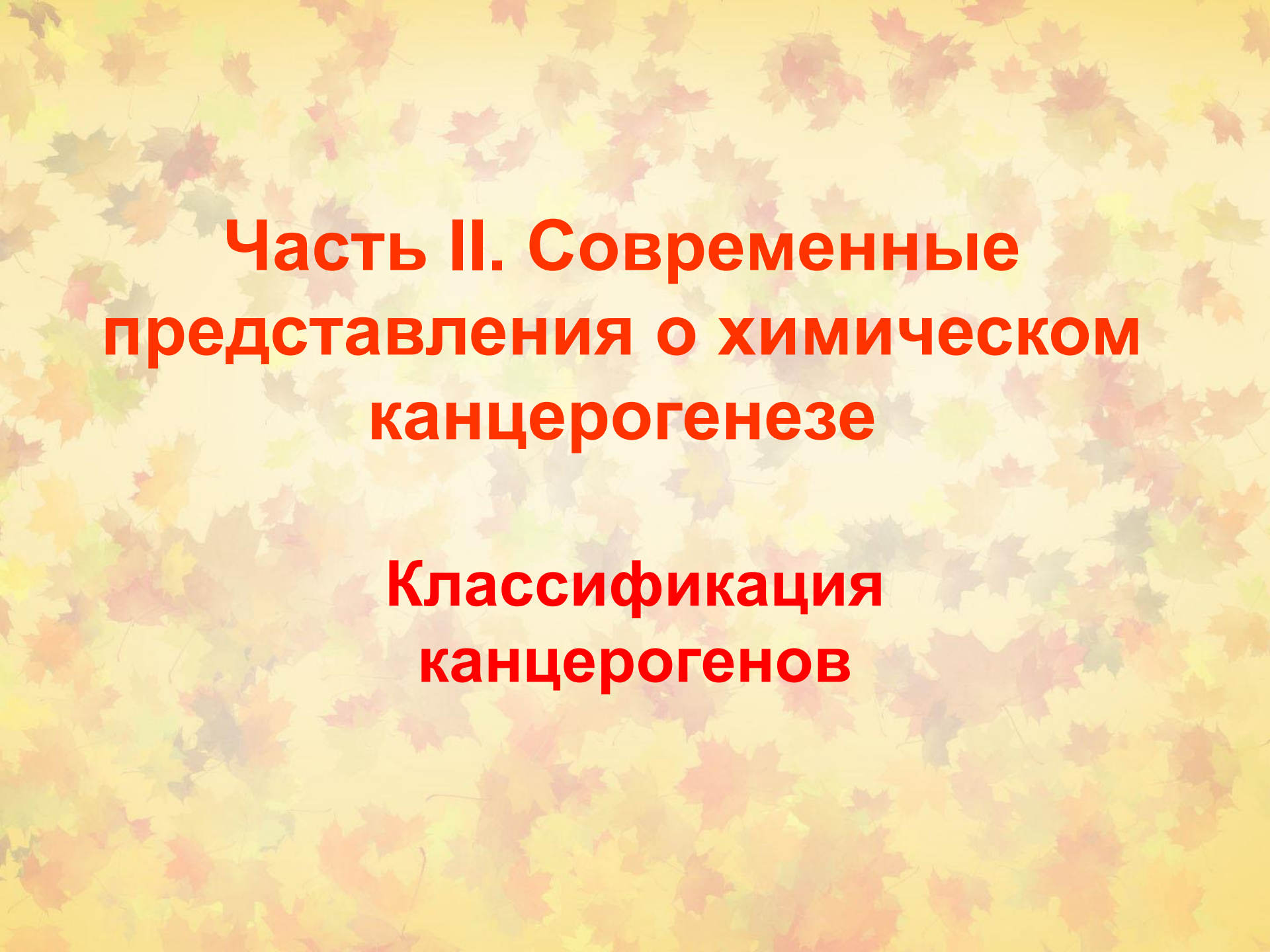




# **Часть II. Современные представления о химическом канцерогенезе**

## **Классификация канцерогенов**

# Основные этапы канцерогенеза





*HAZARD Database*

Chemical Teratogens, Carcinogens, Mutagens

## Conception: Chemical Hazard

### ○ Teratogenesis

- Current List of Teratogens (>1000 annotated chemicals)
- Table of Tested Xenobiotics (~400 annotated chemicals)

|     |                             |
|-----|-----------------------------|
|     | TESTS:                      |
| +/- | Embryotoxicity              |
| +/- | Palatal Cleft               |
| +/- | Neural System Abnormalities |
| +/- | Skeletal Abnormalities      |

### ○ Carcinogenesis

- Current List of Carcinogens (~400 items)
- Table of Known Human Carcinogens (~100 annotated chemicals)

### ○ Mutagenesis

- Current List of Mutagens (~700 items)

# Ранжирование оцененных экспертами МАИР факторов по степени доказательности канцерогенности для человека

| <u>Группа факторов</u>                                         | Количество факторов |
|----------------------------------------------------------------|---------------------|
| 1.Канцерогенные для человека                                   | 75                  |
| 2А.Вероятно канцерогенные для человека                         | 57                  |
| 2В.Возможно канцерогенные для человека                         | 225                 |
| 3.Не классифицируемые в отношении канцерогенности для человека | 480                 |
| 4.Вероятно не канцерогенные для человека                       | 1                   |
| Всего оценено                                                  | 838                 |

# Механистическая классификация химических канцерогенов

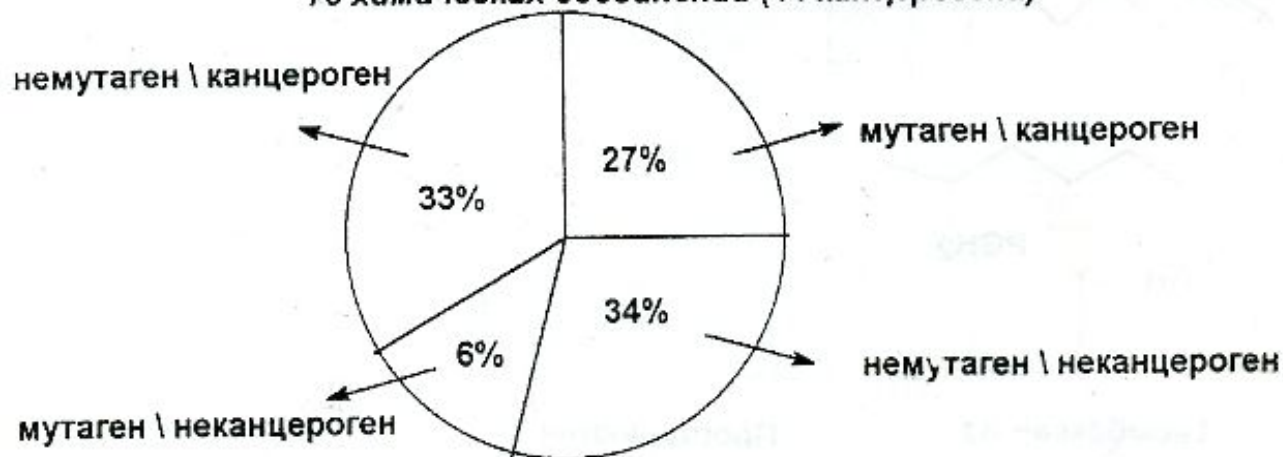
| Тип канцерогена                           | Примеры                     |
|-------------------------------------------|-----------------------------|
| <b><u>ДНК-тропные канцерогены</u></b>     |                             |
| Прямые канцерогены                        | Алкилирующие агенты         |
| Проканцерогены                            | ПАУ, АрА, ГЦА, нитрозоамины |
| Неорганические                            | Соли ряда металлов          |
| <b><u>Эпигенетические канцерогены</u></b> |                             |
| промоторы                                 | Фенобарбитал, сахарин       |
| Цитотоксические агенты: Прямое действия   | Ацетонитрил, d-лимонен      |
| Непрямого действия                        | В-Агонисты                  |
| Гормональные агенты                       | Эстрогены                   |
| Иммунодепрессанты                         | Циклоспорины                |
| Индукторы пероксисом                      | Клофибрат                   |
| <b><u>Не классифицированные</u></b>       |                             |
| Смешанная группа                          | Метапирелен, диоксан        |
| Неорганические                            | Соли ряда металлов          |

# Характеристика химических канцерогенов

## *Химические канцерогены*

1. Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ)
2. Ароматические и гетероциклические амины
3. Азокрасители
4. Нитрозосоединения
5. Микотоксины
6. Алкилирующие агенты

*Соотношение между мутагенностью и канцерогенностью  
73 химических соединений (44 канцерогена)*



## Природные и промышленные канцерогены

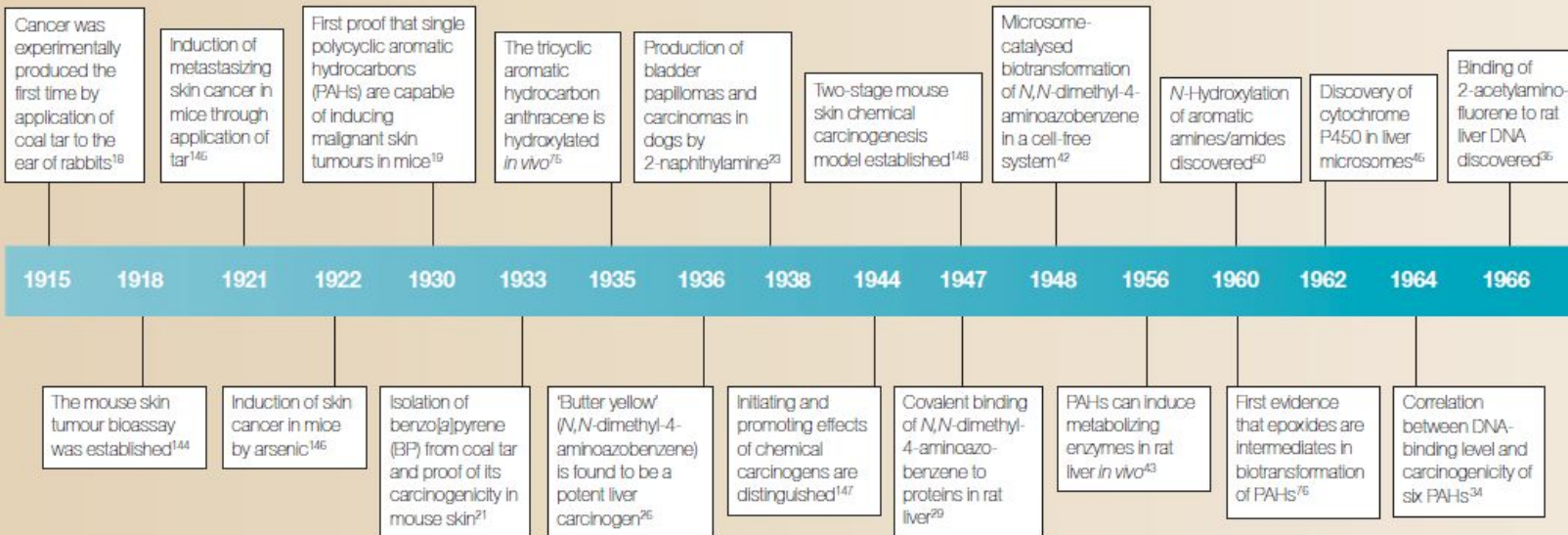
|                                                           |                                                                 |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 1. 4-Аминобифенил                                         | Мочевой пузырь                                                  |
| 2. Асбест                                                 | Легкие, плевра, брюшина, желудочно-кишечный тракт, гортань      |
| 3. Афлатоксины                                            | Печень, легкие                                                  |
| 4. Бензидин                                               | Мочевой пузырь                                                  |
| 5. Бензол                                                 | Кровотворная система                                            |
| 6. Берилий и его соединения                               | Легкие, ЦНС                                                     |
| 7. Бисхлорметиловый эфир и технический хлорметиловый эфир | Легкие                                                          |
| 8. Винилхлорид                                            | Печень, кровеносные сосуды, мозг, легкие, лимфатическая система |
| 9. Горчичный газ (сернистый иприт)                        | Глотка, гортань, легкие                                         |
| 10. Кадмий и его соединения                               | Легкие, предстательная железа                                   |
| 11. Каменноугольные пеки                                  | Кожа, легкие, мочевой пузырь, гортань, полость рта              |
| 12. Каменноугольные смолы                                 | Кожа, легкие, мочевой пузырь                                    |
| 13. Минеральные смазочные масла                           | Кожа, легкие, мочевой пузырь, желудочно-кишечный тракт          |
| 14. Мышьяк и его соединения                               | Легкие, кожа                                                    |
| 15. 2-Нафтиламин                                          | Мочевой пузырь, легкие                                          |
| 16. Никель и его соединения                               | Полость носа, легкие                                            |
| 17. Радон и продукты его распада                          | Легкие                                                          |
| 18. Сажи                                                  | Кожа, легкие                                                    |
| 19. Сланцевые масла                                       | Кожа, желудочно-кишечный тракт                                  |
| 20. Тальк, содержащий асбестовые волокна                  | Легкие                                                          |
| 21. Хром шестивалентный и его соединения                  | Легкие, полость носа                                            |
| 22. Эрионит                                               | Плевра, брюшина                                                 |
| 23. Этилен-оксид                                          | Кровотворная и лимфатическая системы                            |

## Канцерогенные лекарственные препараты

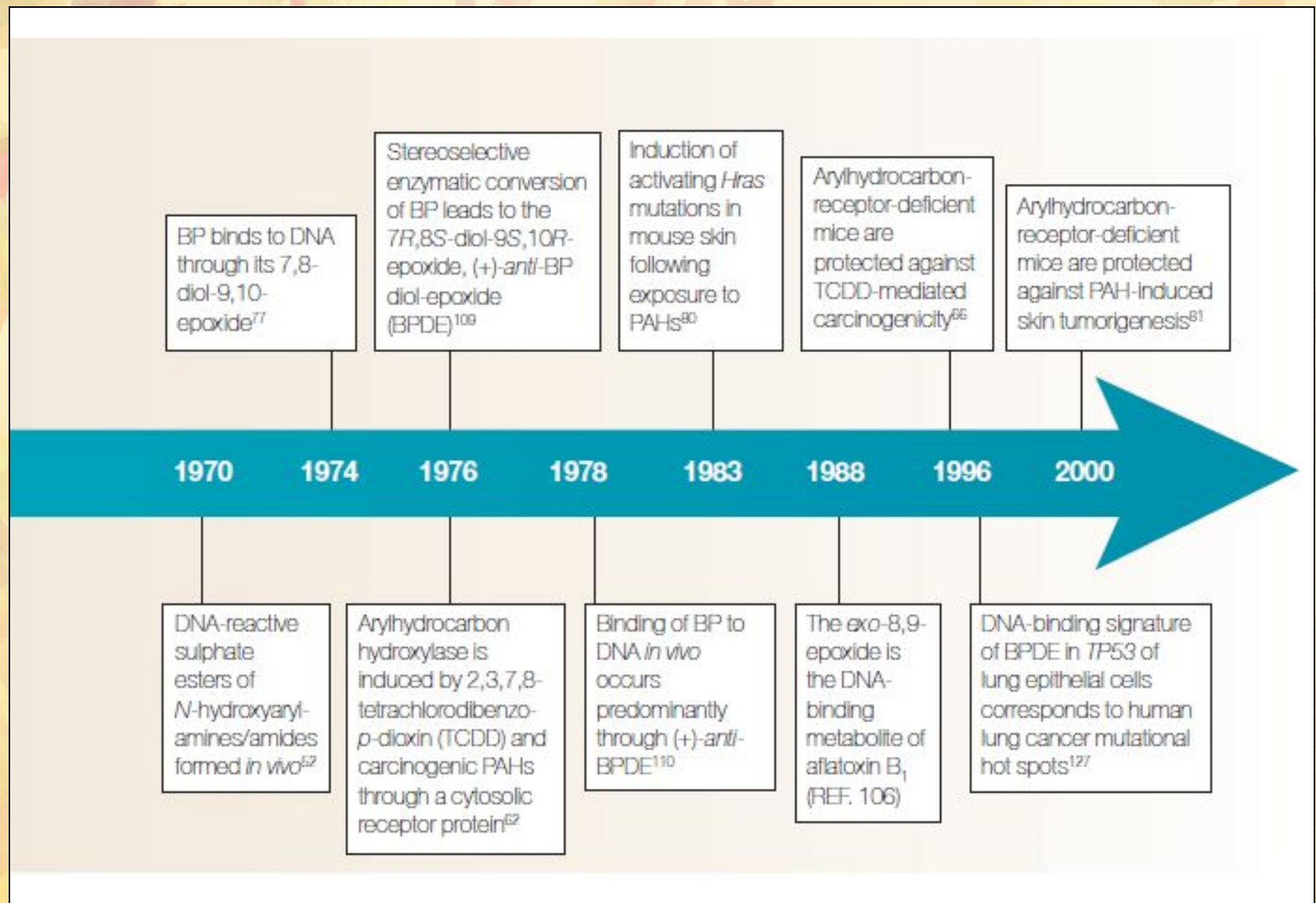
|                                                                                                  |                                                                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 24. Азатиоприн                                                                                   | Лимфатическая система, мезенхима, кожа, гепатобиллиарная система |
| 25. Анальгетические смеси, содержащие фенацетин                                                  | Мочевой пузырь, почки                                            |
| 26. 1,4-Бутандиол диметансульфонат (Милеран)                                                     | Кроветворная система                                             |
| 27. Диэтилстильбестрол                                                                           | Шейка матки, влагалище, яички, молочная железа, матка            |
| 28. Контрацептивы (пероральные, применяемые циклически)                                          | Матка                                                            |
| 29. Контрацептивы (пероральные, комбинированные)                                                 | Печень                                                           |
| 30. Заместительная эстрогенотерапия                                                              | Матка, молочная железа                                           |
| 31. Мелфалан                                                                                     | Кроветворная система                                             |
| 32. 8-Метоксипсорален (Метоксален) в сочетании с УФ-облучением                                   | Кожа                                                             |
| 33. MOPP (комбинированная терапия азотистым ипритом, винкристином, прокарбазином, преднизолоном) | Кроветворная система                                             |
| 34. Нестероидные эстрогены                                                                       | Шейка матки, влагалище, яички, молочная железа, матка            |
| 35. Стероидные эстрогены                                                                         | Матка, молочная железа                                           |
| 36. Тамоксифен                                                                                   | Матка                                                            |
| 37. ТиоТЭФ                                                                                       | Кроветворная система                                             |
| 38. Треосульфат                                                                                  | Кроветворная система                                             |
| 39. Хлорамбуцил                                                                                  | Кроветворная система                                             |
| 40. N,N-Бис(2-хлорэтил)-2-нафтиламин (хлорнафазин)                                               | Мочевой пузырь                                                   |

# История развития ХК

## Timeline | Advances in 'chemical carcinogenesis' in the twentieth century



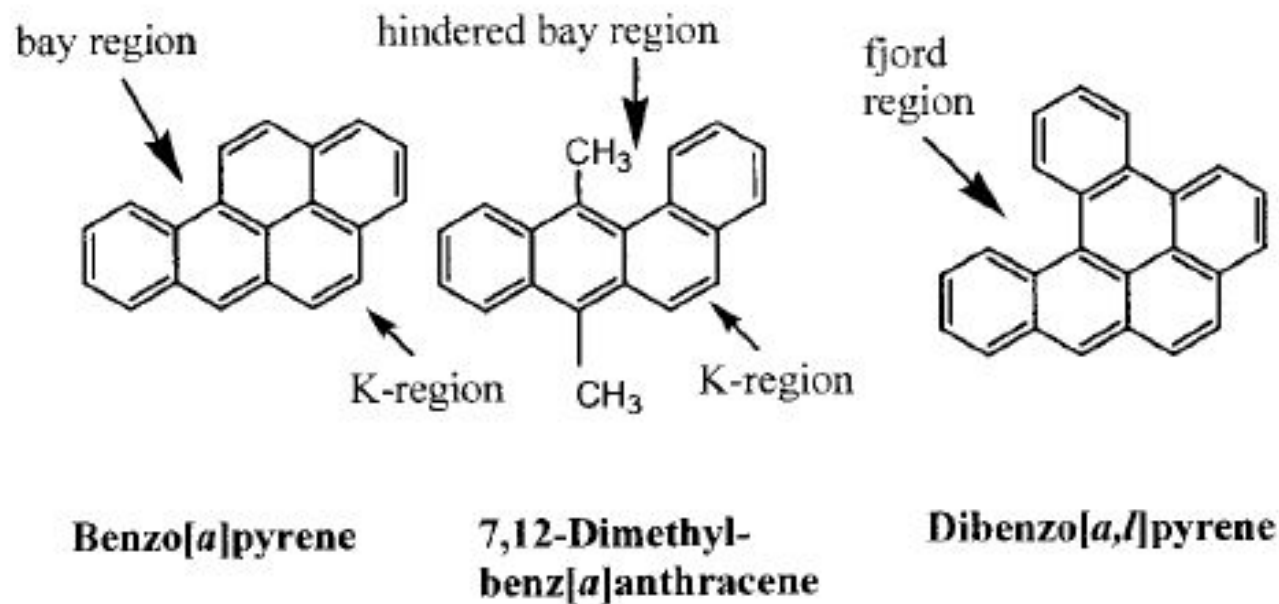
# История развития ХК



# 1. ПАУ

- Ежедневно на поверхность Земли выседают около 170 т метеоритной пыли, в составе которой обнаруживаются полициклические ароматические углеводороды (ПАУ).
- На планете в настоящее время действует около 520 вулканов, их ежегодный выброс составляет 3-6 млрд. т химических веществ (аэрозоли, пепел, лава, газы). С пеплом в атмосферу может поступить до 12-24 т только одного бенз(а)пирена, не считая других ПАУ.

