

УДК 612.014.4.083.36

Г. Г. ОГАНЕСЯН

МЕТОДЫ И ПРОБЛЕМЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТОКСИКОЛОГИИ

Представлен краткий обзор стратегии тестирования мутагенности *in vitro* и *in vivo* и оценки генотоксичности новых потенциальных противоопухолевых соединений (производных порфиринов) и противоопухолевого препарата цисплатины методами ДНК-комет, Comet-FISH и микроядерным тестом. Представленные направления являются важными для развития генетической токсикологии в Армении.

В современном мире крайне актуальна не только задача охраны природы от вмешательства человека, но и охрана самого человека от воздействия измененной им природы. Выявление и устранение генетически активных факторов из среды обитания человека – задача генетической токсикологии, которая представляет собой весьма активно развивающийся раздел экологической генетики.

Цели и принципы тестирования генотоксичности. Батареи тестов на генотоксичность. Генотоксичность обусловлена прямым и косвенным воздействиями на ДНК, к числу которых относят индукцию мутаций (генных, хромосомных, геномных, рекомбинационных), косвенные эффекты, связанные с мутагенезом («внеплановый» синтез ДНК) и повреждения ДНК (например, образование ДНК-аддуктов), которые могут приводить к возникновению мутаций.

Генетические изменения могут являться причиной возникновения наследуемых дефектов и опухолей [1]. Данные по корреляции между мутагенностью и канцерогенностью позволили Международному агентству по изучению рака (МАИР) рекомендовать применение тестов на мутагенность для выявления потенциальных канцерогенов. Однако в подобных исследованиях учитывается, что помимо генотоксичных существует также множество негенотоксичных канцерогенов [2]. По результатам краткосрочных тестов на мутагенность создана база данных по профилю генетической активности (Genetic Activity Profile database), в которой полученные данные суммируются и обобщаются с учетом классификации канцерогенов, принятой МАИР [3].

Многообразии в окружающей среде потенциальных генотоксикантов (радиационных, химических и биологических) и механизмов их действия на

геном, а также межвидовые различия в чувствительности к генотоксическим соединениям осложняют разработку адекватных подходов к системе их тестирования. Так как ни один из генетических тестов не позволяет выявлять все генотоксические эффекты, то для их анализа применяют батареи тестов. Батарея включает ограниченное количество дополняющих друг друга валидированных тестов. Валидирование предполагает оценку способности тестов выявлять и прогнозировать потенциальный риск генотоксикантов для здоровья человека [4].

Предполагается, что генотоксичность должна оцениваться *in vitro* и *in vivo* для определения соединений, вызывающих генетические повреждения как прямым, так и непрямым способом. Тесты должны позволять определять повреждения ДНК, а также нерепарированную долю этих повреждений в виде генных мутаций, хромосомных повреждений, рекомбинаций и числовых нарушений хромосом.

Комитет по изучению мутагенности *соединений, присутствующих в пище*, рекомендует трехэтапную стратегию тестирования [5].

Первый этап включает три теста *in vitro*:

- Тест на генные мутации у бактерий. Показано, что большинство позитивных по этому тесту генотоксикантов являются канцерогенами.
- Тест на генные мутации в клетках млекопитающих.
- Тест на хромосомные аберрации в клетках млекопитающих.

Второй этап включает оценку генотоксичности в тест-системе *in vivo* для соединений, проявивших мутагенную активность в одном из тестов первого этапа. При этом рекомендуется оценивать хромосомные повреждения в клетках костного мозга или микроядра в клетках костного мозга или эритроцитах периферической крови. Для оценки повреждений ДНК предлагается применять метод ДНК-комет.

На *третьем этапе*, при необходимости, вещества, проявившие мутагенность *in vivo*, проверяются на половых клетках. На данном этапе могут быть сделаны определенные предположения относительно наследуемости индуцируемых данными мутагенами повреждений.

Вещества, которые являются позитивными в данных тестах, считаются потенциальными мутагенами/канцерогенами. Отсутствие позитивных результатов в стандартной батарее из трех тестов, как правило, является основанием для утверждения о достаточном уровне безопасности исследуемого соединения. В основном, батарея из трех стандартных тестов является достаточной для оценки генотоксичности. Представленный анализ разных программ генотоксического тестирования [6–8] свидетельствует о том, что увеличение количества тестов, как правило, не приводит к повышению чувствительности в оценке потенциальных канцерогенов.

