС (диоксиноподобных соединений) в организм человека, установленные различными национальными и международными организациями с использованием консервативных одноточечных оценок экспозиции, различались на **три порядка**.
-

Пороговые дозы в разных странах

ДОПУСКАЕМЫЕ СУТОЧНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ ПРИЕМА

pg TEQ/кг b.w. за сутки

США/ЕРА	0.006
Германия	1.0 ¹ , 1-10 ² и 10 ³
Канада	10
Северные страны	5.0

¹ Значение предосторожности, воздействие на здоровье человека с высокой вероятностью исключено; ¹ не ожидаются воздействия на здоровье, но нет достаточного запаса с точки зрения здоровья; ¹ значение интервенции при превышении суточного приема диоксина этой величины в течение длительного промежутка времени

Дозы допустимого поступления диоксинов в организм человека

- В России доза составляет 10 нг\кг (10-8г\кг) Кормящая мать способна передать ребенку во время кормления грудным молоком до $1/4$ диоксиновой нагрузки своего организма
- В основном диоксины поступают в организм человека с пищевыми продуктами, прежде всего, с мясом и молоком. Из пищевых источников на первом месте стоят животные жиры. В Уфе и Стерлитамаке жители ежедневно потребляют около 100 пг диоксинов, что близко по значению с показателями в других промышленно развитых регионах Европы.
-

Концентрация диоксинов в продуктах питания

содержание
ПРОЦЕНТНОЕ ПОДВЕРГАНИЕ PCDD/F
В РАЗНЫХ СТРАНАХ

Источник	Гол- ландия	США	Фин- ляндия
Овощи	16 %		
Коровье молоко	17 %	15 %	12 %
Молочные продукты	26 %	20 %	19 %
Яйца	-	3,4 %	3 %
Свинина	4,2 %	10 %	0,4 %
Говядина	13 %	31 %	0,2 %
Птица	4,8 %	11 %	-
Рыба	26 %	7 %	59 %
Почва, дых.	3 %	3 %	-

содержание
РАСЧЕТНОЕ СРЕДНЕЕ ФОНОВОЕ
ПОДВЕРГАНИЕ PCDD/F В РАЗНЫХ
СТРАНАХ

Страна	<i>Содержание</i> Подвержение PCDD/F (pg TEQ/ст) (pg TEQ/kg b.w./ст)	
Финляндия ¹	95	1.4
Германия ²	79-158	1-2.3
Голландия ³	118-126	1.75
Канада ⁴	140-290	2-4.1
Англия ⁵	125	1.8
США ⁶	18-192	0.3-3

¹Hallikainen & Vartiainen 1994, ²Furst et al. 1990/1991, ³Theelen 1991, ⁴Gilman & Newhook 1991, ⁵HMSO 1992, ⁶Schechter et al. 1994

Чувствительность к диоксинам

Смертельность TCDD

*Дифференциальная чувствительность
разных видов животных*

Виды

LD₅₀ мкг/кг

Морская свинка		1-2
Макак резус		14-34
Крыса	L-E	10-20
	S-D	30-60
	H/W	> 10,000
Мышь	C57B1/6	150-200
	DBA/2	600-2500
Хомяк		1100-5000

Хлорорганические пестициды

- ❑ Структурно родственные диоксидам соединения
 - ❑ В структуре молекулы присутствуют ароматические ядра
 - ❑ Применение под запретом
 - ❑ Очень медленно разлагаются, накапливаются и передаются по пищевым цепям (период полураспада ДДТ и дельдрин в почве – 15-20 лет)
 - ❑ Влияют на репродуктивную функцию млекопитающих, птиц
 - ❑ Индикатором загрязнения считают рыбу (балтийская салака)
-

Концентрация диоксинов в молоке кормящих женщин

PCDD/F В МАТЕРИНСКОМ МОЛОКЕ
В 1987 г.

Страна	Городская	Сельская
	местность	местность
	(pg TEQ/г жира)	
Австрия	17.1	18.6
Бельгия	40.2	33.7
Канада	23.0	15.6
Хорватия	12.0	11.8
Дания	17.8	-
Финляндия	18.0	15.5
Германия	32	31.6
Венгрия	9.1	11.3
Голландия	39.6	37.4
Норвегия	19.4	15.0
Англия	37.1	29.1

PCDD/F В МАТЕРИНСКОМ МОЛОКЕ
В 1992-93 г.г.