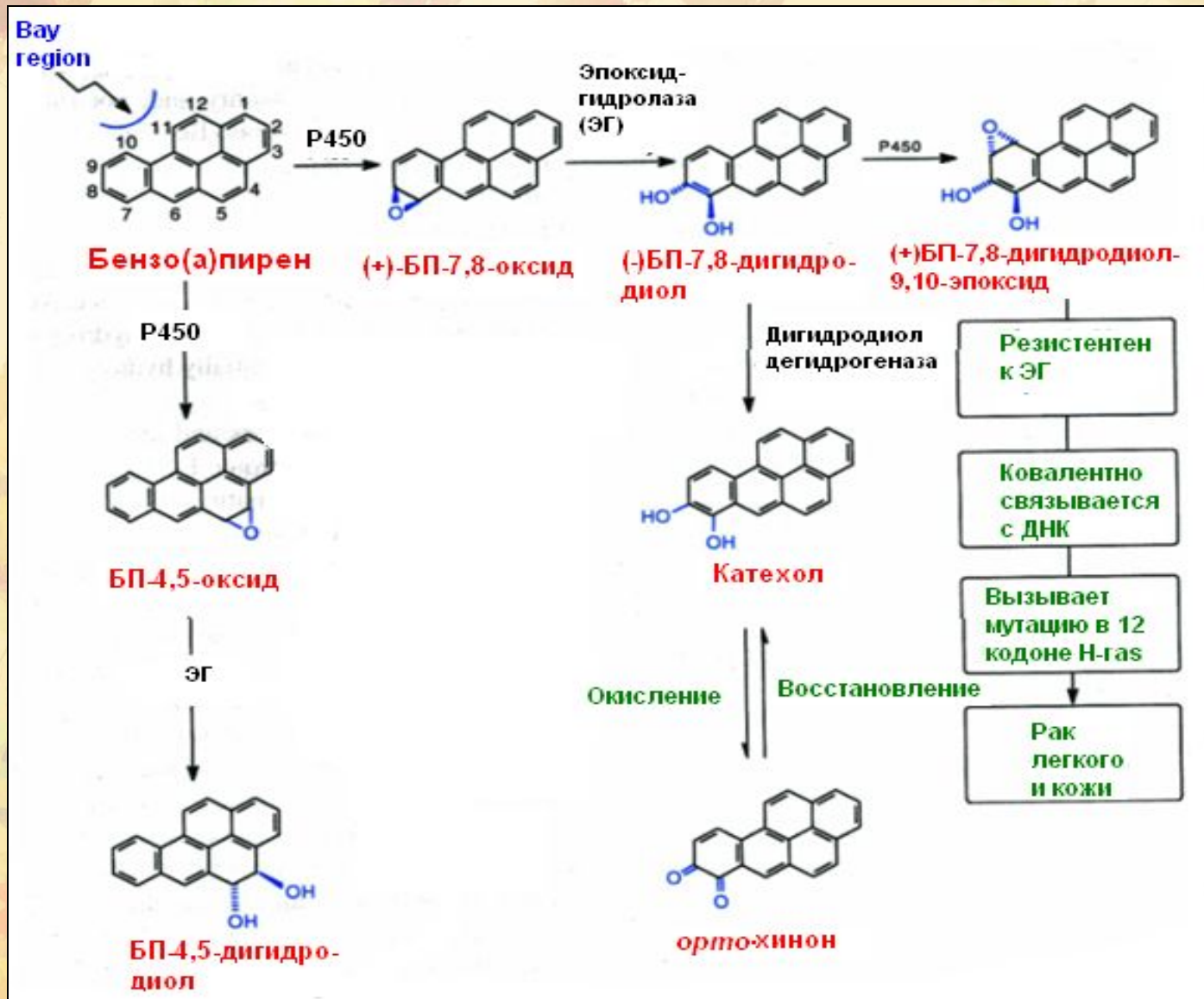
# Канцерогенность ПАУ



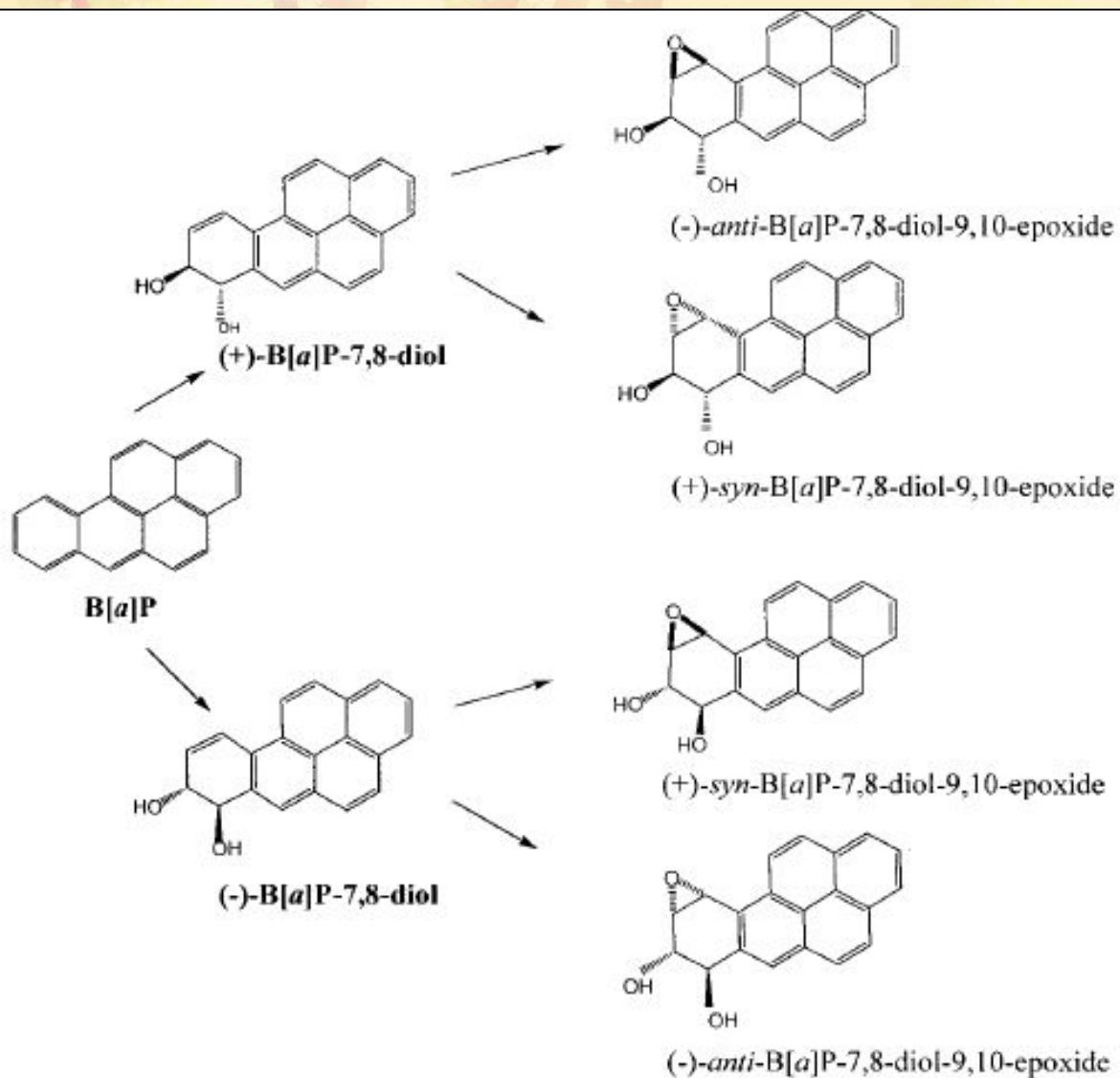
**Fig. 1.** Structural features of PAHs that contribute to carcinogenicity. B[a]P, a known carcinogen, contains a bay region. The diol epoxide metabolite of B[a]P, which binds to DNA, contains an epoxide group next to the bay region. Methyl groups in DMBA hinder this structural feature further, as does the extra benzene ring in DB[a,l]P. The compounds are arranged in order of their increasing carcinogenic potency, with DB[a,l]P being the most potent. Adapted from Baird and Ralston [1997].

# Метаболизм БП

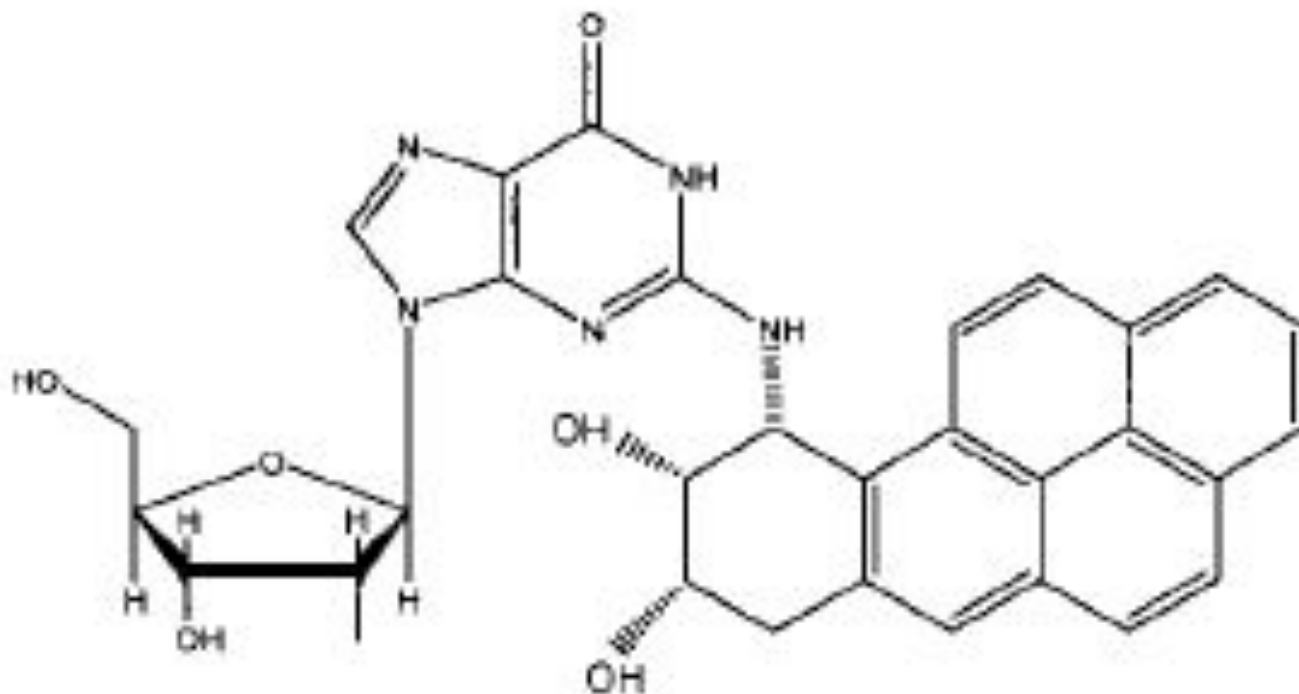
## Образование эпоксидов



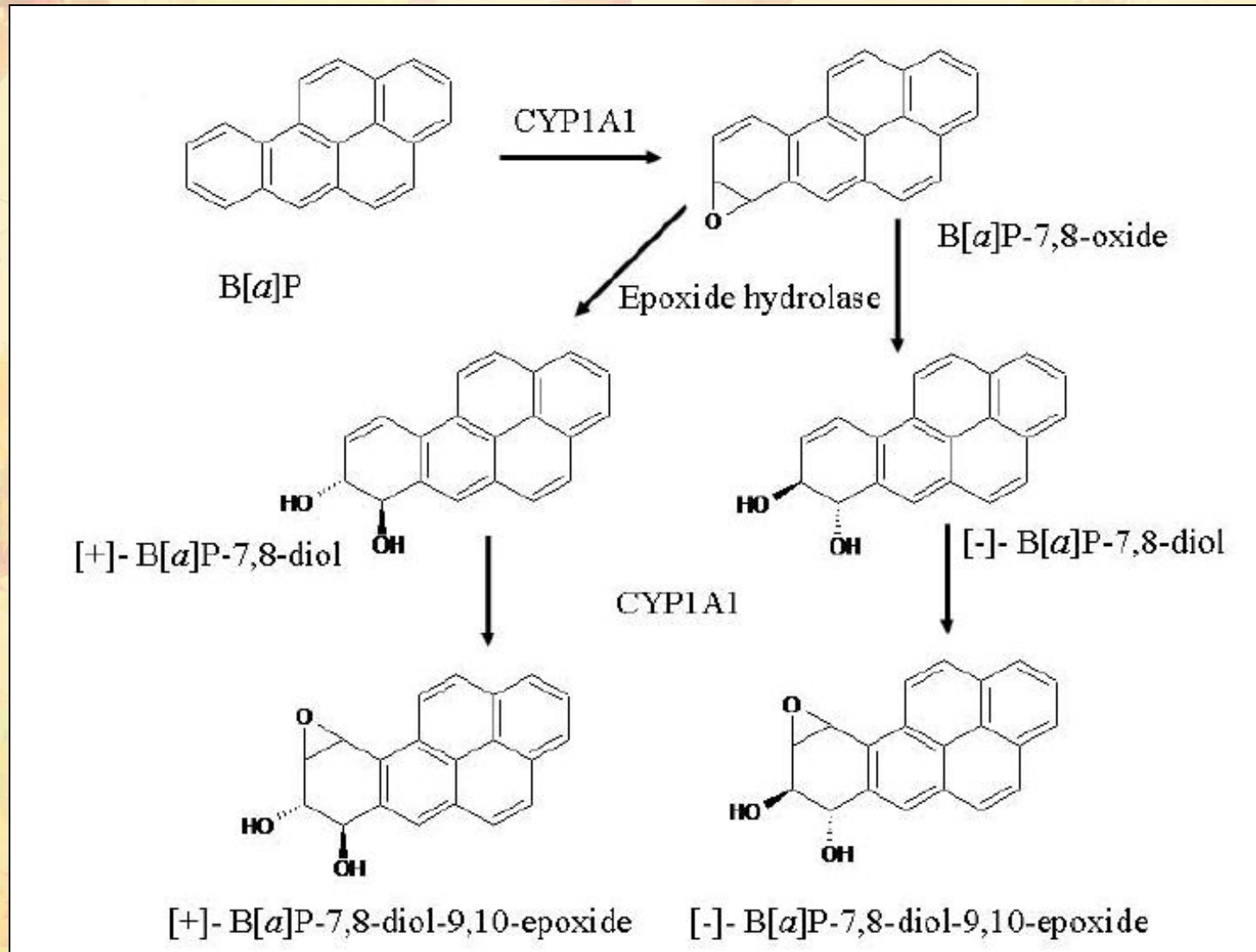
# Изомеры BPDE



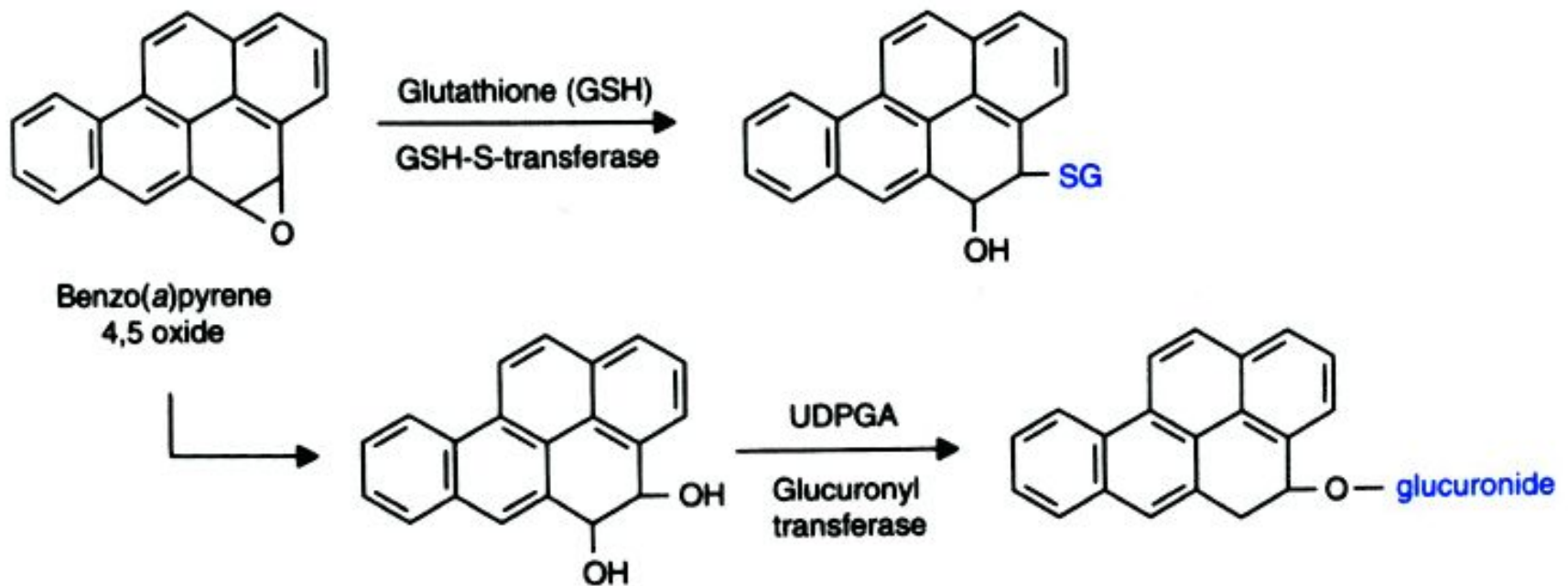
**(+)-anti-B[a]P-7R,8S-diol-9-S,эпоксид10R -  
наиболее канцерогенный метаболит**