В результате трехстороннего соглашения между странами Евросоюза, Америкой и Японией на Международной конференции по гармонизации [9] был разработан унифицированный подход для оценки генотоксичности *фармацевтических препаратов*. В разработанном на конференции руководстве для оценки генотоксичности предлагается аналогичная стандартная батарея из трех тестов. В последнем руководстве [10], которое объединяет предыду-

щие, также предлагается схема интерпретации результатов с точки зрения повышения точности прогноза последствий действия генотоксических соединений на здоровье человека.

Согласно руководству Европейского научного комитета по оценке *непищевых продуктов и веществ, применяемых в косметической промышленности*, для оценки генотоксичности/мутагенности/канцерогенности красок для волос рекомендуется батарея из шести тестов *in vitro*. В то же время в работе [11] предлагается упростить анализ и применять для этих же целей три теста – оценку генных мутаций на бактериях и в клетках млекопитающих и микроядерный тест *in vitro*.

Однако в ряде случаев возникает необходимость в применении и других методов. В руководстве по тестированию генотоксикантов [9] не исключается применение новых методов и тест-систем. В частности, для детекции одиночных и двойных разрывов ДНК предлагается применение метода ДНК-комет, который позволяет быстро и эффективно количественно оценивать разрывы в ДНК.

Одним из современных направлений геномики является токсикогеномика, в рамках которой изучается потенциальное действие токсикантов на экспрессию генов методом ДНК-чипов. Показано, что по изменению профиля экспрессии генов можно различать генотоксичные и негенотоксичные канцерогены, генотоксины, реагирующие и не реагирующие с ДНК, а также с разным механизмом взаимодействия с ДНК. Этот подход рассматривается как дополнительный и исключительно перспективный для оценки генотоксического риска для человека [12].

Потенциальные генотоксиканты окружающей среды. Так как человек сталкивается в повседневной жизни с тысячами различных ксенобиотиков, в том числе вновь синтезированных, тотальная проверка всех этих соединений невозможна. Одним из основных принципов генетической токсикологии является выборочность тестирования, определяемая предполагаемым масштабом применения исследуемых соединений. В частности, в связи с широкой распространенностью, длительностью и регулярностью применения тотальной проверке на мутагенность подлежат все вновь синтезированные лекарственные препараты [13]. Приоритетными также считаются исследования генотоксичности компонентов пищевых продуктов. Пища, согласно заключению Международной организации по исследованию канцерогенного риска, является источником смеси мутагенов и канцерогенов разной природы [14]. Подобные исследования позволят разрабатывать пищевые рационы с оптимальным балансом мутагенных и антимутагенных факторов с целью снижения возможных негативных последствий.

Альтернативные методы тестирования с применением клеточных линий. В последнее время начали широко применяться методы тестирования на основе клеточных линий человека и животных [15]. Эти методы используются при изучении токсикологических и фармакологических свойств лекарственных препаратов и других веществ. Главной целью применения этих методов является не только гуманное отношение к лабораторным животным, но и снижение затрат на проведение тестирования.

Проведение скрининга новых соединений с помощью тест-систем *in vitro* приводит к сокращению времени и финансовых затрат на проведение экспериментов в основном за счет сокращения использования лабораторных животных. Кроме того, использование тест-систем на основе клеток человека дает более адекватный ответ о последствиях вмешательства в организм лекарственного вещества или токсинов. Исследуя цитотоксичность и генотоксичность препаратов на культуре клеток, можно получить результат в течение одного дня.

Однако клеточные линии, как правило, имеют множество генетических дефектов, что создает предпосылки для получения ложно-положительных результатов. Множество ферментов, имеющих решающее значение для проявления действия тех или иных мутагенов *in vivo*, отсутствуют *in vitro*. Если концентрация субстрата значительно повышена, то некоторые ферменты, неактивные в условиях *in vivo*, могут активироваться *in vitro*. Существуют данные о том, что применение культур лимфоцитов человека является наиболее приемлемым подходом, позволяющим снизить вероятность ложно-положительных результатов. Методами генетической инженерии создаются клеточные линии с инкорпорированными в них генами отсутствующих ферментов [16]. В качестве альтернативы рассматривается применение клеточных линий нормальных тканей и первичные культуры клеток. Однако сроки жизни таких клеток в культуре ограничиваются часами или днями [6]. Таким образом, с повестки дня не снимается проблема создания новых клеточных систем с соответствующими чувствительностью и специфичностью.