Страна	Городская	Сельская
	местность	местность
	(pg TEQ/г жира)	
Австрия	10.7	10.9
Бельгия	27.1	20.8
Канада	15.7	10.8
Хорватия	8.4	13.5
Дания	15.2	-
Финляндия	21.5	12.0
Германия	16.5	-
Венгрия	8.5	7.8
Голландия	22.4	22.4
Норвегия	12.1	9.3
Англия	17.9	15.2



Содержание диоксинов в связи с потреблением рыбы

УРОВНИ PCDD/F В ТКАНЯХ ЧЕЛОВЕКА (pg TEQ/ г жира) И ПОТРЕБЛЕНИЕ РЫБЫ БАЛТИЙСКОГО МОРЯ

Страна	Среднее (диапазон), количество
--------	--------------------------------

– рыба не потребляется	17.5 (12-32), 9
------------------------	-----------------

– нормальное потребление рыбы	25.8 (12-48), 9
----------------------------------	-----------------

– высокое потребление рыбы	63.5 (20-88), 11
-------------------------------	------------------

• Svensson, New Eng. J. Med. 1991

Совместный Российско-Вьетнамский
Тропический центр (Межправительственное
соглашение 1987 г.)

- **Объект исследования** – большие статичные субпопуляции вьетнамских крестьян, высокоэкспонированных диоксинсодержащими военными фитотоксикантами в результате широкомасштабного проведения операции «Ranch Hand» в ходе II Индокитайской войны.
-

Совместный Российско- Вьетнамский Тропический центр

- **Задачи исследования** –
разработка методологических
основ выявления и характеристики
отдаленных медико-биологических
последствий острой интоксикации
населения Южного Вьетнама
Оранжевым агентом и
хронического воздействия
сформированного его
применением диоксинсодержащего
экоотоксиколо-гического фактора.

Совместный Российско- Вьетнамский Тропический центр

- Результаты исследования:
 - нарушения медико-генетических характеристик (увеличение частоты патологии репродуктивной функции, возрастание числа детей с пороками развития, увеличение числа мертворождений);
 - ослабление функционального состояния организма (задержка наступления половой зрелости, нарушение периодичности циклов, отклонения в течении беременности и родов);
-

- изменения в хромосомном аппарате клеток людей, подвергшихся воздействию ДЭФ (дестабилизация и аномальное функционирование хромосомного аппарата, фрагментация хроматина, повышение частоты сестринских хроматидных обменов, частоты микроядер

Отдаленные медицинские последствия действия диоксинсодержащих соединений

- Саркома мягких тканей
 - не-Ходжкинская лимфома
 - Лимфогрануломатоз (болезнь Ходжкина)
 - Хлоракне
 - Острая кожная порфирия
 - Опухоли органов дыхания
 - Множественная миелома
 - Рак предстательной железы
 - аутоиммунные дисфункции
-

Международные симпозиумы

- Диоксин – 90 (Канада, 1990)
 - Диоксин – 91 (США, 1991)
 - Диоксин – 92 (Финляндия, 1992)
 - Диоксин – 93 (Австрия, 1993)
 - Диоксин – 94 (Япония, 1994)
 - Диоксин – 95 (Канада, 1995)
 - Диоксин – 96 (Нидерланды, 1996)
-

Меры предупреждения

- С 1980 г. ежегодно проводятся международные конференции по полихлорированным диоксинам и родственным соединениям
- 1992 г. – план запрещения и ликвидации диоксинов на планете.
- 1996 г. – начало работы СПбНЦ по научной программе «Диоксины», создана карта диоксинового загрязнения СПб в 1998 г.
- 2003 г. – Стокгольмская конвенция по СОЗ (стойкие органические загрязнения), к которой присоединилась и Россия.

Немецкие фермы закрывают

- Россельхознадзор ужесточил контроль продукции животноводства, импортируемой из ФРГ, в связи с заражением мяса птицы диоксином. 5 января 2011 г. стало известно, что производитель кормов для птицы Harles & Jentzsch добавлял в свою продукцию остатки жирных кислот, полученных при выпуске биодизельного топлива.
-

Германия, 2011 г.

- В Германии запрещена продажа свинины, мяса птицы и яиц, произведенных на закрытых ранее более 4700 фермах этой страны, продукция которых содержит диоксин сверх допустимых норм.
-

Схема тестирования, предложенная Департаментом здоровья Великобритании

- Стадия 1. Тесты in vitro
 - а). бактериальный тест на генные мутации
 - б). тест на кластогенность в клетках млекопитающих (метафазный анализ)
 - с). тест на генные мутации в клетках млекопитающих
-

Схема тестирования, предложенная Департаментом здоровья Великобритании

- Стадия 2. Тесты *in vivo* (эффекты в соматических клетках)
 - а). Тест в клетках костного мозга на повреждение хромосом (метафазный анализ или тест на микроядра)
-

Схема тестирования, предложенная Департаментом здоровья Великобритании

- Стадия 3. Тесты *in vivo* (эффекты в половых клетках)
 - а). тесты, показывающие взаимодействие с ДНК
 - б). тесты, показывающие потенциальный наследственный эффект
 - в). тесты для количественной оценки наследственных эффектов
-