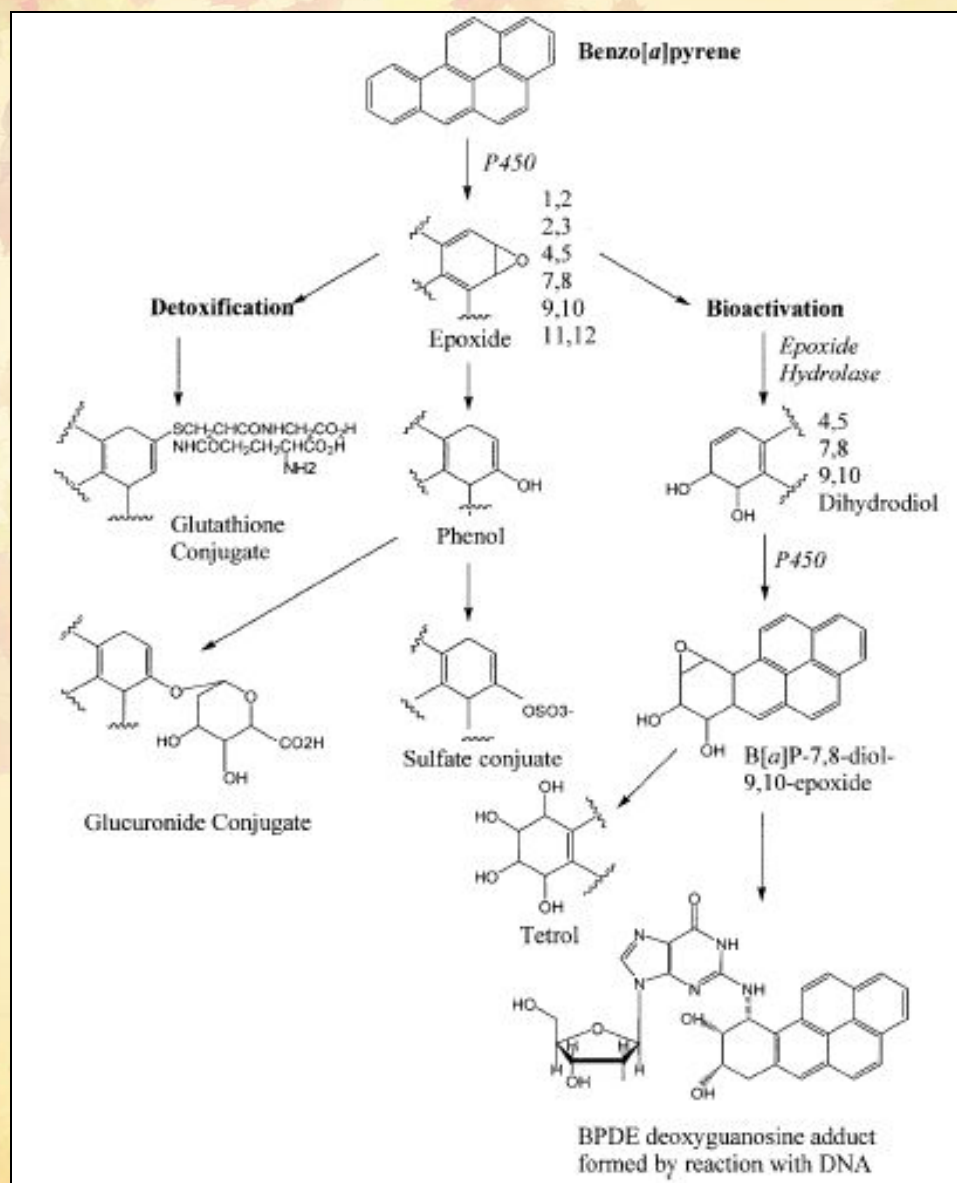
# Роль CYP1A1 в активации БП



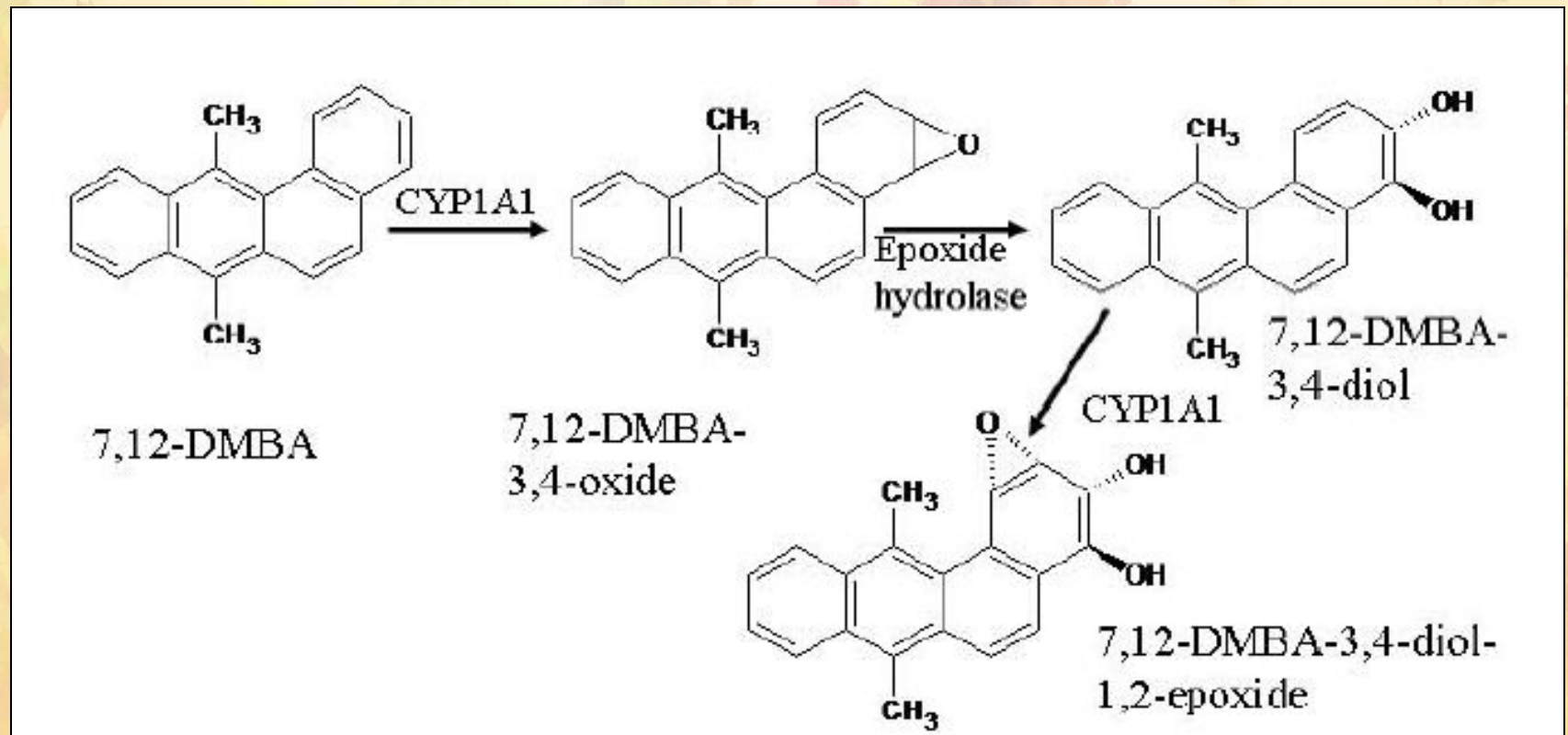
# Детоксикация БП



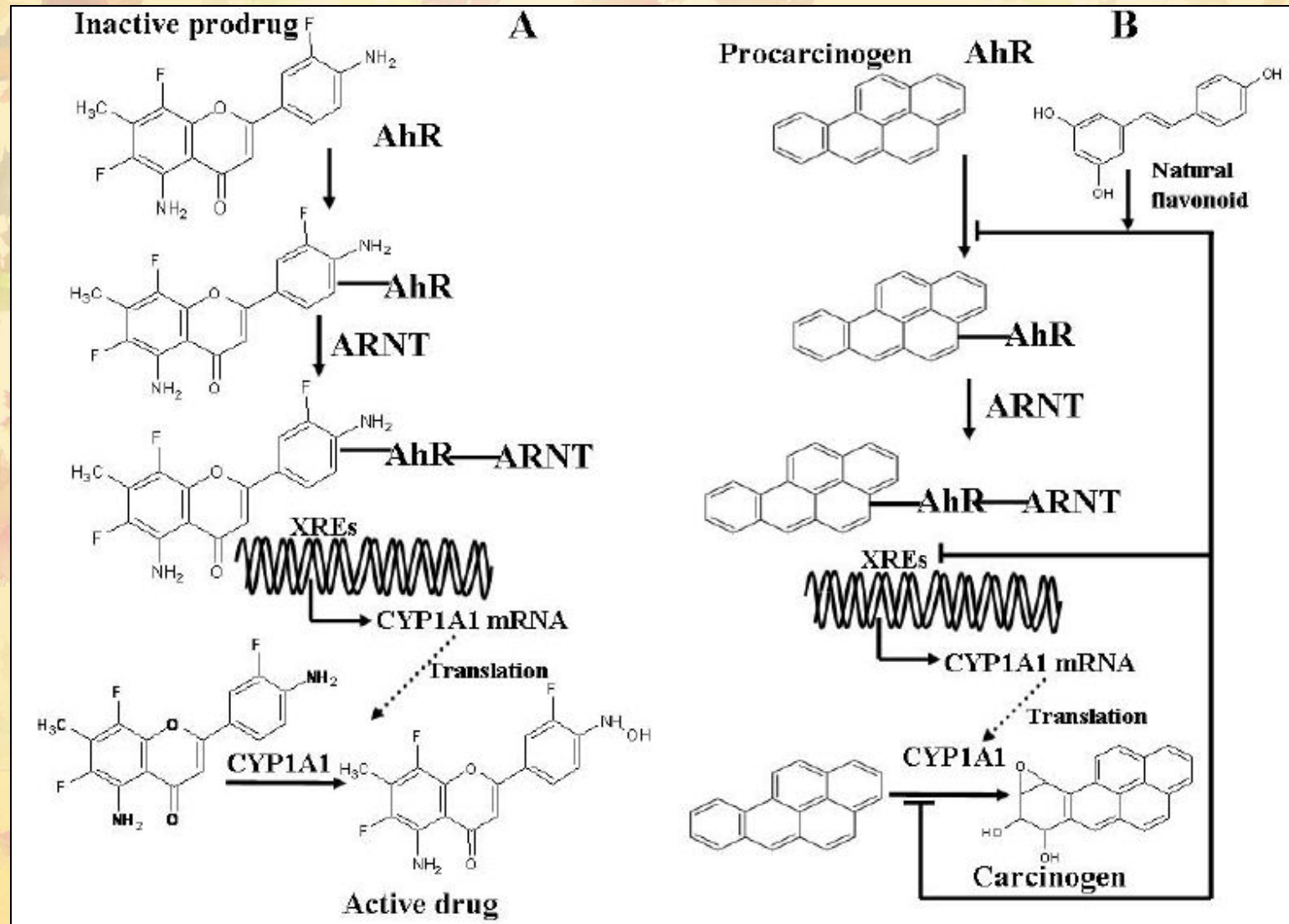
# Пути метаболизма БП



# Роль CYP1A1 в активации ДМБА



# CYP1A1 в профилактике рака

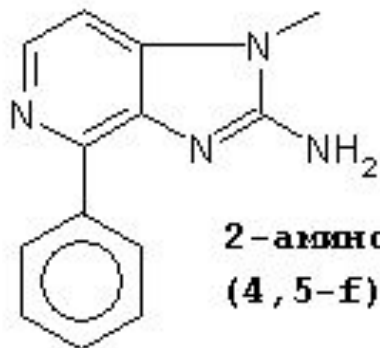
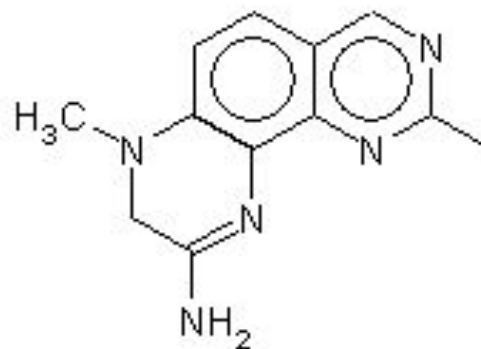


## 2. Гетероциклические амины. Структуры некоторых пирролизатов аминокислот

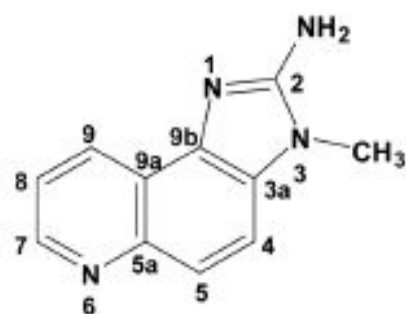


**2-амино-3-метил имидазо (4,5-f) хинолин (IQ)**

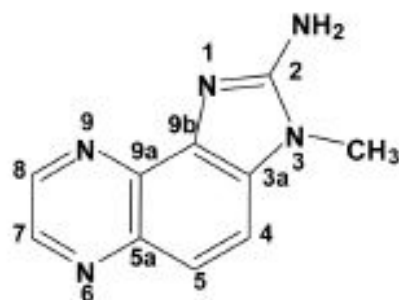
**2-амино-3,8-диметил имидазо  
(4,5-f)хиноксалин (MeIQ)**



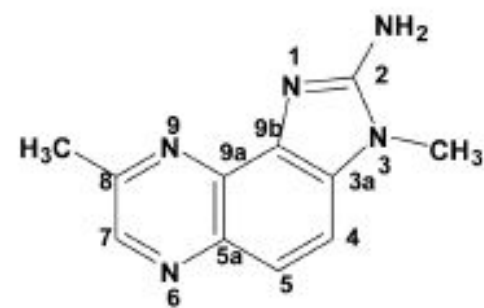
**2-амино-1-метил-6-фенил имидазо  
(4,5-f)пиридин (PhIP)**



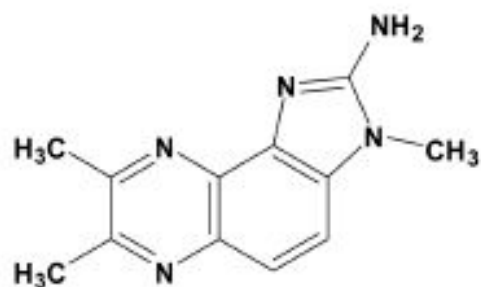
**IQ**



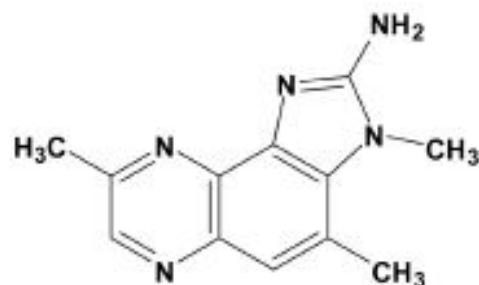
**IQx**



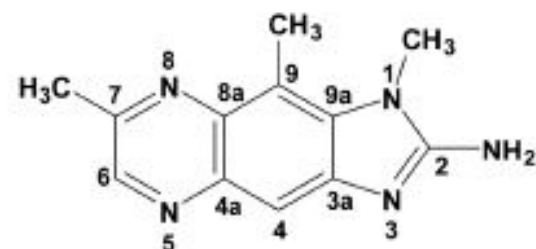
**8-MelIQx**



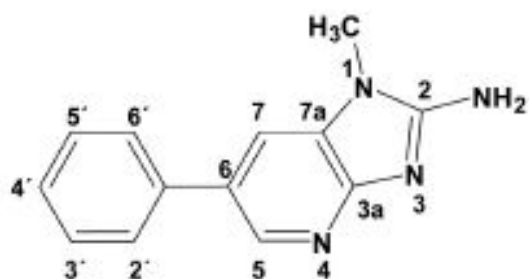
**7,8-DiMelIQx**



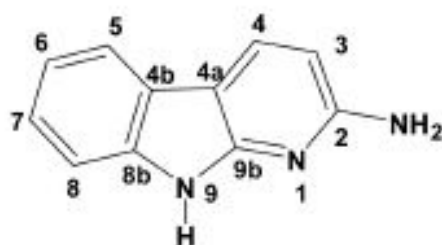
**4,8-DiMelIQx**



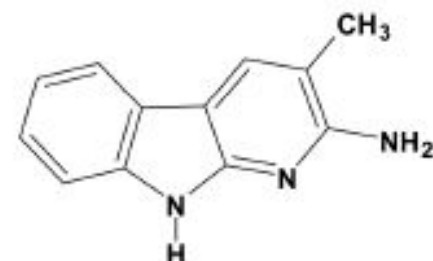
**7,9-DiMelgQx**



**PhIP**



**2-AαC**



**MeAαC**

# Факторы, способствующие образованию ГЦА



**Температура**



**Время**

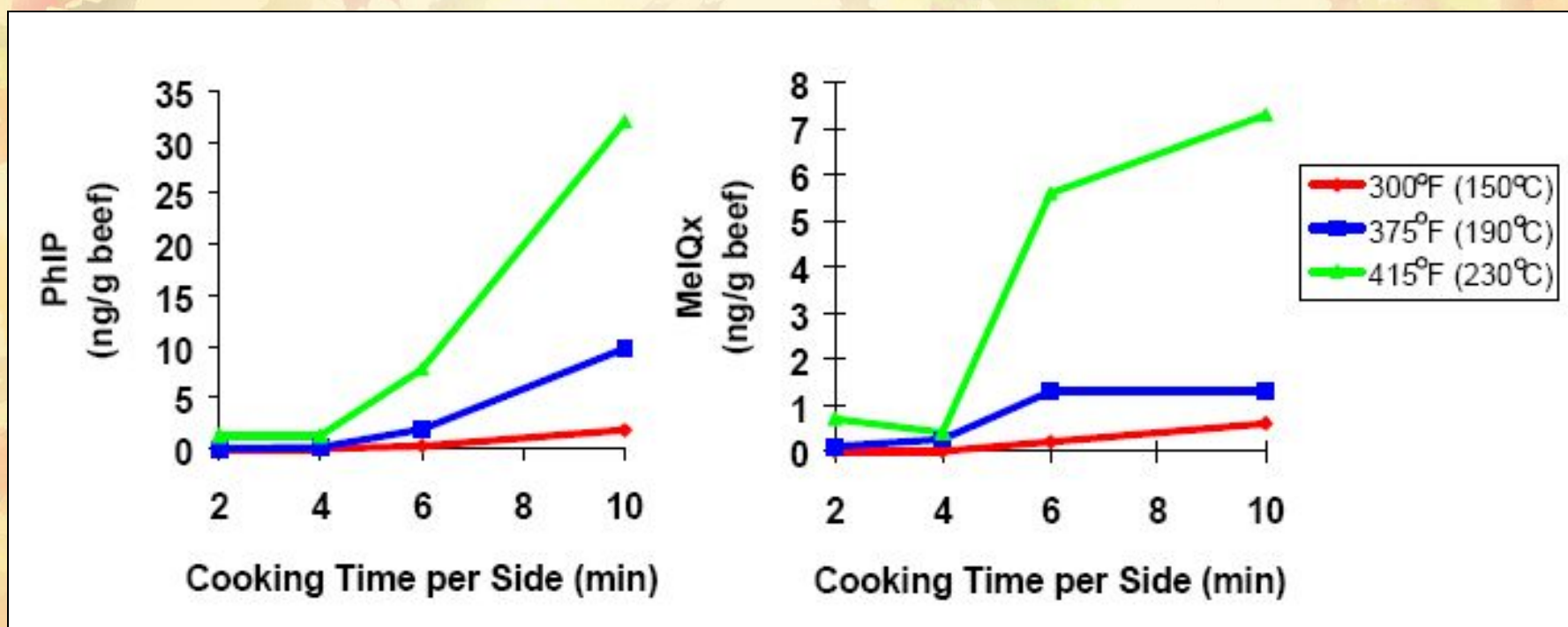


**Контакт с источником огня**



**Состав пищи**

# Условия для образования ГцА



# Содержание гетероциклических аминов в пище (нг/г)

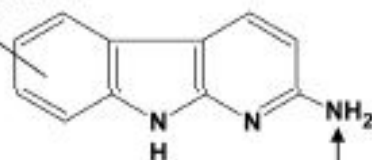
| Образец               | IQ   | MeIQX | 4,8DemeiQx | Trp-p-1 | Trp-p-2 |
|-----------------------|------|-------|------------|---------|---------|
| Жареная говядина      | 0,19 | 2,11  |            | 0,21    | 0,25    |
| Пережаренная говядина | 0,70 | 0,61  | 0,12       | 0,19    | 0,21    |
| Жареный цыпленок      |      | 2,33  | 0,81       | 0,12    | 0,18    |
| Жареная баранина      |      | 1,0   | 0,67       |         | 0,15    |

|                                                                      | PhIP (ng/g product) | MelQx (ng/g product) |
|----------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------|
| Hamburgers, pan-fried ("home-cooked")                                | 0-32                | 0-10                 |
| Beef steak, broiled/grilled/fried                                    | 0.6-48.5            | 0.5-8.3              |
| Chicken breasts, pan-fried                                           | 12-70               | 0                    |
| Chicken breasts, grilled (barbecued)                                 | 27-480              | 0-9                  |
| Fish, broiled/grilled                                                | 2-73                | 0-5                  |
| Fish, pan-fried                                                      | 1.7-69              | 1.4-6                |
| Fast food hamburgers (fried or charbroiled)                          | 0.1-0.6             | 0-0.3                |
| Fast food chicken (chicken breast sandwiches and deep-fried chicken) | 0                   | 0                    |
| Fast food breakfast sausages                                         | 0                   | 0-0.3                |
| Fast food fish (sandwiches)                                          | 0                   | 0                    |