Тестирование генотоксичности потенциальных противоопухолевых препаратов. Фармакологические препараты, используемые в клинической практике, а также находящиеся в стадии разработки, широко исследуются с помощью различных тестов на генотоксичность. Для лекарственных препаратов, применяемых в клинике, подобные исследования позволяют изучать механизмы их взаимодействия с ДНК, объективно оценивать последствия их действия и побочные эффекты, а также при необходимости находить их более эффективные и безопасные аналоги. Новые потенциальные лекарственные препараты проходят обязательную проверку на генотоксичность.

Анализ повреждений ДНК, индуцированных противоопухолевым препаратом цисплатиной в дозах, сравнимых с терапевтическими, в лейкоцитах здоровых людей методом ДНК-комет (гель-электрофорез единичных клеток) показал, что препарат формирует сшивки ДНК и за счет этого достоверно снижает степень индуцированной УФ-С миграции ДНК [17]. В дальнейшем действие цисплатины на всю ДНК в целом и на теломерные участки было изучено с применением техники Comet-FISH – метод ДНК-комет в сочетании с флуоресцентной гибридизацией *in situ*. Новый комбинированный подход позволяет оценивать на одном и том же препарате повреждения как всей ДНК, так и ее специфических участков. В исследовании применялись специфичные для теломер PNA-пробы (протеин-нуклеиновая кислота). Полученные результаты свидетельствуют о том, что цисплатина более активно повреждает теломеры, чем ДНК в целом [18]. Идея разработки лекарств, избирательно действующих на теломеры, рассматривается в некоторых

публикациях как один из возможных подходов для специфического повреждения опухолевых клеток [19].

Синтезированные на кафедре фармацевтической химии Ереванского государственного медицинского университета аналоги порфиринов изучались в качестве потенциальных противоопухолевых средств. В рамках этих исследований оценивалась их генотоксичность методом ДНК-комет. Выбор метода был обусловлен одним из возможных принципов выбора батареи тестов, основанном на данных об успешном применении данного метода при оценке соединений с аналогичной химической структурой [20]. Ранее аналоги порфиринов изучались методом ДНК-комет в работах [21–24]. Изученные порфирины проявили себя как слабые генотоксиканты. По уровню генотоксичности вещества были ранжированы следующим образом: $\text{TOEt4PyP} < \text{TOEt4PyMn} < \text{TOBut4PyP} < \text{TOBut4PyMn}$. Было показано, что бутил-производные более генотоксичны, чем этил-производные. Кроме того, добавление Mn увеличивает генотоксичность как этил-, так и бутил-аналогов порфиринов [25]. Также было показано, что TOEtPyP и TOEtPyZn в концентрациях от IC 50 до IC 50/5 не индуцируют образование микроядер [26].

Генотоксические эффекты могут являться результатом как прямого так и непрямого взаимодействия веществ с ДНК, что представляет собой одну из проблем адекватного тестирования [27]. Неклеточная версия метода ДНК-комет основана на воздействии изучаемым веществом на ДНК, очищенную после лизиса от клеточной и ядерной мембран и большинства ядерных белков [28]. Данная версия позволяет идентифицировать соединения, непосредственно действующие на ДНК и вызывающие ее повреждения опосредованно через цитотоксичность. Новый порфирин TOEt4PyP индуцирует зависящие от доз повреждения ДНК как в стандартной, так и в неклеточной версиях метода ДНК-комет. Полученный результат свидетельствует о том, что TOEt4PyP может взаимодействовать непосредственно с ДНК [29, 30]. Генотоксичность новых порфиринов – TOEt4PyP и его Ag-, Zn- и Co-производных – изучалась на лейкоцитах мышей *in vivo* методом ДНК-комет. Уровень повреждений ДНК достоверно повышался через 6 и 24 часа после введения препаратов [31].

Полученные данные позволяют охарактеризовать новые аналоги порфиринов, как соединения со слабой генотоксической активностью *in vitro* и на уровне индукции разрывов ДНК *in vivo*.