# Пути метаболизма ГцА

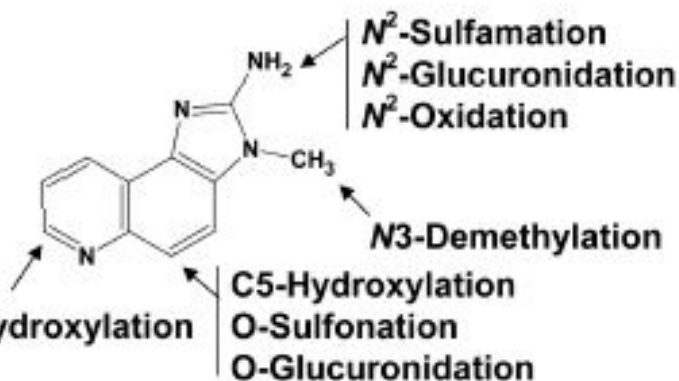
Ring-Hydroxylation  
O-Sulfonation

**2-AαC**

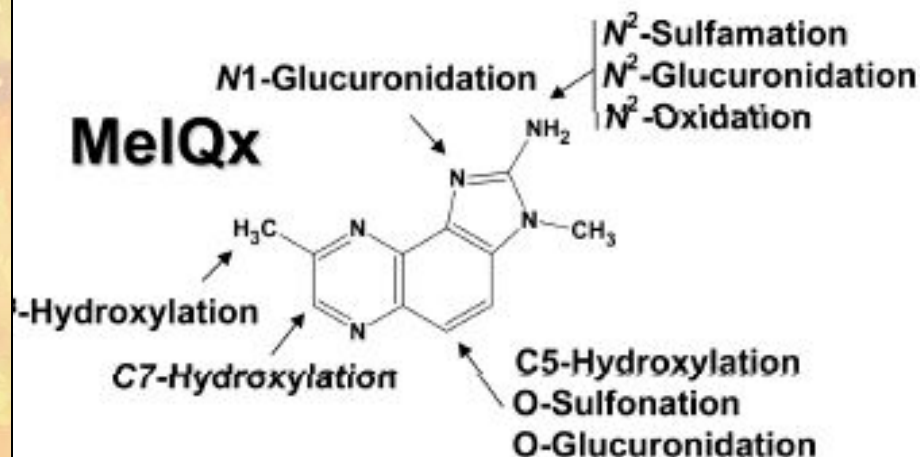


N<sup>2</sup>-Acetylation  
N<sup>2</sup>-Oxidation

**IQ**

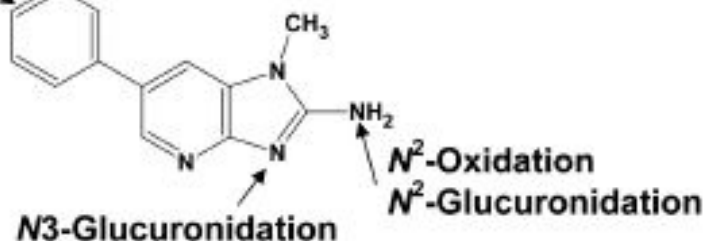


**MelQx**

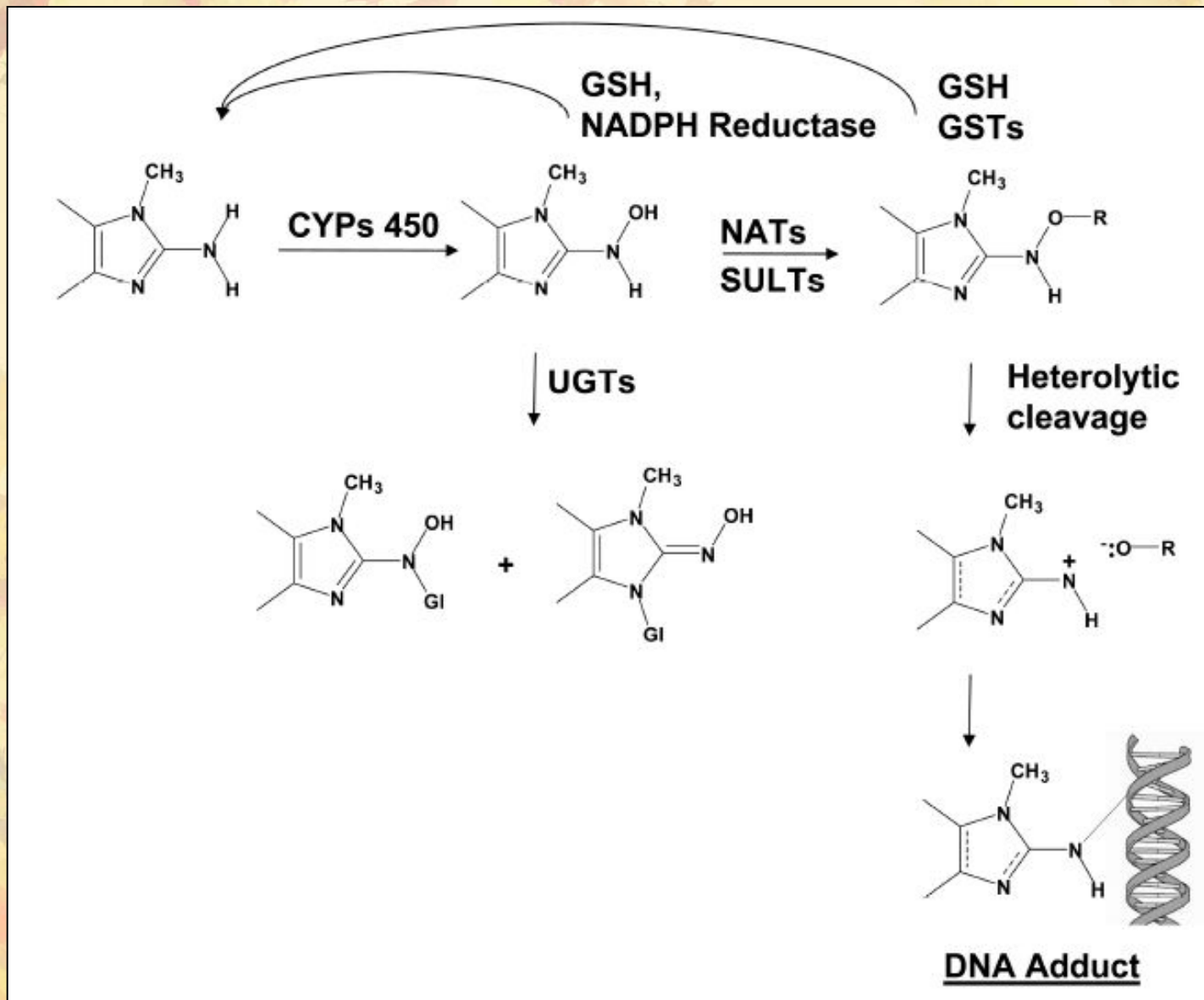


C<sup>4'</sup>-Hydroxylation  
O-Sulfonation  
O-Glucuronidation

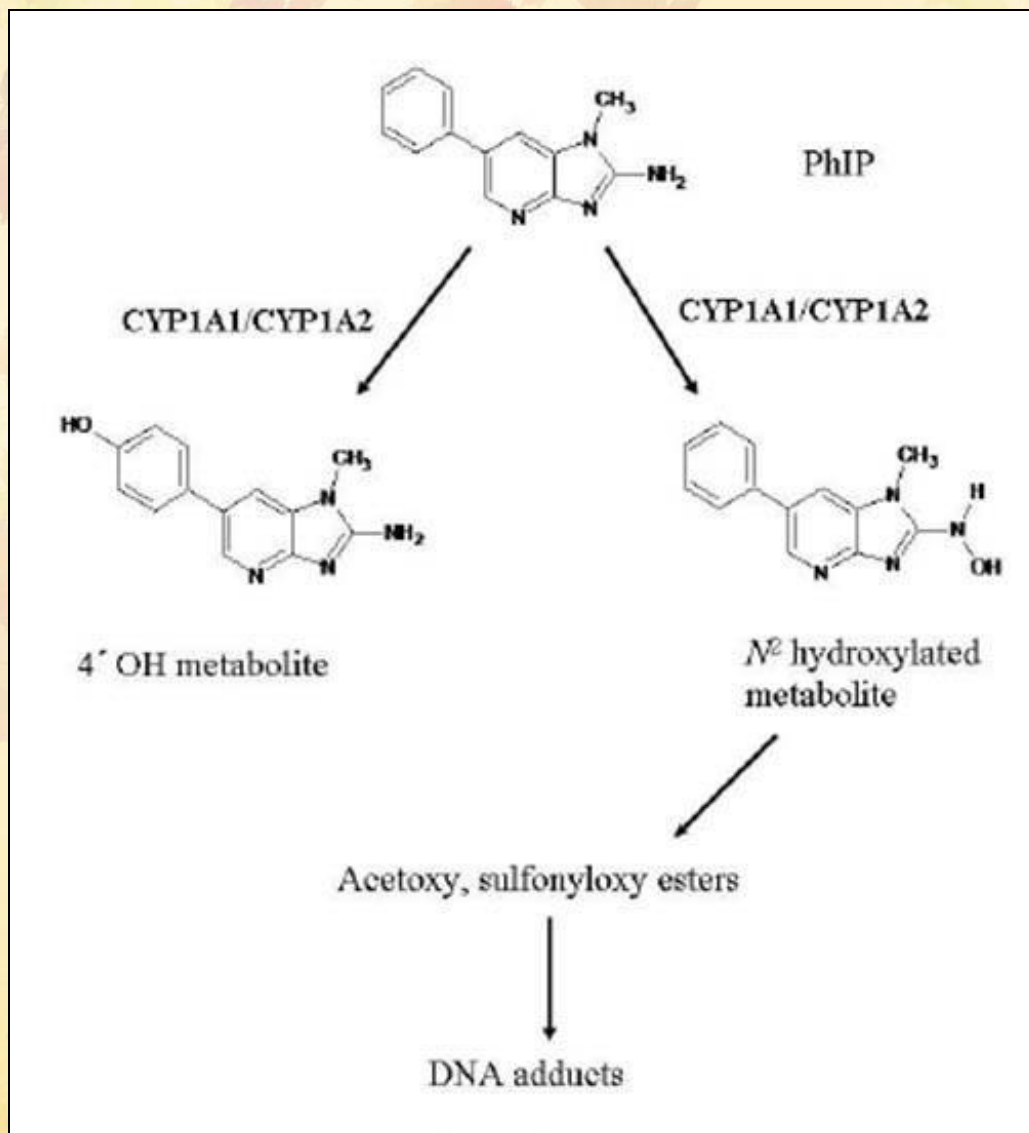
**PhIP**



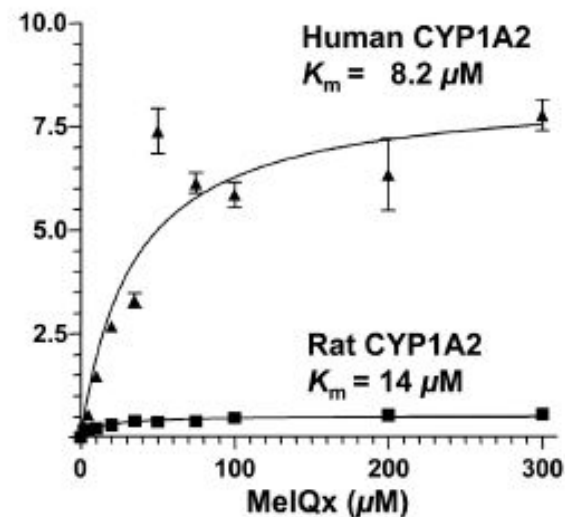
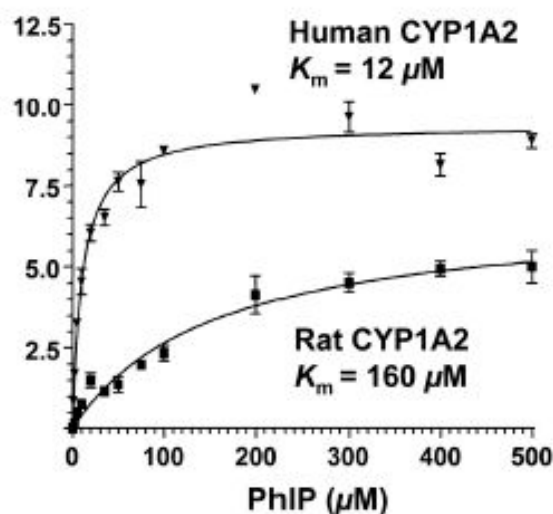
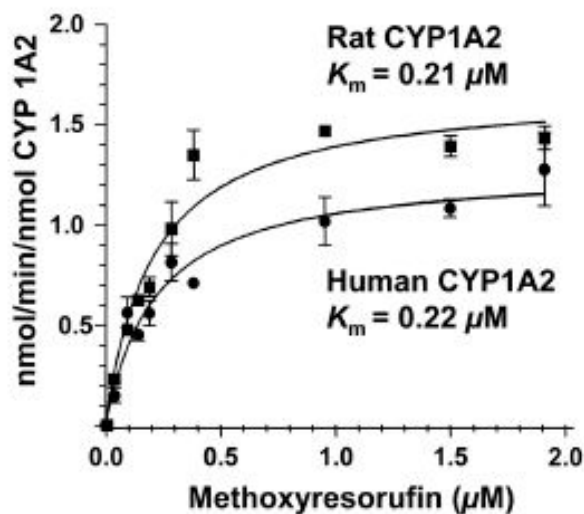
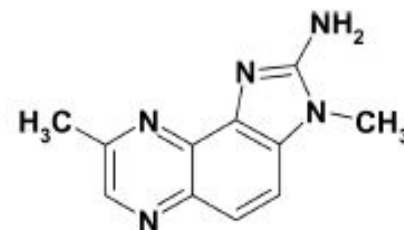
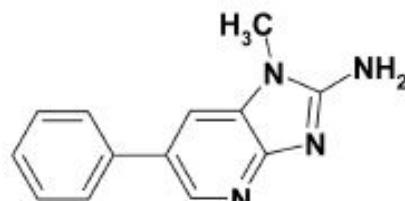
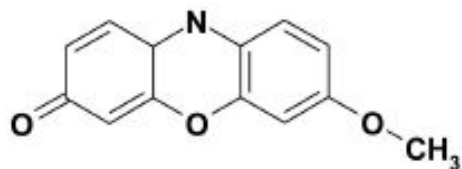
# Судьба метаболитов ГцА



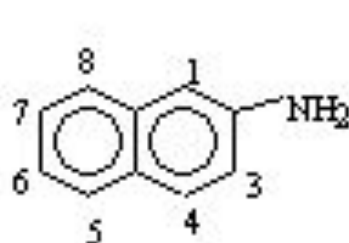
# Роль CYP1A1/2 в метаболизме ГцА



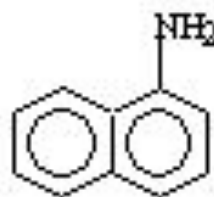
# Кинетические параметры реакций, катализируемых CYP1A2



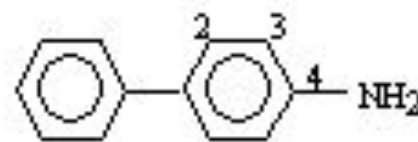
### 3. Дициклические и полициклические ариламины - канцерогены



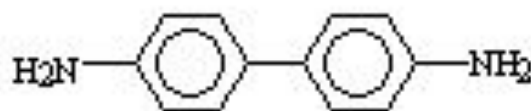
2-нафтиламин



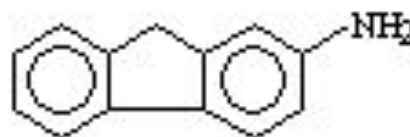
1-нафтиламин



4-аминобифенил



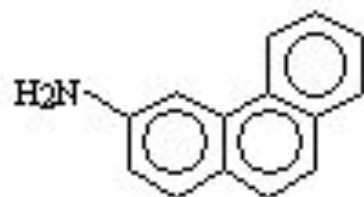
бензидин



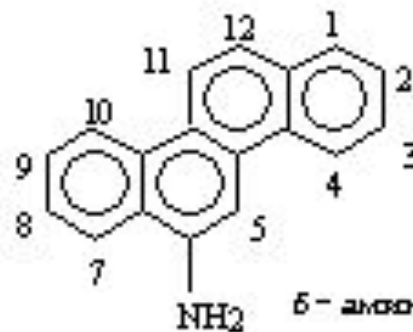
2-аминофлуорен



2-антрамин

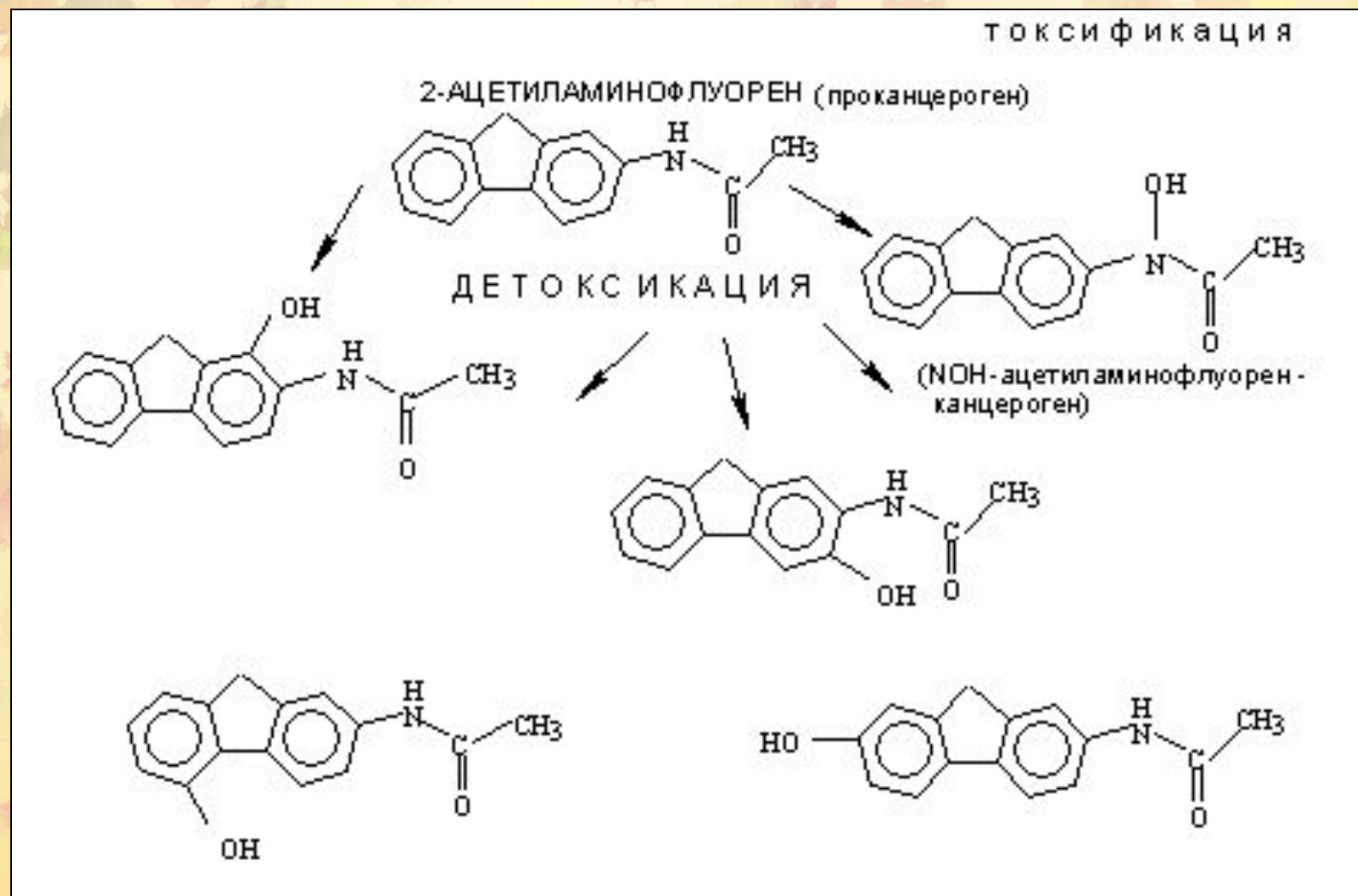


2-фенантриламин



5-аминокризен

# Метаболизм 2-ацетиламинофлуорена



# 4. Азо- и диазокрасители

Азокраситель - широкий термин, применяющийся к классу красителей, в молекулах которых содержатся азогруппы ( $-N=N-$ ). Класс этих соединений может быть разделен на подклассы моноазо-, диазо- и триазо- и т.д. красителей в соответствии с количеством азогрупп в молекуле. С точки зрения вредного воздействия на организм человека важно учитывать, что используемые в промышленности красители имеют от 20 и больше процентов примесей.

## *Производство*

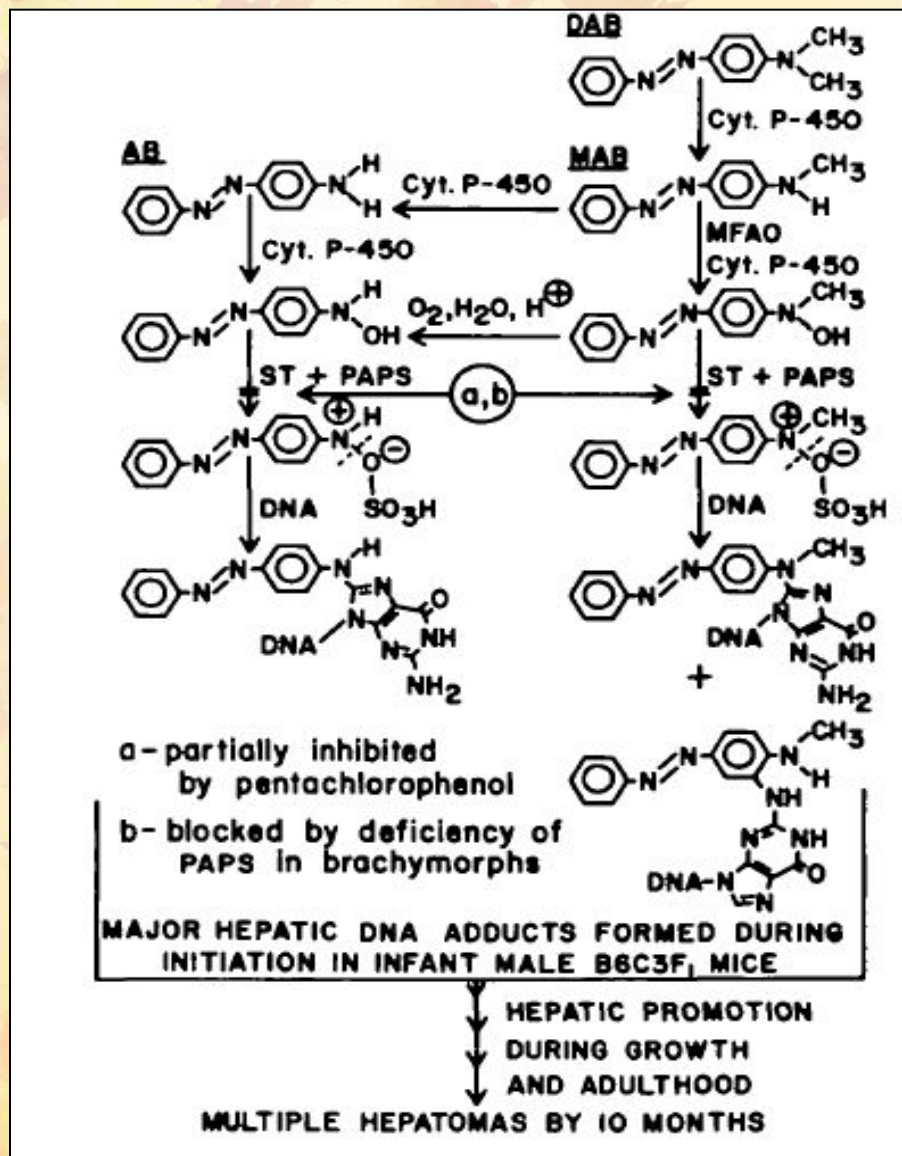
Азокрасители синтезируются диазотированием или тетразотированием ароматического моноаминa или ароматического диамина с нитритом натрия в среде  $HCl$ , с последующим соединением с промежуточными звеньями красителей, такими как различные ароматические или гетероциклические соединения. Если в продукте реакции соединения содержится аминогруппа, то тогда становится возможным получение длинноцепочного полиазокрасителя путем повторяющегося диазотирования и соединения. Общие формулы для первых трех членов группы:

$R-N=N-R'$  Моноазокраситель

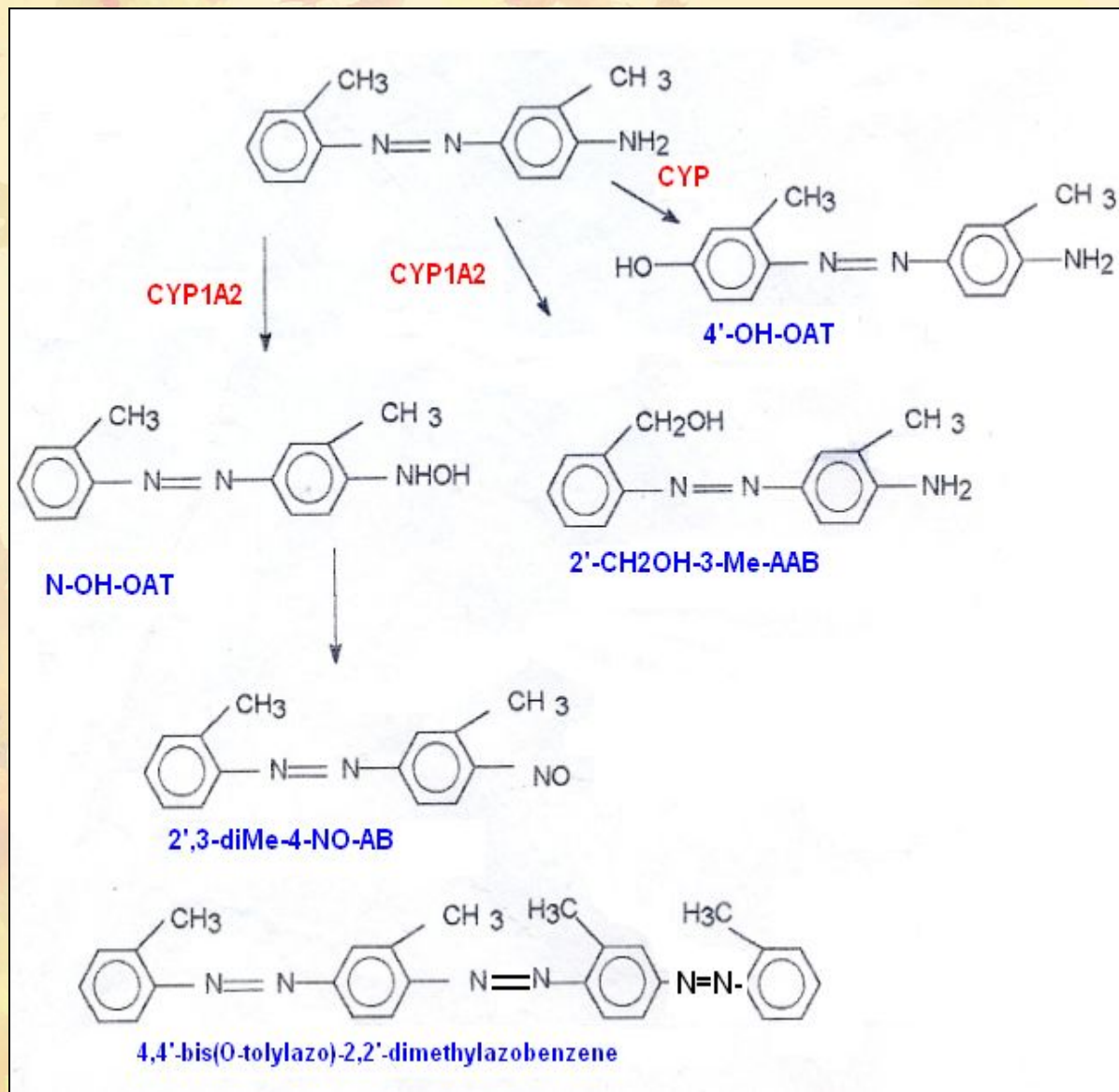
$R-N=N-R'-N=N-R''$  Диазокраситель

$R-N=N-R'-N=N-R''-N=N-R'''$  Триазокраситель

# Аминоазобензолы. Пути активации

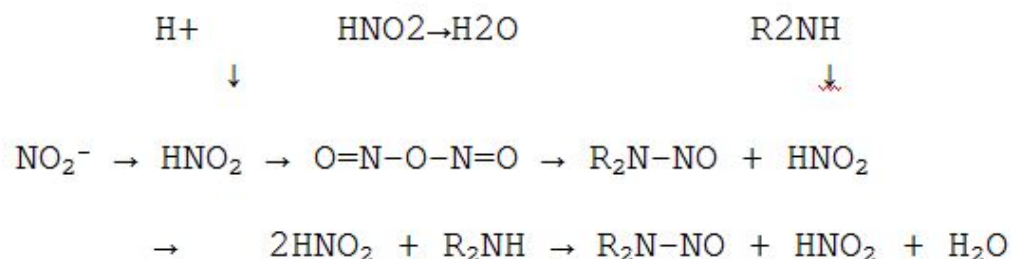


# Метаболизм ОАТ



# 5. Нитрозоамины

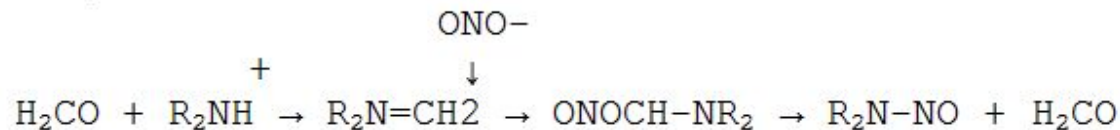
Нитрозоамины быстро формируются из вторичных аминов и азотистой кислоты, а соответствующие N-нитрозосоединения – из первичных аминов. Донором нитрогруппы является ангидрид азотистой кислоты. Поэтому скорость прямой реакции пропорциональна квадрату концентрации азотистой кислоты. Скорость реакции зависит от концентрации вторичных аминов, квадрата концентрации азотистой группы и константы, связанной с  $pH$ . Скорость реакции увеличивается в кислых условиях (после превращения нитрита в азотистую кислоту), но амины активны в депротонированной форме, которая преобладает при высоких  $pH$ . В результате для многих аминов оптимальным является  $pH$  2-4, близкий к  $pH$  желудка. Амины различаются по их способности превращаться в нитрозоамины в основном в зависимости от величины  $pKa$



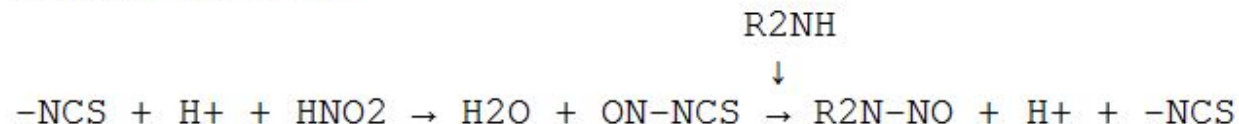
Скорость образования =  $k[R_2NH][HNO_2]^2 = k'[amine][nitrite]^2$ , где  $k' = f(pH)$

# Образование нитрозаминов

Образование нитрозаминов в условиях нейтральной pH катализируется формальдегидом, который широко представлен в окружающей человека среде. Повышение оптимума pH возможно благодаря образованию Шиффова основания с депротонированными аминами. Важно отметить, что скорость реакции пропорциональна первой степени концентрации нитрита. Это обозначает, что формальдегид способен значительно ускорить реакцию, когда концентрация нитрита низкая.

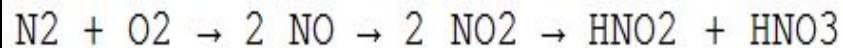


Реакция образования нитрозаминов катализируется также тиоцианатом, который также широко представлен в окружающей среде. Например, в слюне курильщика это соединение может достигать 6мМ концентрации. Оптимум pH также кислый, но скорость реакции пропорциональна концентрации азотистой кислоты в первой степени.



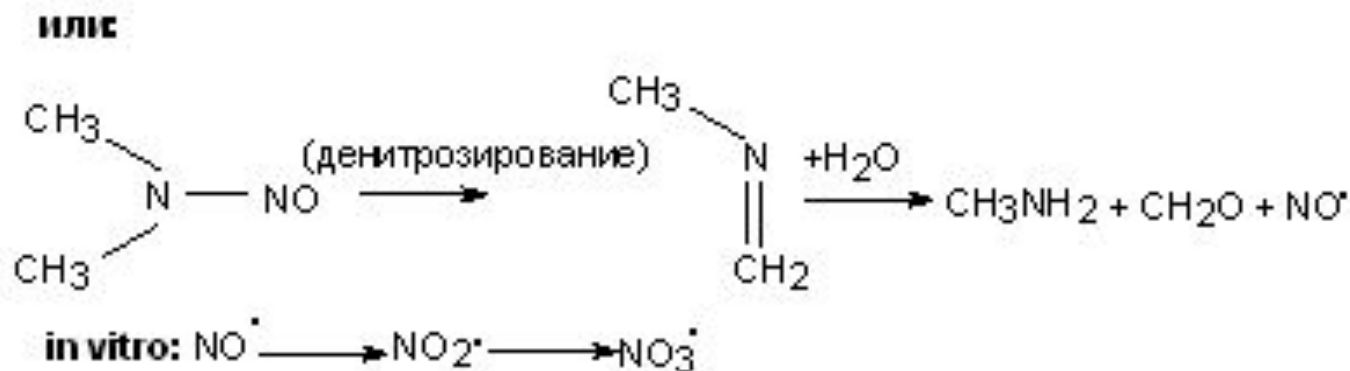
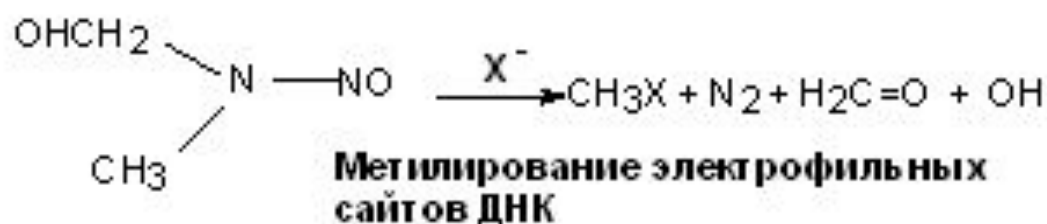
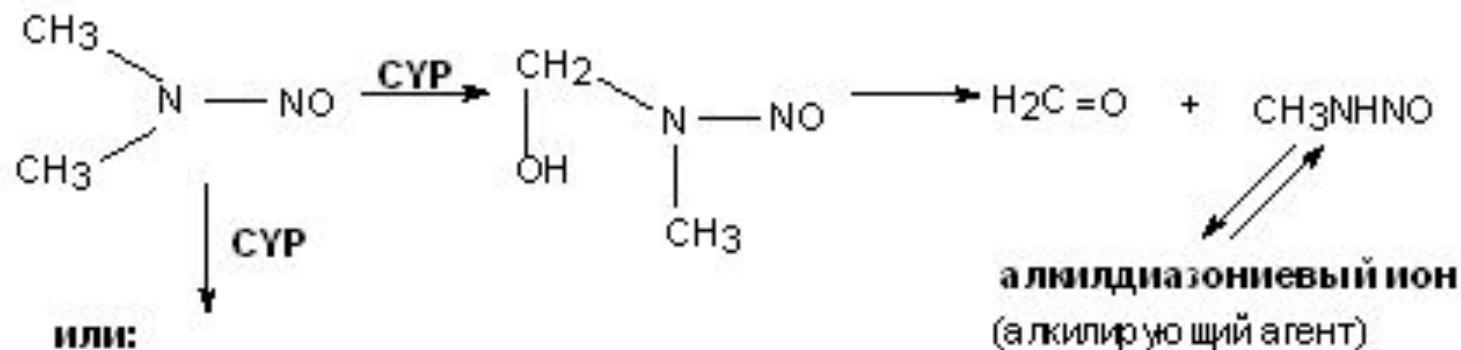
# Образование нитрозаминов

Оксиды азота, образующиеся в атмосфере, могут способствовать образованию нитрозаминов. В процессе горения из азота образуется оксид азота NO, который затем превращается в диоксид азота. Далее происходит гидратация до азотной и азотистой кислот. Это явление достаточно легко протекает на влажной поверхности (включая поверхность слизистых). Образование нитрозаминов в процессах, например, пивоварения, производства табака, а также в районах добычи газа, происходит согласно следующей реакции:



Ряд овощей содержат значительное количество нитратов. Многие виды бактерий, включая микрофлору полости рта, могут приводить к образованию нитритов из нитратов. По предварительным оценкам, бактерии, представленные в ротовой полости, способны продуцировать приблизительно 1 мг нитритов из 20 мг нитратов, содержащихся в суточном рационе (несмотря на значительные межиндивидуальные различия). В последующем происходит их накопление в желудке.

# Активация N-нитрозоалкиламинов

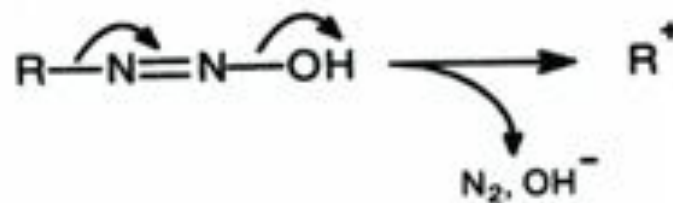


# Продукты метаболизма НА

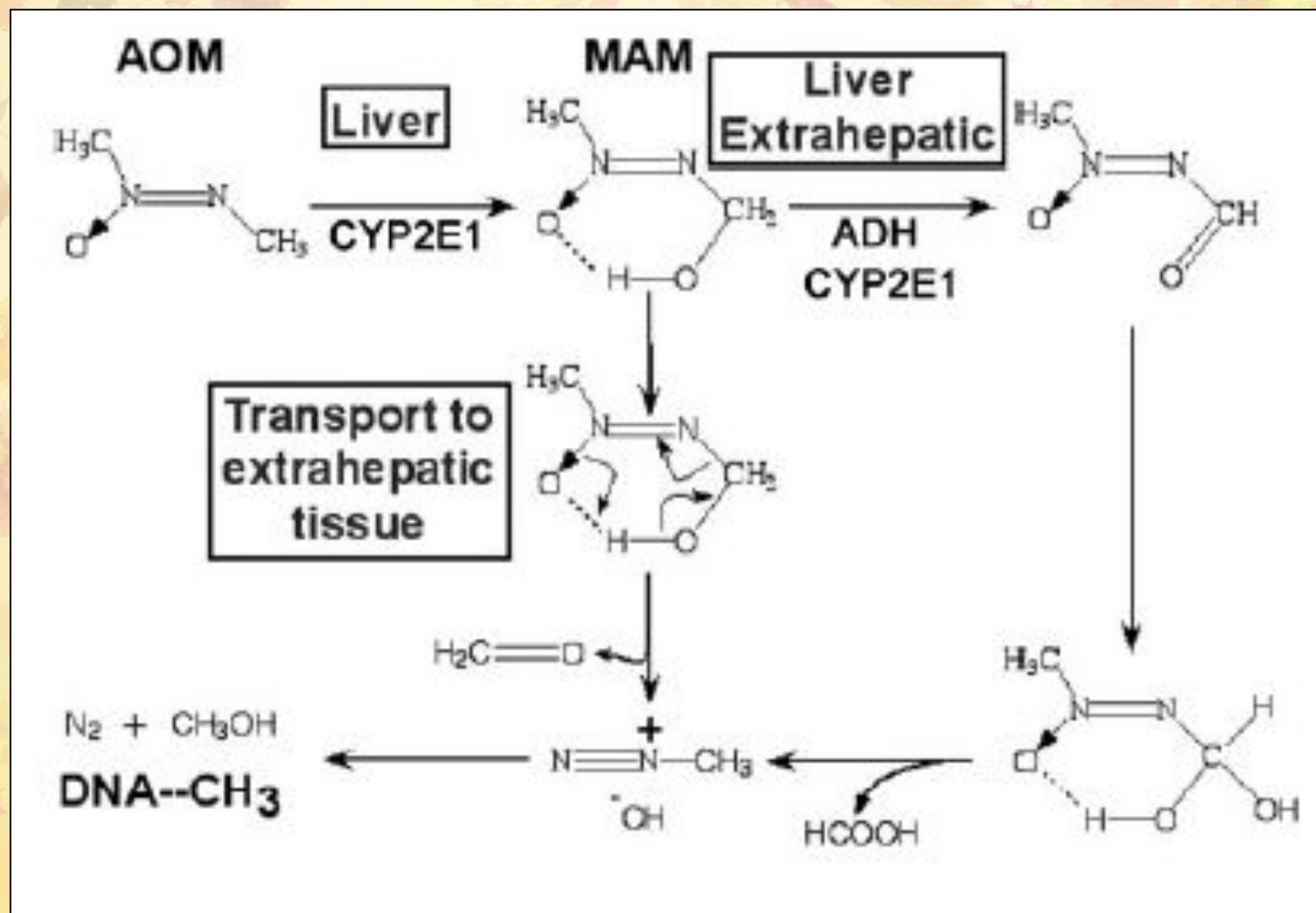
| Соединение              | Продукт метаболизма | Скорость метаболизма (нмоль/мин/мг белка)<br>печень/пищевод |
|-------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------------|
| Метилбензилнитрозамин   | бензальдегид        | 3.0/0.55                                                    |
| Метилбензилнитрозамин   | формальдегид        | 0.3/0.005                                                   |
| Диметилбензилнитрозамин | формальдегид        | 0.9/0.03 и меньше                                           |

# Роль CYP2E1 в активации НА

## Нитрозоамины

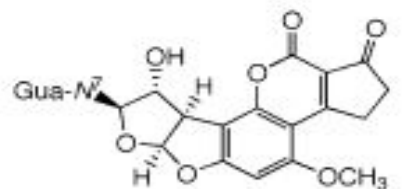
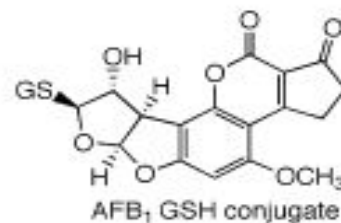
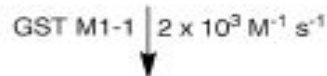
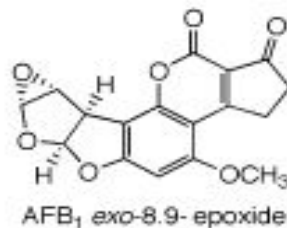
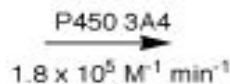
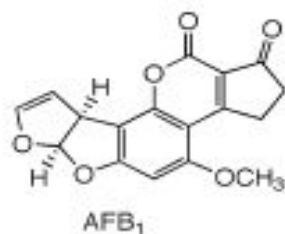