Интерпретация результатов тестирования. В обзоре [27] обобщены основные результаты работы экспертной рабочей группы по идентификации опасности и оценке риска на основе тестирования генотоксичности *in vitro*. Экспертная группа отметила высокую частоту позитивных результатов, не коррелирующихся с канцерогенностью изучаемых соединений. Таким образом, подчеркивается необходимость разработки новых подходов для адекватной интерпретации позитивных результатов в тестах *in vitro* с точки зрения прогноза опасности для здоровья человека. Другая проблема связана с тем, что генотоксичность может быть обусловлена механизмами, не связанными с прямым взаимодействием генотоксиканта с ДНК. Эти механизмы могут иметь нелинейный, пороговый или зависящий от доз характер. Их учет необходим для более корректной оценки уровней экспозиции, опасных для человека.

Заключение. Таким образом, тестирование потенциальных генотоксикантов окружающей среды необходимо осуществлять с применением комплекса тестов *in vitro*, т.е. альтернативных методов скрининга с применением клеточных линий. Соединения, отобранные в экспериментах *in vitro* как наиболее перспективные, должны тестироваться также *in vivo* на уровне организма. Эти принципы используются в большинстве современных исследований, включая наши работы по тестированию генотоксичности потенциальных противоопухолевых препаратов. Представленные направления исследований являются исключительно важными и перспективными для развития генетической токсикологии в Армении.

Кафедра генетики и цитологии

Поступила 02.03.2009

ЛИТЕРАТУРА

1. **Ashby J.** *Mutat. Res.*, 1991, v. 248, p. 221–231.
2. **Waters M.D., Stack H.F., Jackson M.A.** *Mutat. Res.*, 1999, v. 437, № 1, p. 21–49.
3. **Waters M.D., Stack H.F., Garrett N.E., Jackson M.A.** *Environmental Health Perspectives*, 1991, v. 96, p. 41–45.
4. The Assessment of Mutagenicity. Health Protection Branch Mutagenicity Guidelines. Canada, 1993.
5. Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, C.P.a.t.E.C.U., 2000. Guidelines on a strategy for testing of chemicals for mutagenicity.
6. **Eisenbrand G., Pool-Zobel B., Baker V., Balls M., Blaauboer B.J., Boobis A., Carere A., Kevekordes S., Lhuguenot J.-C., Pieters R., Kleiner J.** *Food and Chemical Toxicology*, 2002, v. 40, p. 193–236.
7. **Benigni R.** *Mutagenesis*, 1992, v. 7, p. 335–341.
8. **Zeiger E.** *Mutat. Res.*, 1994, v. 304, p. 309–314.
9. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Genotoxicity. A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals, Recommended for Adoption at Step 4 of the ICH Process on 16 July by the ICH Steering Committee (Final Draft), 1997.
10. ICH Harmonised Tripartite Guideline. S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use, Recommended for Adoption at Step X of the ICH Process on by the ICH Steering Committee, 2008.
11. **Kirkland D.J., Henderson L., Marzin D., Müller L., Parry J.M., Speit G., Tweats D.J., Williams G.M.** *Mutat. Res.*, 2005, v. 588, № 2, p. 88–105.
12. **Thybaud V., Le Fevre A.-C., Boitier E.** *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2007, v. 48, p. 369–379.
13. **Середенин С.Б., Дурнев А.Д.** Фармакологическая защита генома. М., 1992, с. 162.
14. Food as a source of complex mixtures and carcinogens. World Health Organ. Int. Agency Res. Cancer. Lion, 1990, p. 339–407.
15. Alternative (Non-animal) Methods for Chemicals Testing: Current Status and Future Prospects. A Report prepared by ECVAM and the ECVAM Working Group on Chemicals. European Centre for the Validation of Alternative Methods, Institute for Health & Consumer Protection, European Commission Joint Research Centre, 21020 Ispra (VA), Italy.
16. **Kirkland D., Pfuhler S., Tweats D., Aardema M., Corvi R., Darrroudi F., Elhajouji A., Glatt H., Hastwell P., Hayashi M., Kasper P., Kirchner S., Lynch A., Marzin D., Maurici D., Meunier J.R., Müller L., Nohynek G., Parry J., Parry E., Thybaud V., Tice R., van Benthem J., Vanparys P., White P.** *Mutat. Res.*, 2007, v. 628, № 1, p. 31–55.
17. **Hovhannisyan G.G., Haroutunyan T.S., Arutyunyan R.M.** *Exp. Oncol.*, 2004, v. 26, № 3, p. 240–242.
18. **Arutyunyan R., Rapp A., Greulich K.O., Hovhannisyan G., Haroutiunian S., Gebhart E.** *Exp. Oncol.*, 2005, v. 27, № 1, p. 38–42.
19. **Johnston J.S., Johnson A., Gan Y., Wientjes M.G., Au J.L.** *Pharm. Res.*, 2003, v. 20, № 7, p. 957–961.