# Активация азоксиметана цитохромом P450 2E1

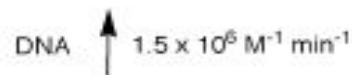


# 6. Природные канцерогены

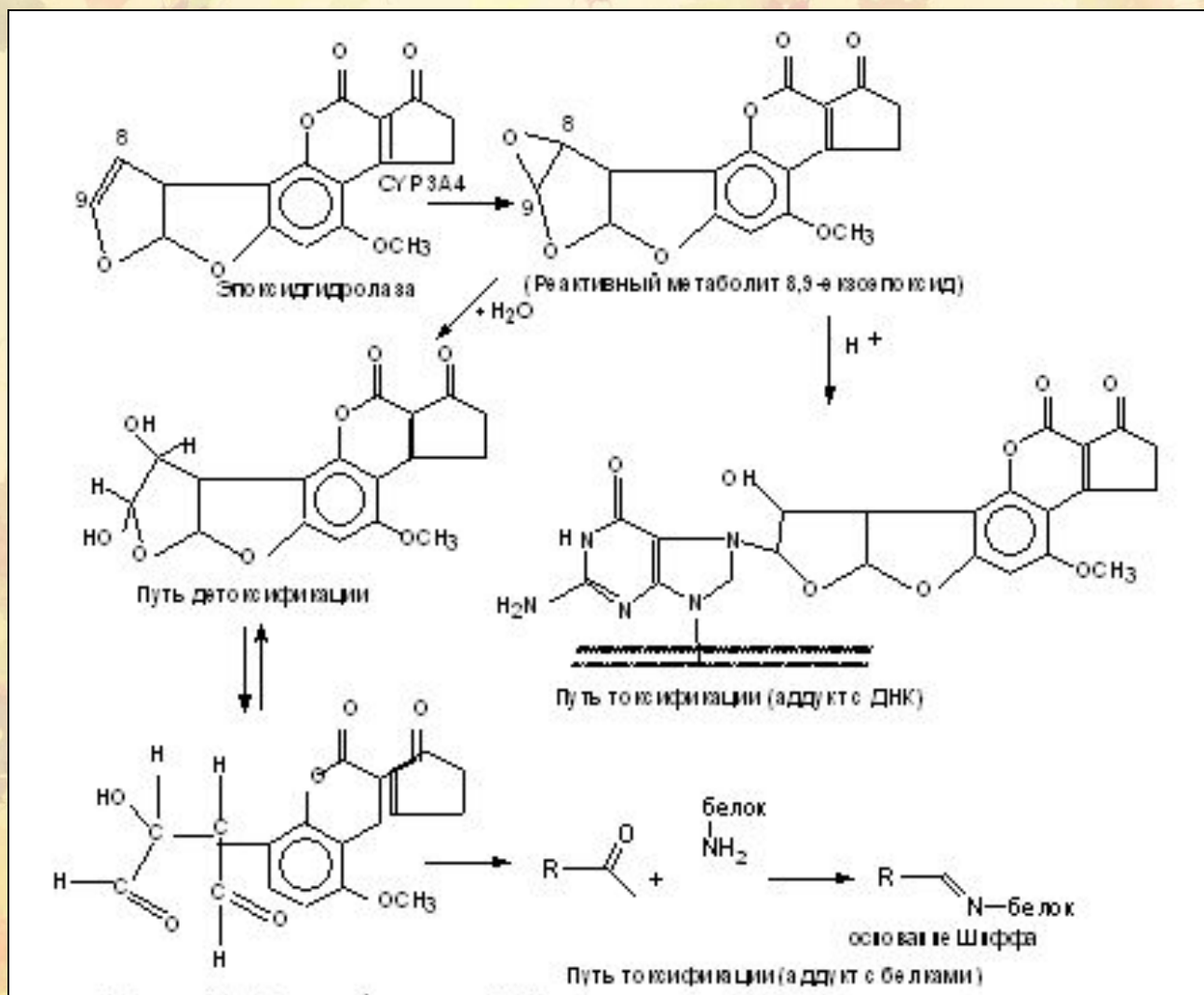
## Метаболизм Афлатоксина В1

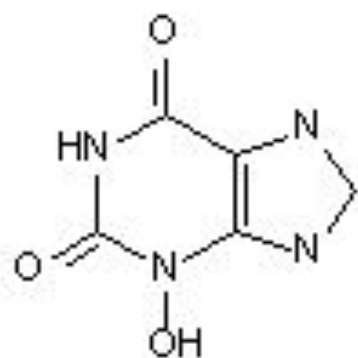


AFB<sub>1</sub> Guanine-N<sup>7</sup> adduct

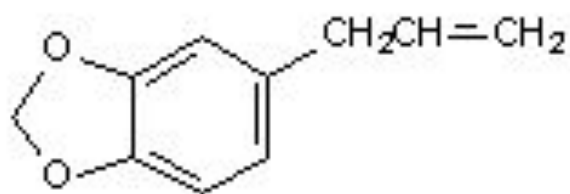


# Метаболизм Афлатоксина В1

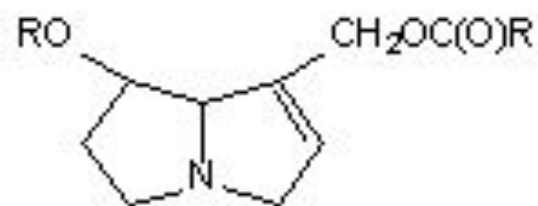




3-гидроксиксантин



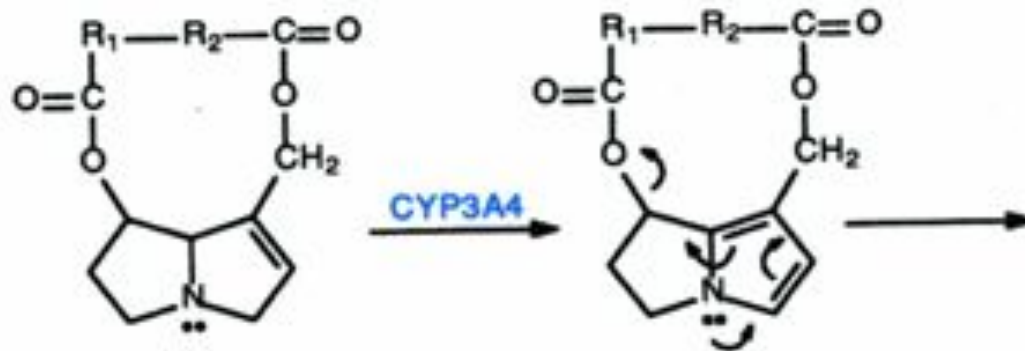
сафрол



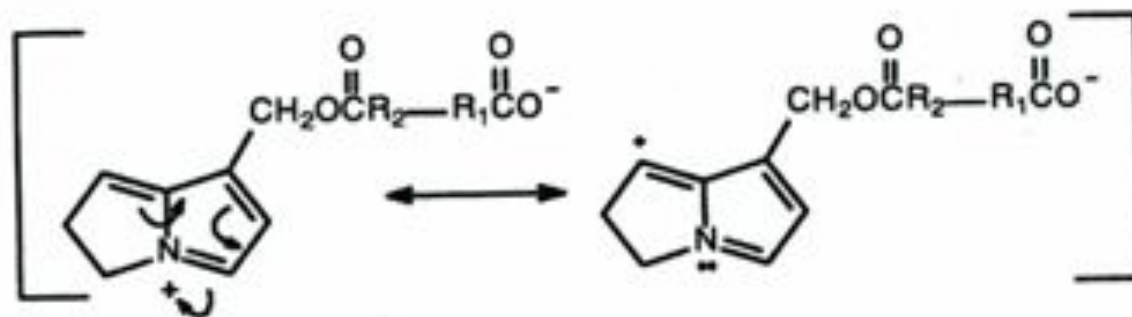
алкалоиды пирролизидина

# Алкалоиды растений

## Пирролизидиновые алкалоиды

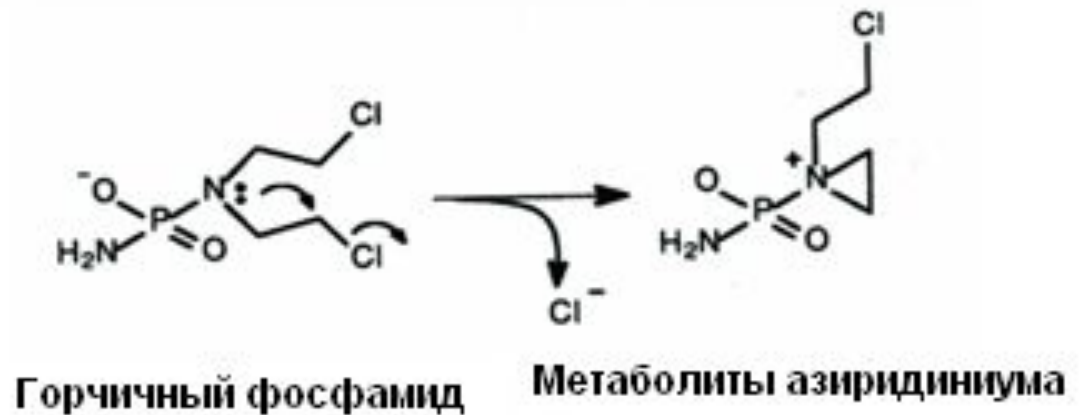
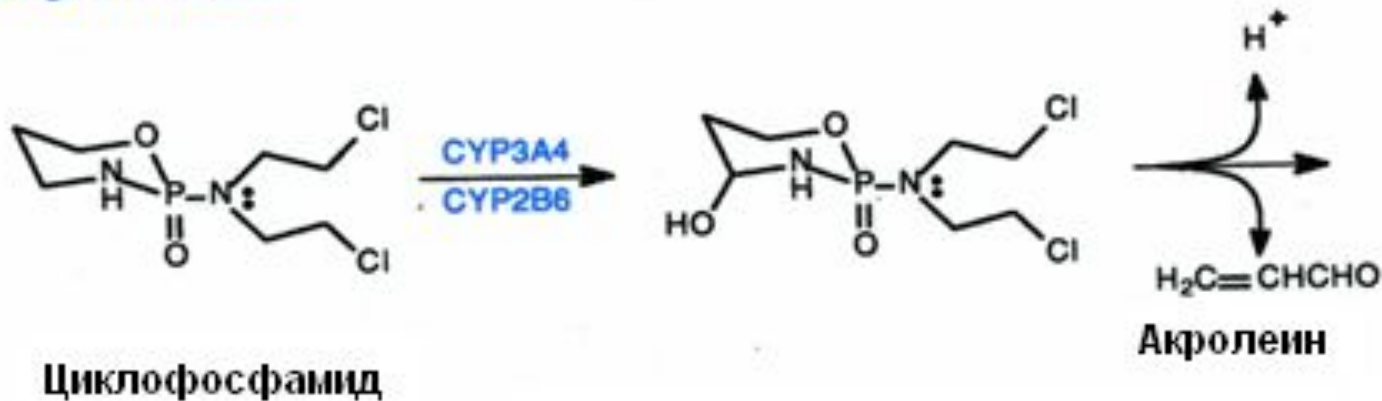


Сенеционин

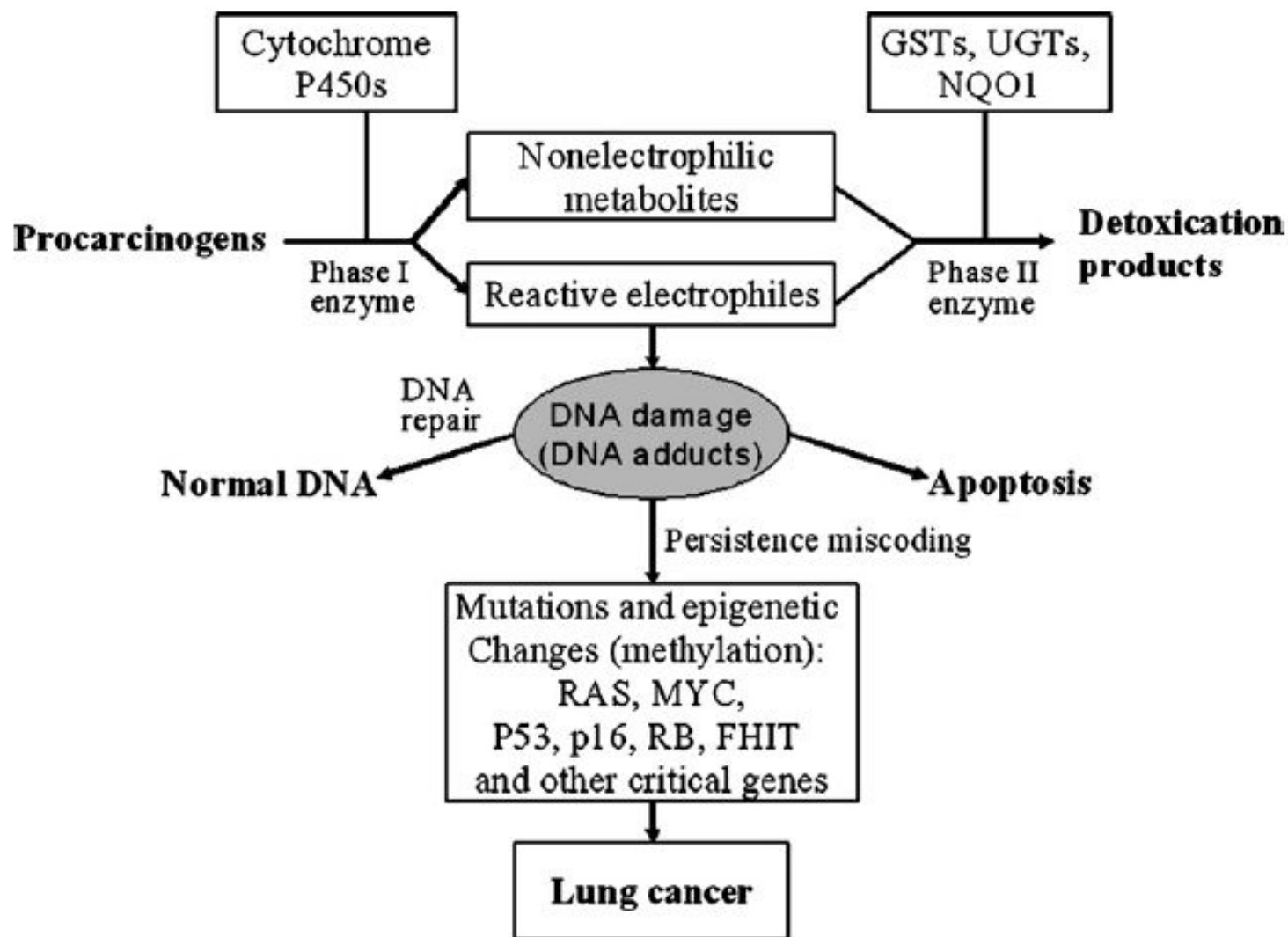


# 7. Цитостатики - канцерогены

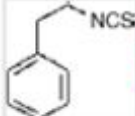
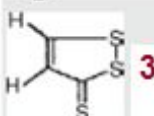
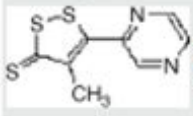
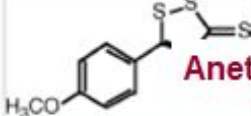
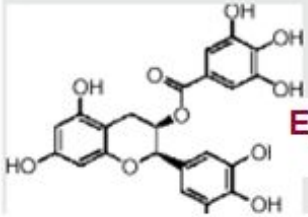
## Nitrogen mustards



# Механизм развития рака легкого

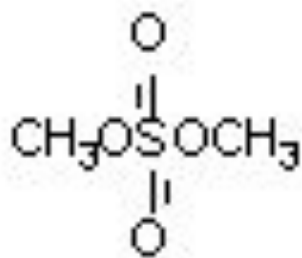


# Эффект индукторов ферментов 2-й фазы на развитие рака легкого

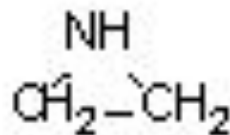
| Индуктор 2-й фазы                                                                                                      | Источник             | Мишень                                                                                            | Эффект на РЛ                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|  <b>Sulforaphane</b>                   | Брокколи             | $\uparrow$ GSTA1/2/3, $\uparrow$ GSTM1/2, $\uparrow$ GSTP1,<br>$\uparrow$ NQO1, $\uparrow$ UGT1A1 | Inhibit lung tumor induced by NNK and BaP                    |
|  <b>Phenethyl isothiocyanate</b>       | Пекинская капуста    | $\uparrow$ GSTA1, $\uparrow$ GSTM1/3,<br>$\uparrow$ GSTT1, $\uparrow$ NQO1                        | Inhibit lung tumor induced by NNK and BaP                    |
|  <b>Benzyl isothiocyanate</b>          | Редис, крест салат   | $\uparrow$ GSTP1                                                                                  | Inhibit lung tumor induced by PAH and BaP                    |
|  <b>3H-1,2-dithiolethione-3-thione</b> | Брюссельская капуста | $\uparrow$ GSTs, $\uparrow$ NQO1, $\uparrow$ UGTs                                                 | No investigation                                             |
|  <b>Oltipraz</b>                       | синт.                | $\uparrow$ GSTA, $\uparrow$ GSTM, $\uparrow$ GSTP $\uparrow$ UGTs, $\uparrow$ NQO1                | Inhibit lung tumor induced by BaP                            |
|  <b>Anethole dithiolethione</b>      | синт.                | $\uparrow$ GSTs $\uparrow$ UGTs, $\uparrow$ NQO1                                                  | No investigation                                             |
|  <b>Epigallocatechin gallate</b>     | Зеленый чай          | $\uparrow$ GSTs, $\uparrow$ NQO1, $\uparrow$ UGTs                                                 | Inhibit lung tumor induced by NNK and cisplatin, but not BaP |

## 8. Канцерогены, не требующие активации

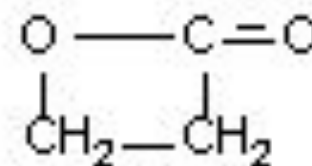
Структура некоторых первичных, полных канцерогенов:



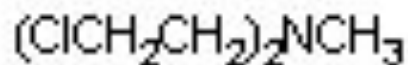
диметилсульфат



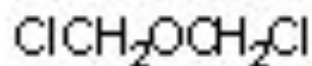
этиленимин



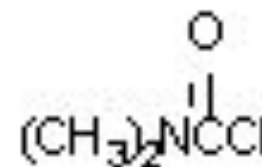
пропиоацетон



азотистый иприт



бис(хлорметил)  
эфир



диметилкарбамоил  
хлорид

# Стадии опухолевого роста

## 1. Инициация

**Процесс непосредственного действия канцерогена на клетки, запускающий их трансформацию, называется инициацией опухолевого роста.**

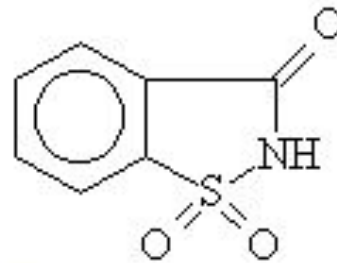
Характерными особенностями действия инициаторов являются:

- необратимость;
- куммулятивность;
- отсутствие морфологических проявлений;
- зависимость эффекта от особенностей метаболизма клетки и фаз её клеточного цикла;
- беспороговость.

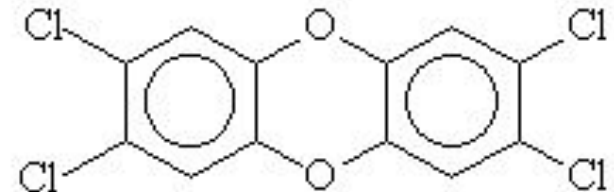
## 2. Промоция опухолевого роста

Процесс, в ходе которого инициированная клетка завершает неопластическую трансформацию называется промоцией.

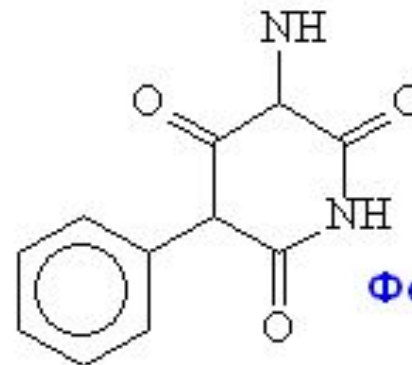
Некоторые промоторы рака:



Сахарин



ТХДД



Фенобарбитал

# Промоторы характеризуются следующими особенностями:

- - обратимостью и неаддитивностью;
- - наличием морфологических проявлений опухолевого роста;
- - пороговостью;
- - модулируемостью факторами окружающей среды.

### 3. Прогрессия

Процесс малигнизации до того доброкачественной опухоли. Полагают, что в его основе лежит дальнейшая трансформация генетического материала клеток

# Коканцерогены

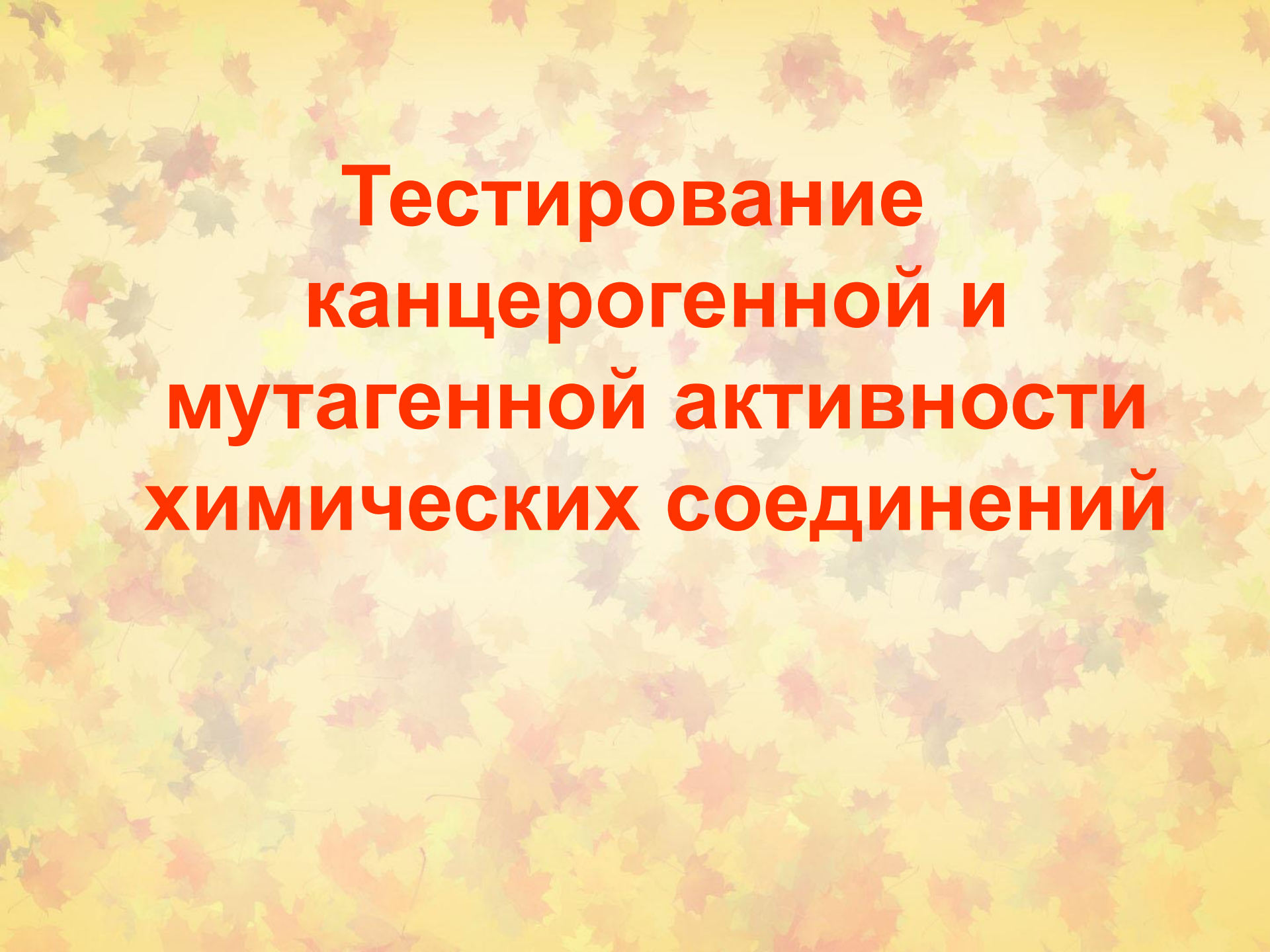
Вещества, которые существенно увеличивают вероятность формирования новообразований, действуя на организм или совместно с канцерогенами, или до него.

Промоторы отличаются от коканцерогенов тем, что реализуют эффект лишь при действии после инициатора опухолевого роста. В качестве коканцерогенов могут выступать гормоны, иммуномодуляторы, факторы питания и т.д.