20. Waters M.D., Stack H.F., Rabinowitz J.R., Garrett N.E. Mutat. Res., 1988, v. 205, № 1–4, p. 119–138.
21. Ho I.C., Yih L.H., Kao C.Y., Lee T.C. Mutat. Res., 2000, v. 452, № 1, p. 41–50.
22. Vicente M.G., Nurco D.J., Shetty S.J., Osterloh J., Ventre E., Hegde V., Deutsch W.A. J. Photochem. Photobiol. B, 2002, v. 68, № 2–3, p. 123–132.
23. Yow C.M., Mak N.K., Szeto S., Chen J.Y., Lee Y.L., Cheung N.H., Huang D.P., Leung A.W. Toxicol. Lett., 2000, v. 115, № 1, p. 53–61.
24. Rousset N., Keminon E., Eléouet S., Le Néel T., Auget J.L., Vonarx V., Carré J., Lajat Y., Patrice T. J. Photochem. Photobiol. B, 2000, v. 56, № 2–3, p. 118–131.
25. Hovhannisyán G.G., Haroutiunian S., Margaryan K., Ghazaryan R., Aroutiounian R. Korean Journal of Environmental Biology, 2005, v. 23, № 4, p. 379–382.
26. Gasparyan G., Hovhannisyán G., Ghazaryan R., Sahakyan L., Tovmasyan A., Grigoryan R., Sarkissyan N., Haroutiunian S., Aroutiounian R. International Journal of Toxicology, 2007, v. 26, p. 1–6.
27. Thybaud V., Aardema M., Clements J., Dearfield K., Galloway S., Hayashi M., Jacobson-Kram D., Kirkland D., MacGregor J.T., Marzin D., Ohyama W., Schuler M., Suzuki H., Zeiger E. Mutat. Res., 2007, v. 627, № 1, p. 41–58.
28. Kasamatsu T., Kohda K., Kawazoe Y. Mutat. Res., 1996, v. 369, p. 1–6.
29. Arutyunyan R., Hovhannisyán G., Gasparyan G., Dalyan Ye., Margaryan K., Ghazaryan R., Haroutiunian S. International alumni seminar on “Biotechnology and Health”, Yerevan, October 18–21, 2005, p. 21–26.
30. Hovhannisyán G., Gasparyan G., Haroutiunian S., Dalyan Ye., Margaryan K., Aroutiounian R. The Second International Conference “Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution”, dedicated to N.W. Timofeeff-Ressovsky, Yerevan, September 8–11, 2005, p. 66.
31. Арутюнян Р.М., Оганесян Г.Г., Мурадян Р.Е., Маргарян К.С. Ученые записки ЕГУ, 2007, № 1, с. 153–155.

Գ. Գ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԹՈՒՆԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ՍԵԹՈՂՆԵՐԸ ԵՎ
ՀԻՄՆԱԽՆԴԻՐՆԵՐԸ

Ամփոփում

Ներկայացված է կարճ ակնարկ մուտագենության ռազմավարության *in vitro* և *in vivo* տեսաավորման, ինչպես նաև նոր պոտենցիալ հակաքաղցկեղային միացությունների (պորֆիրինի ածանցյալներ) և հակաքաղցկեղային դեղամիջոց ցիսպլատինի գենաթունային հատկությունների ուսումնասիրության արդյունքների մասին, որոնք ստացվել են ԳՆԹ-կոմետ, Comet-FISH մեթոդների ու միկրոկորիզային տեսաի կիրառմամբ: Ներկայացված ուղղությունները շատ կարևոր են Հայաստանում գենետիկական թունաբանության զարգացման համար:

G. G. HOVHANNISYAN

METHODS AND PROBLEMS OF GENETIC TOXICOLOGY

Summary

A brief review of *in vitro* and *in vivo* mutagenicity testing strategy and analysis of genotoxicity of new potential anticancer preparations (porphyrins derivatives) and anticancer preparation cisplatin with the comet assay, Comet-FISH and micronuclei test is presented. The directions presented are highly important for development of genetic toxicology in Armenia.