# Предполагаемые механизмы коканцерогенеза

- -Увеличение скорости и объема захвата канцерогенов клетками
- - Интенсификация процессов биоактивации проканцерогенов в организме
- - Подавление процессов биологической детоксикации канцерогенов
- - Угнетение механизмов репарации поврежденной ДНК
- - Усиление процессов превращения повреждений ДНК в перманентное состояние

(Например, пыль диоксида кремния является коканцерогеном бенз(а)пирена, вызывающего карциному гортани, трахеи, легких у экспериментальных животных)

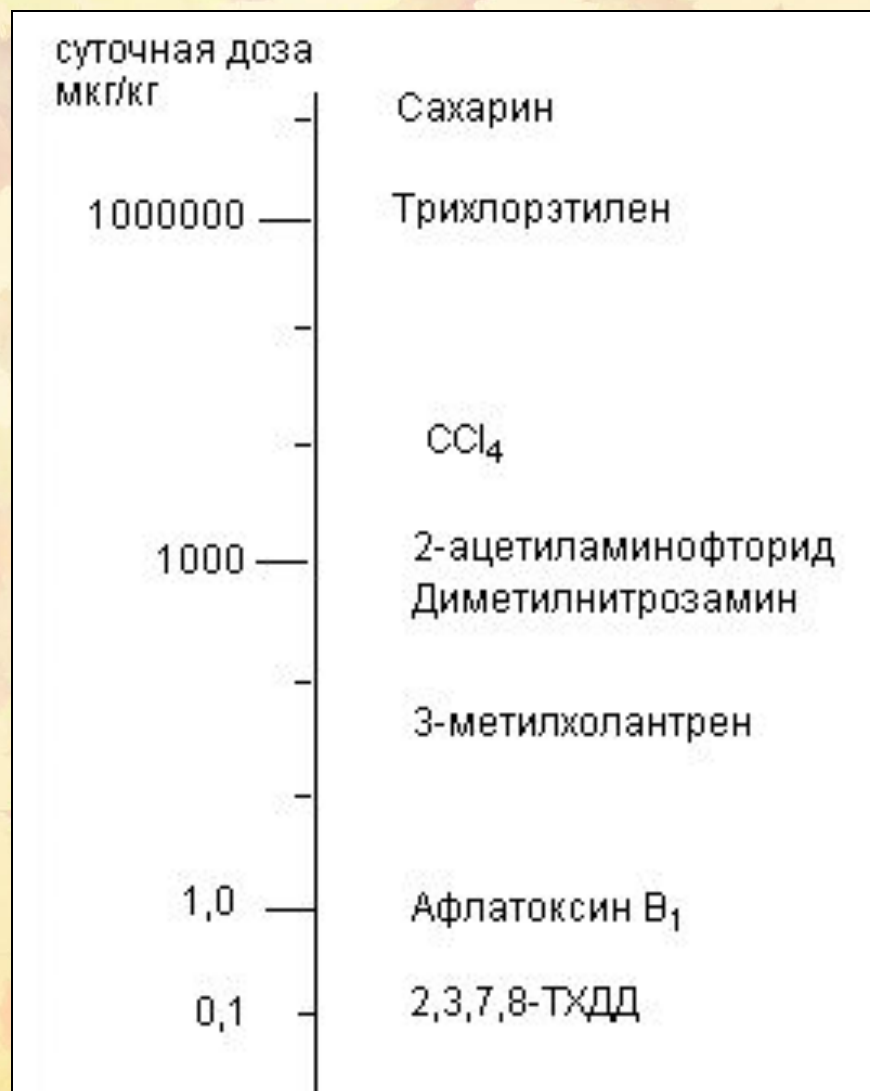


# **Тестирование канцерогенной и мутагенной активности химических соединений**

# Протокол изучения канцерогенной активности вещества

- А. Оценка химического строения вещества
- Б. Исследования в опытах *in vitro*
  - 1. Мутагенная активность;
  - 2. Влияние на процессы репарации ДНК;
  - 3. Изучение клеточной трансформации.
- Оценка результатов и выбор условий дальнейшей работы
- В. Исследования в опытах *in vivo*:
  - 1. Индукция опухолей кожи у мышей;
  - 2. Индукция опухолей легких у мышей;
  - 3. Индукция опухолей молочной железы у мышей;
  - 4. Индукция опухолей других внутренних органов у грызунов;
  - 5. Оценка действия промоторов.
- Оценка результатов и выбор условий дальнейшей работы
- Г. Хронические исследования на животных разных видов.
- Оценка результатов
- Общее заключение

# Канцерогенная активность некоторых химических соединений

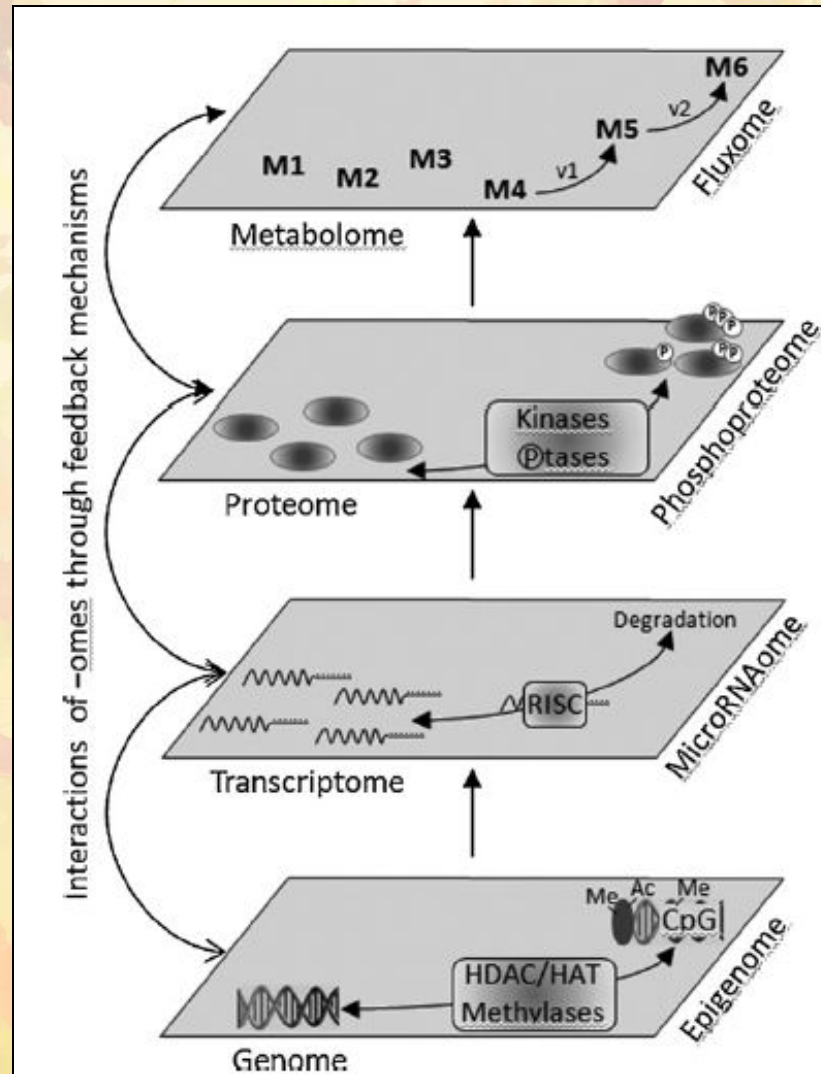


**Вещества, для которых показана способность вызывать опухоли у животных, рассматриваются как опасные и для человека. Однако видовая чувствительность к канцерогенам выражена очень значительно**

**Можно считать доказанным, что:**

- - вещество, вызывающее опухоль у животных одного, двух и даже трёх видов, не обязательно канцерогенно для человека;
- - зависимость "доза-эффект", получаемая в ходе исследований на лабораторных животных, совсем не обязательно имеет аналогичные параметры для человека, отсюда и пороги безопасного действия токсикантов для животных и человека в строгом смысле могут быть разными;
- - у животных канцерогены как увеличивают частоту возникновения опухолей, так и сокращают сроки их развития; у человека эти эффекты могут не воспроизводиться;
- - органы-мишени для одного и того же канцерогена у лабораторного животного и человека могут быть различными.

# Новые технологии (-omics) в оценке канцерогенности



# Эпидемиологические исследования

Окончательное суждение о канцерогенности вещества для человека является результатом масштабных эпидемиологических исследований. Как правило, утверждение признается справедливым лишь при выполнении ряда условий:

- выявленное увеличение частоты новообразований в обследованной популяции не может быть объяснено действием случайных причин;
- - аналогичные результаты получены в ходе нескольких независимых исследований;
- - доказано, что частота появления опухолей изменяется при изменении дозы канцерогена и времени прошедшего от момента его воздействия.
- Однако достаточно часто интерпретация получаемых результатов весьма затруднена целым рядом обстоятельств, таких как:
- - мобильность человеческих популяций, что затрудняет верификацию факта воздействия потенциального канцерогена;
- - продолжительность действия токсиканта и длительность скрытого периода. Латентный период злокачественных заболеваний крови у человека составляет 5 - 10 лет, тканей - 20 и более лет;
- - изобилие личностных особенностей, влияющих на канцерогенез: курение, употребление различных препаратов, бытовые привычки (в том числе хобби) и др.;
- - возможность работы на нескольких предприятиях;
- - не всегда корректная документированность факта воздействия;
- - дефекты диагностики опухолей;
- - возможность действия на людей иных, не оцениваемых в исследовании факторов;
- - возрастная зависимость патологии (более 60% раков встречаются у лиц старше 65 лет).

# ДНК - критическая мишень канцерогенеза

1. Многие канцерогены являются (или могут быть трансформированы) в электрофилы, ковалентно связывающиеся с ДНК
2. Дефекты в репарации ДНК (xeroderma pigmentosum) предрасполагают к развитию рака
3. Наследственные или хромосомные нарушения предрасполагают к развитию опухоли
4. Рак наследуется на клеточном уровне и, следовательно, его причиной является повреждение ДНК
5. Большинство, если не все, случаи рака сопровождаются хромосомными перестройками
6. Во многих опухолях нарушена экспрессия генов
7. Многие раковые клетки имеют активированные онкогены

# ДНК - критическая мишень канцерогенеза

- -нарушения хромосомного аппарата клеток (мутации) выявляются при большинстве новообразований;
- - большинству раков сопутствует нарушение процесса генной экспрессии;
- - в основе развития многих опухолей лежит активация онкогенов;
- - неоплазма самораспространяющийся процесс, т.е. раки формируются на клеточном уровне;
- - некоторые нарушения генома предрасполагают к развитию новообразований;
- - экспериментально доказано, что канцерогены образуют ковалентные связи с молекулой ДНК;
- - нарушение механизмов репарации ДНК предрасполагает к канцерогенезу.

# Примеры слабых и сильных электрофилов и нуклеофилов

| Электрофилы                                                                               | <i>слабые</i>                                                                       | Нуклеофилы                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Углерод в поляризованной двойной связи (хиноны, $\alpha$ , $\beta$ – ненасыщенные кетоны) |                                                                                     | Сера в тиолах (остатки цистеина в белках и глутатионе)     |
| Углерод в эпоксидах                                                                       |                                                                                     | Сера в метионине                                           |
| Арил карбониум ионы                                                                       |                                                                                     | Азот в первичных и вторичных аминогруппах белков           |
| Бензил карбониум ионы                                                                     |                                                                                     | Азот в аминогруппах пуриновых оснований нуклеиновых кислот |
| Нитрениум ионы                                                                            |                                                                                     | Кислород пуринов и пиримидинов                             |
| Алкил карбониум ионы                                                                      |                                                                                     | Кислород фосфатных групп нуклеиновых кислот                |
|                                                                                           |  |                                                            |
|                                                                                           | <i>сильные</i>                                                                      |                                                            |

# Аддукты канцерогенов с макромолекулами человека

| P450 | MeIQ<br>3-Me | MeIQx<br>BP-7,8 | IQ  | AFB1 | 2-AA | N-NDMA |
|------|--------------|-----------------|-----|------|------|--------|
| 1A1  | +++          | ++              | +   | ++++ | ++   | +++    |
| 1A2  | +++++        | ++++            | +++ | ++   | ++++ | ++++   |
| 3A4  | +            | ++              | +   | ++   | ++   | ++     |

MeIQ - 2-амино-3,5-диметилимидазо(4,5f)хиноксалин

MeIQx - 2-амино-3,8-диметилимидазо(4,5f)хиноксалин

IQ - 2-аминометил- 3,5-диметилимидазо(4,5f)хиноксалин

AFB1 - афлатоксин B1

2-AA - 2-ацетиламинофлуорен

N-NDMA - N- нитрозодиметиламин

# Специфические ДНК-аддукты, обнаруженные у человека

| Аддукт                                        | Источник аддукта          | Ткань                     |
|-----------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 7-метилгуанин                                 | Диметиламин, табачный дым | Печень, легкие, лейкоциты |
| O <sub>6</sub> -метилгуанин                   | Прокарбадин               | Лейкоциты                 |
| 7-этилгуанин                                  | Эндогенный                | Легкие, лейкоциты         |
| Цис-платин-гуанин                             | Цис-платин                | Лейкоциты                 |
| Бензо(а)пиренгуанин                           | Окружающая среда          | Легкие, лейкоциты         |
| Афлатоксин B <sub>1</sub> (N <sup>7</sup> -G) | Пища                      | Моча                      |

# Канцерогены окружающей среды и аддукты

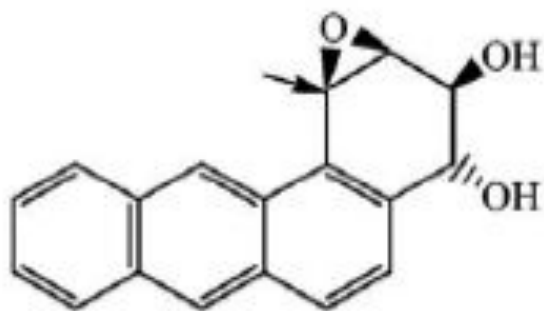
ДМНА - растворитель

БП – в саже и др. источники;

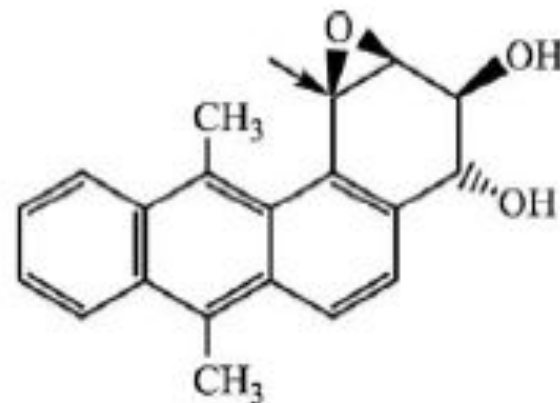
Подсчитано, что ежедневно с пищей человеком съедается 1 мкг ДМНА и 4 мкг БП, что соответствует  $3 * 10^{-9}$  O<sup>6</sup>-G аддуктов ДМНА (10 молекул на геном) и 25 молекул на геном аддуктов БП.

В Китае, где есть области, загрязненные ДМНА, этот показатель - 6000, а у домохозяйек выявляется 10 000 аддуктов БП (N-7) на геном.

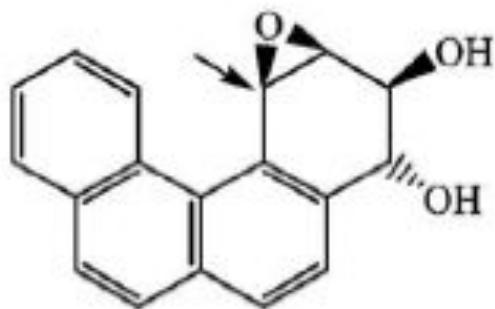
# Реактивные метаболиты ПАУ



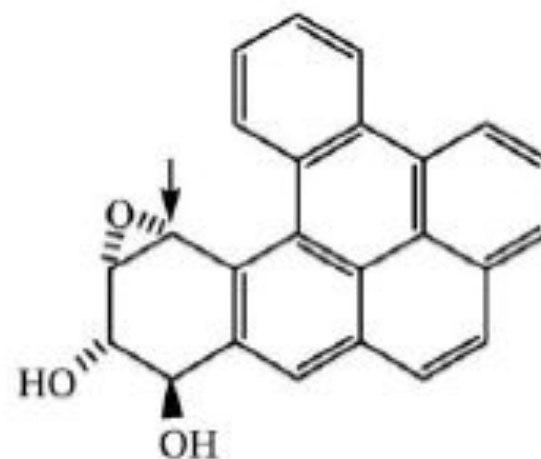
*3S,4R,1R,2S*-BaA-diol epoxide



*3S,4R,1R,2S*-DMBA-diol epoxide

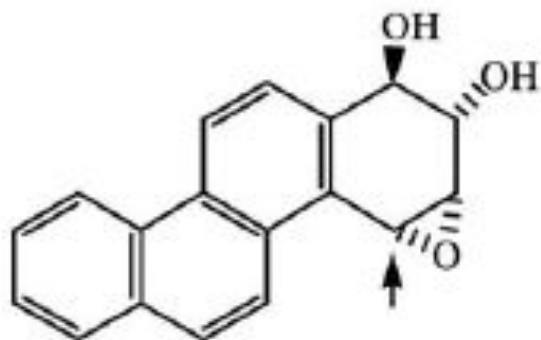


*3S,4R,1R,2S*-BcPh-diol epoxide

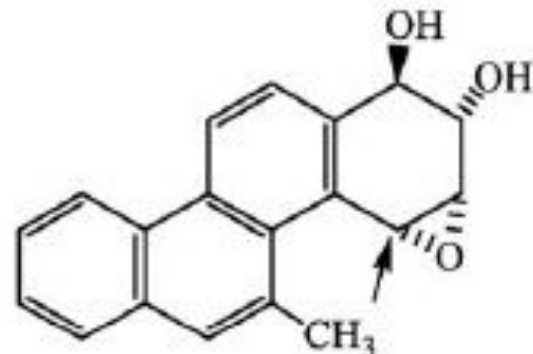


*11R,12S,13S,14R*-DB[a,l]P-diol epoxide

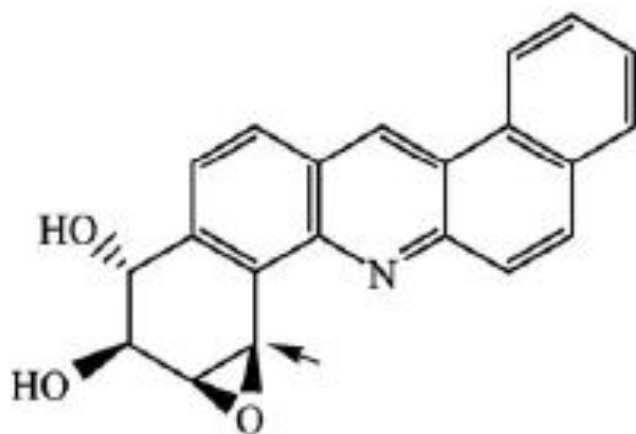
# Реактивные метаболиты ПАУ



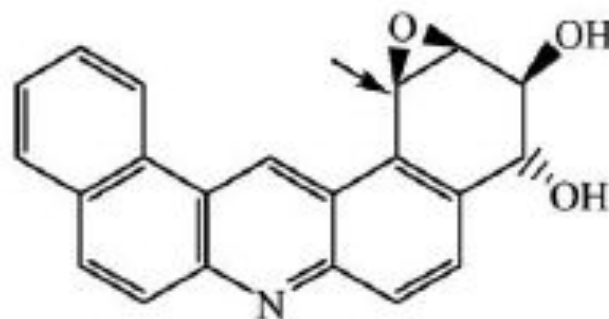
*1R,2S,3S,4R*-CHR-diol epoxide



*1R,2S,3S,4R*-5MC-diol epoxide

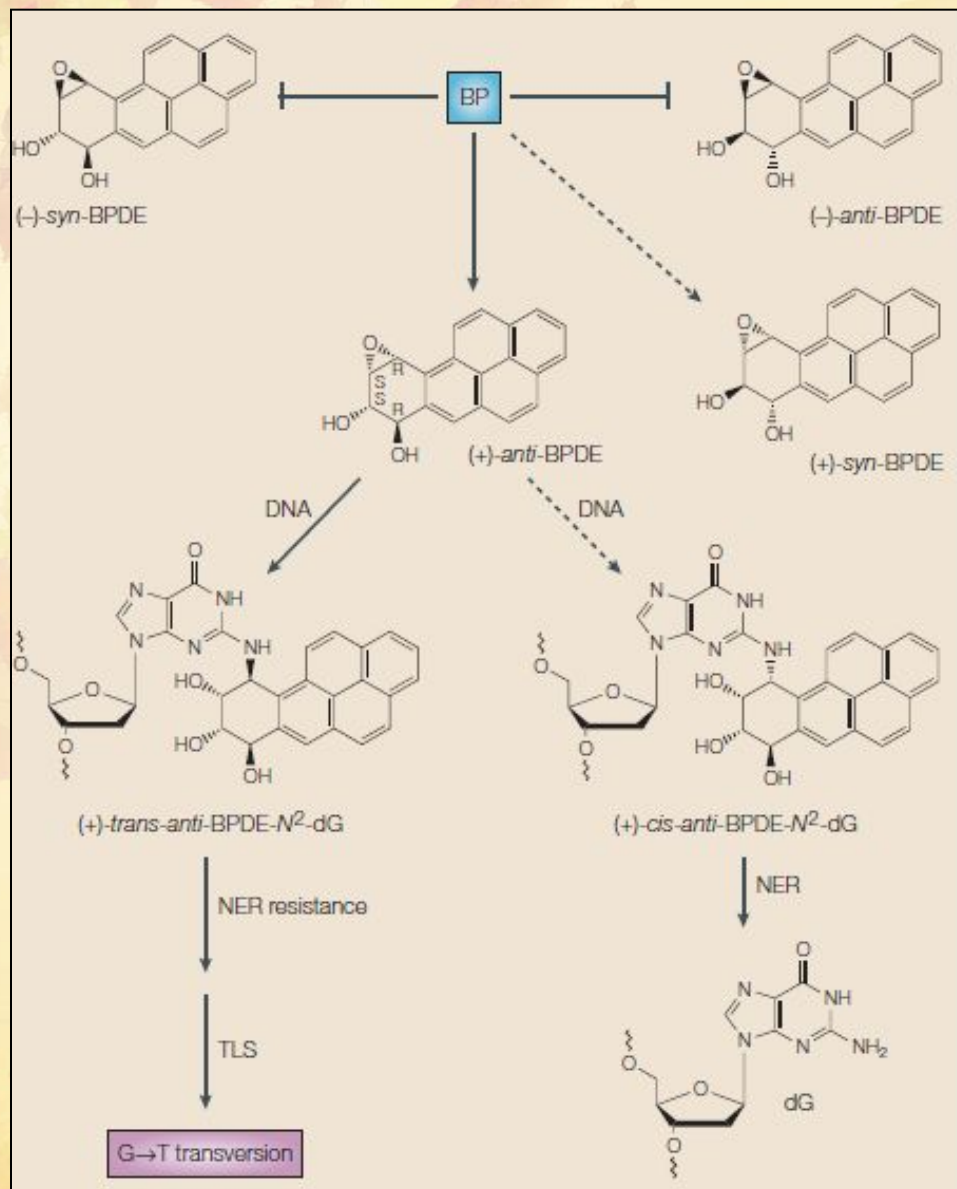


*10S,11R,8R,9S*-DB[a,h]A-diol epoxide



*3S,4R,1R,2S*-DB[a,j]A-diol epoxide

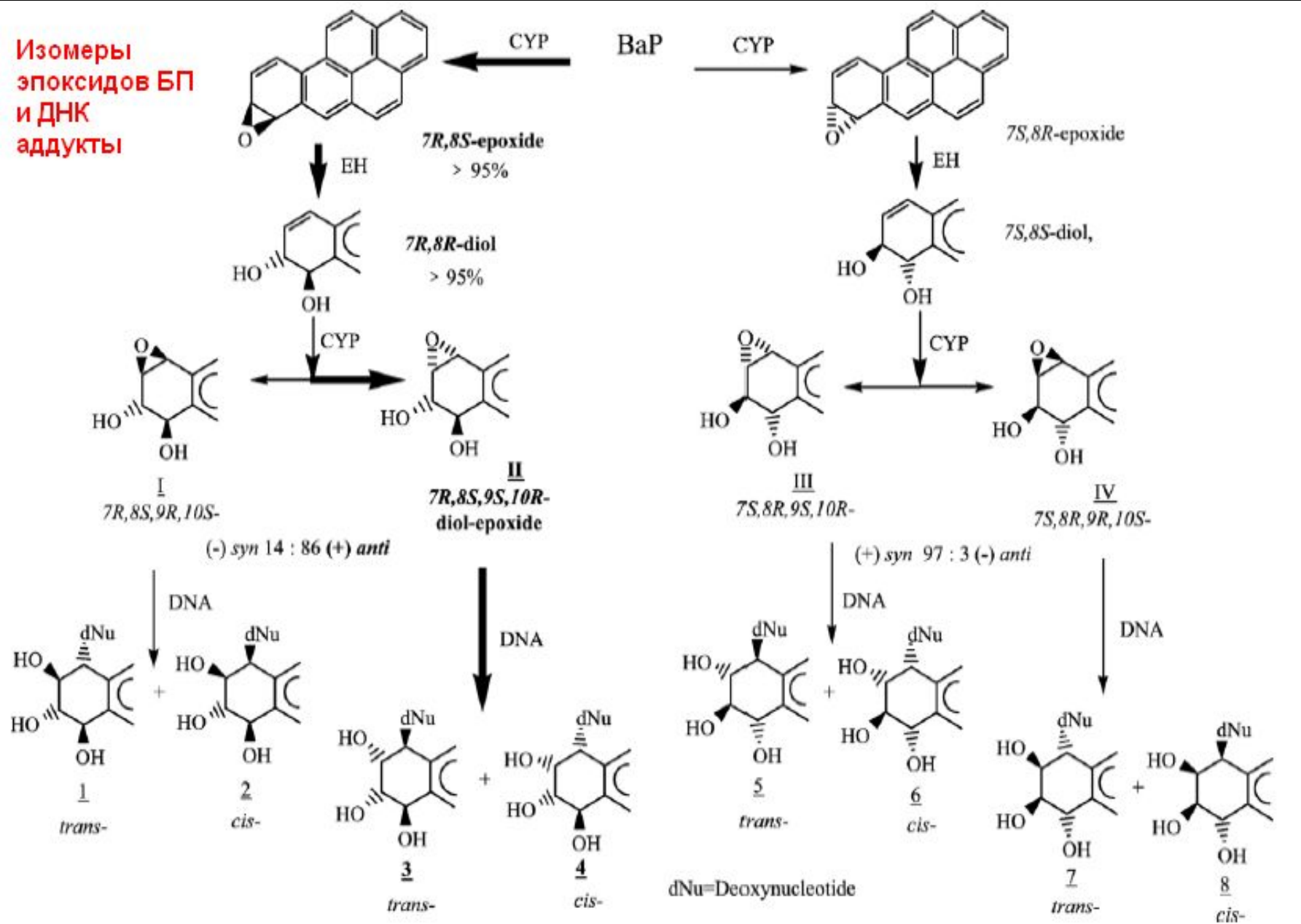
# Специфичность аддуктов БП



# Специфичность взаимодействия диолэпоксида БП с ДНК

- Найдено 4 «горячих точки» для индукции amber или ochre мутаций в lacI гене E. coli:
- Замена G в последовательностях: GCGAC, TCGTA, GTGAG, ATGAA – G находится рядом с C или T.
- 13 мутаций найдено в H-ras онкогене: 2 в 12-м кодоне и 11 – в 61-м кодоне:
- CAG → TAG
- CAG → CTG
- CAG → CAT
- CAG → CCG

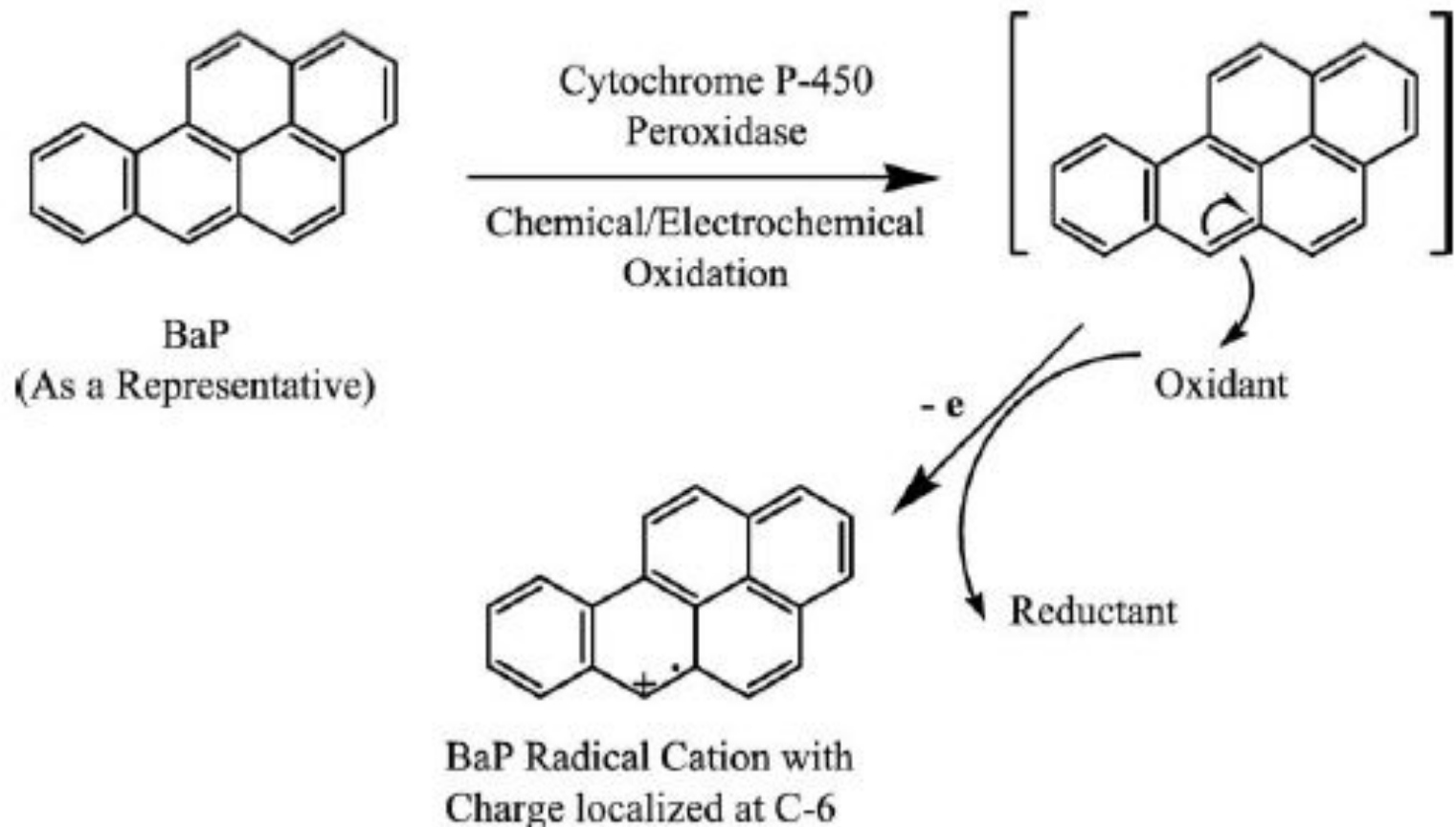
**Изомеры  
эпоксидов БП  
и ДНК  
аддукты**

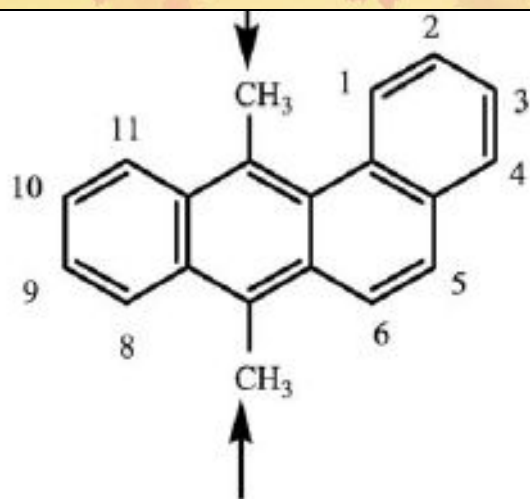


# Взаимодействие с ДНК различных метаболитов ПАУ

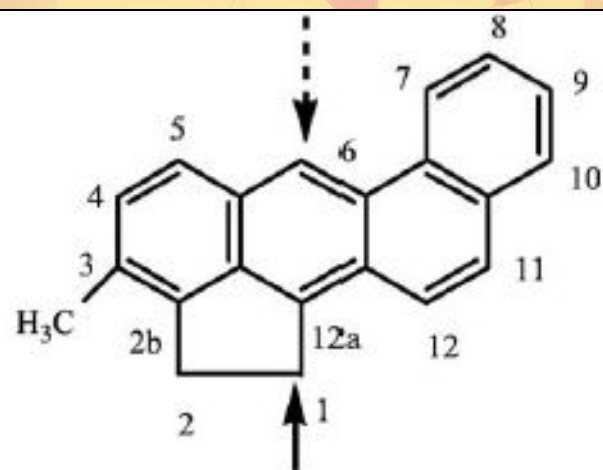
| PAHs                | Percent diol-epoxide trapped by DNA |                 |         |         |
|---------------------|-------------------------------------|-----------------|---------|---------|
|                     | R,S,S,R <sup>b</sup>                | S,R,R,S         | S,R,S,R | R,S,R,S |
| BaP                 | 13–15                               | 2–3             | 3–4     | 5       |
| DBA                 | 9–10                                | ~3              | 3–4     | 3–4     |
| BaA                 | 25                                  | 10              | 8       | 10      |
| 7MBA                | 16                                  | 3               | —       | —       |
| 5MC                 | 32 <sup>c</sup>                     | 32 <sup>c</sup> | 3       | 5       |
| BgC <sup>d</sup>    | 12                                  | 5               | 9       | 4       |
| 5,6DMC <sup>e</sup> | 22                                  | 10              | 13      | 12      |
| BcPh                | ~75                                 | ~65             | ~65     | ~60     |

## 2. Образование катионных радикалов ПАУ

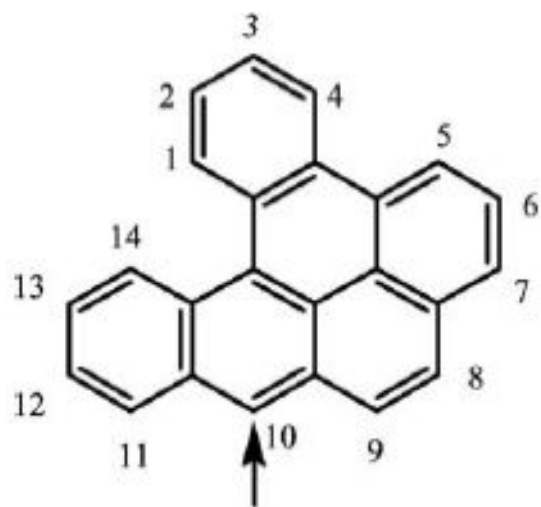




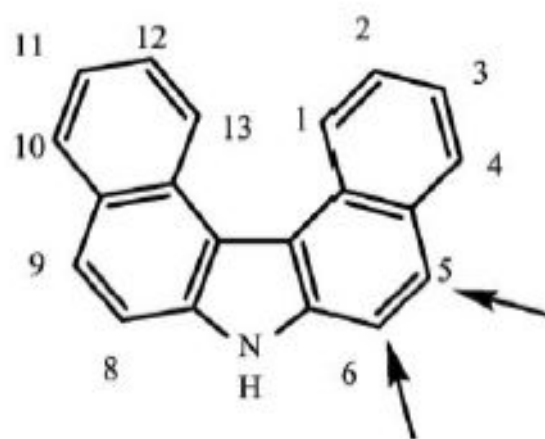
DMBA



3MC



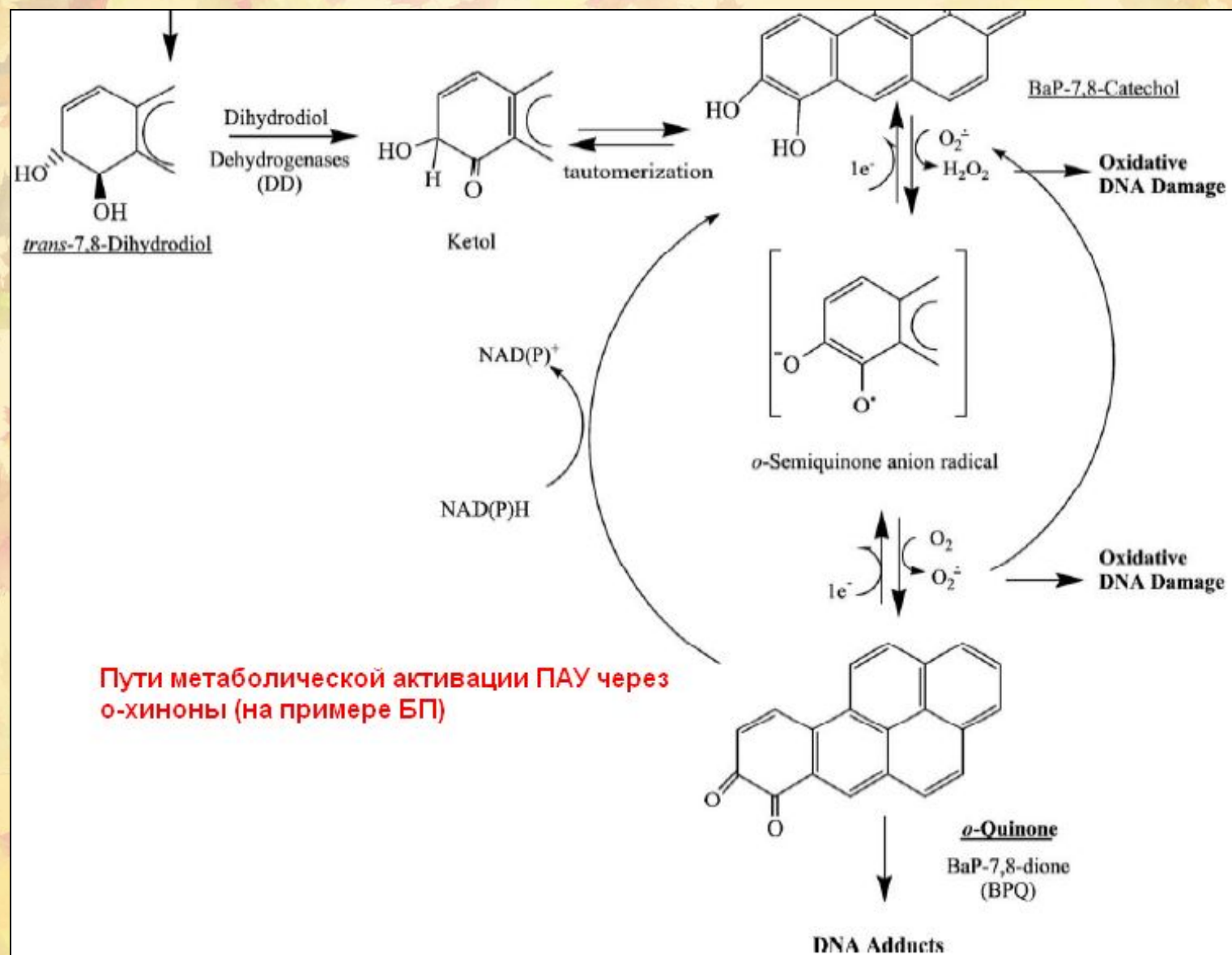
DN[a,l]P

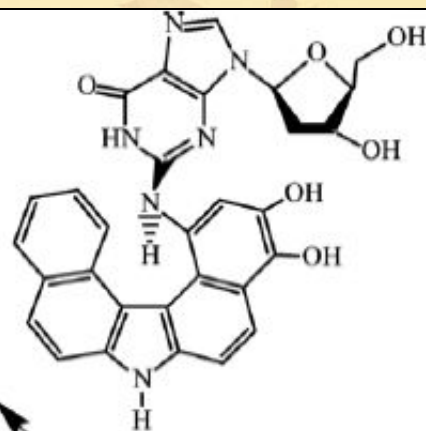
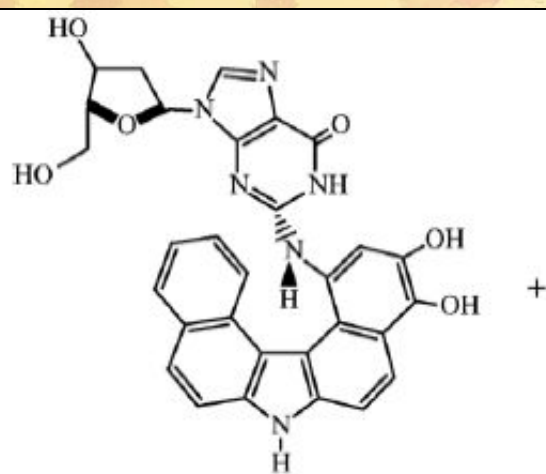


DB[c,g]C

**Позиции высокой регио-селективности в радикальных катионах ПАУ и ННА**

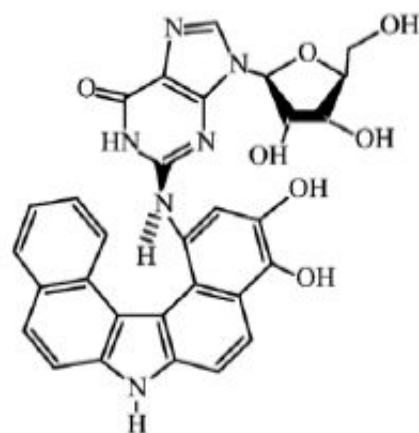
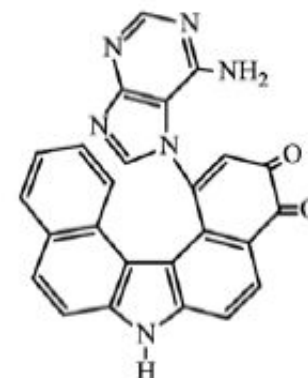
# 3. Образование хинонов





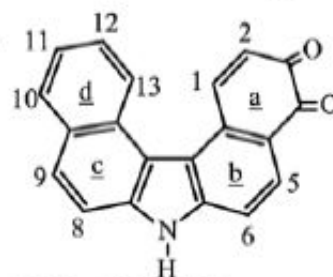
Образование аддуктов ДНК с  
DB(c,g)C-3,4-dione

No Adduct



2 Conformational Isomers

Two Adducts  
(Not Fully Characterized)

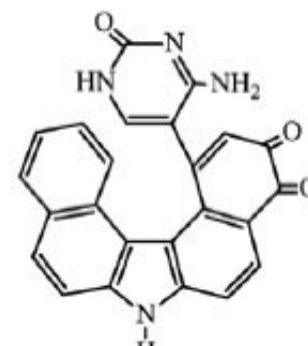
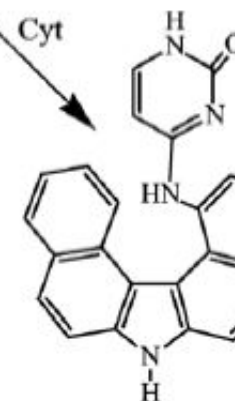


DB[c,g]C-3,4-dione

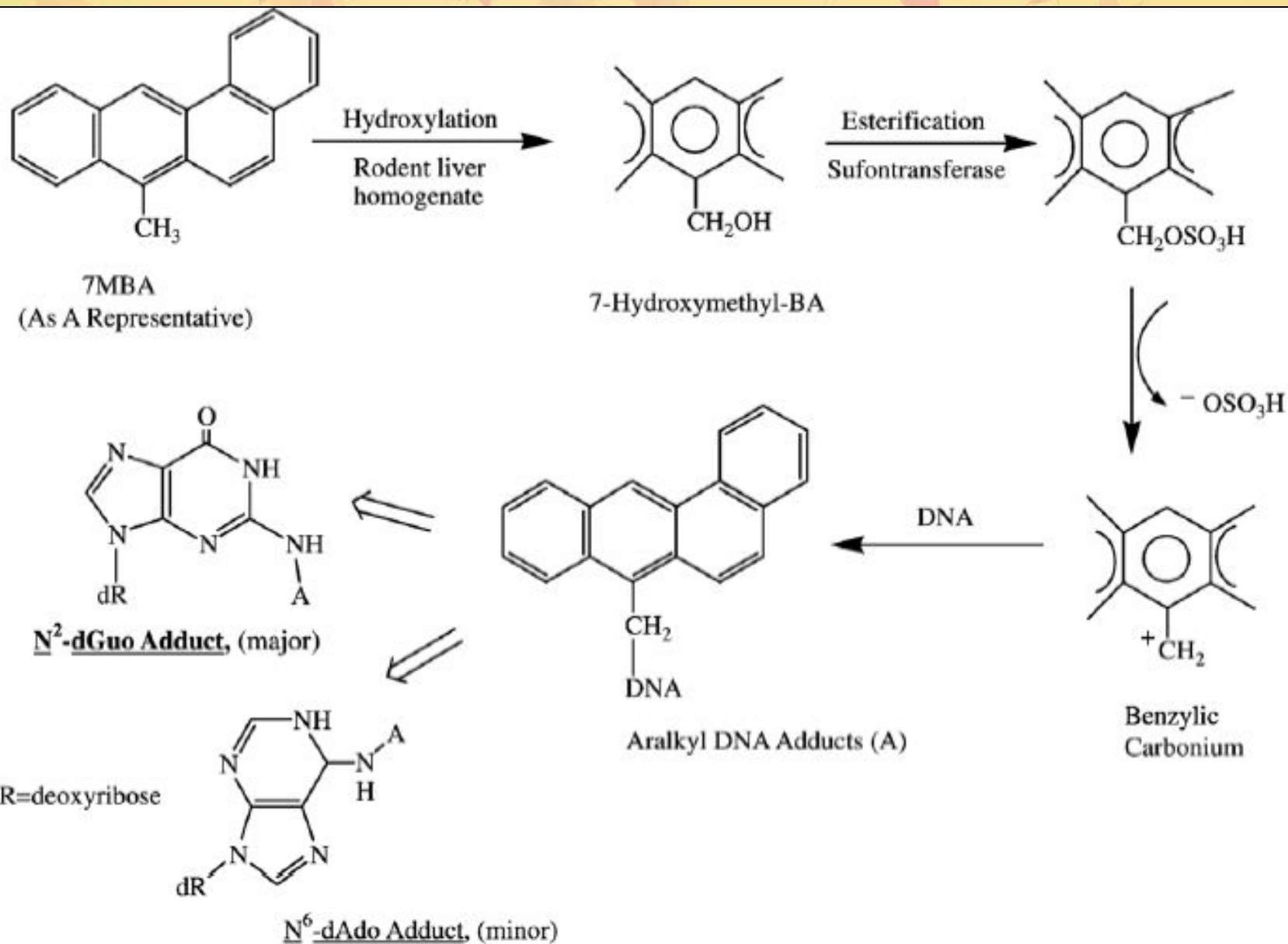
Guo

dCyd

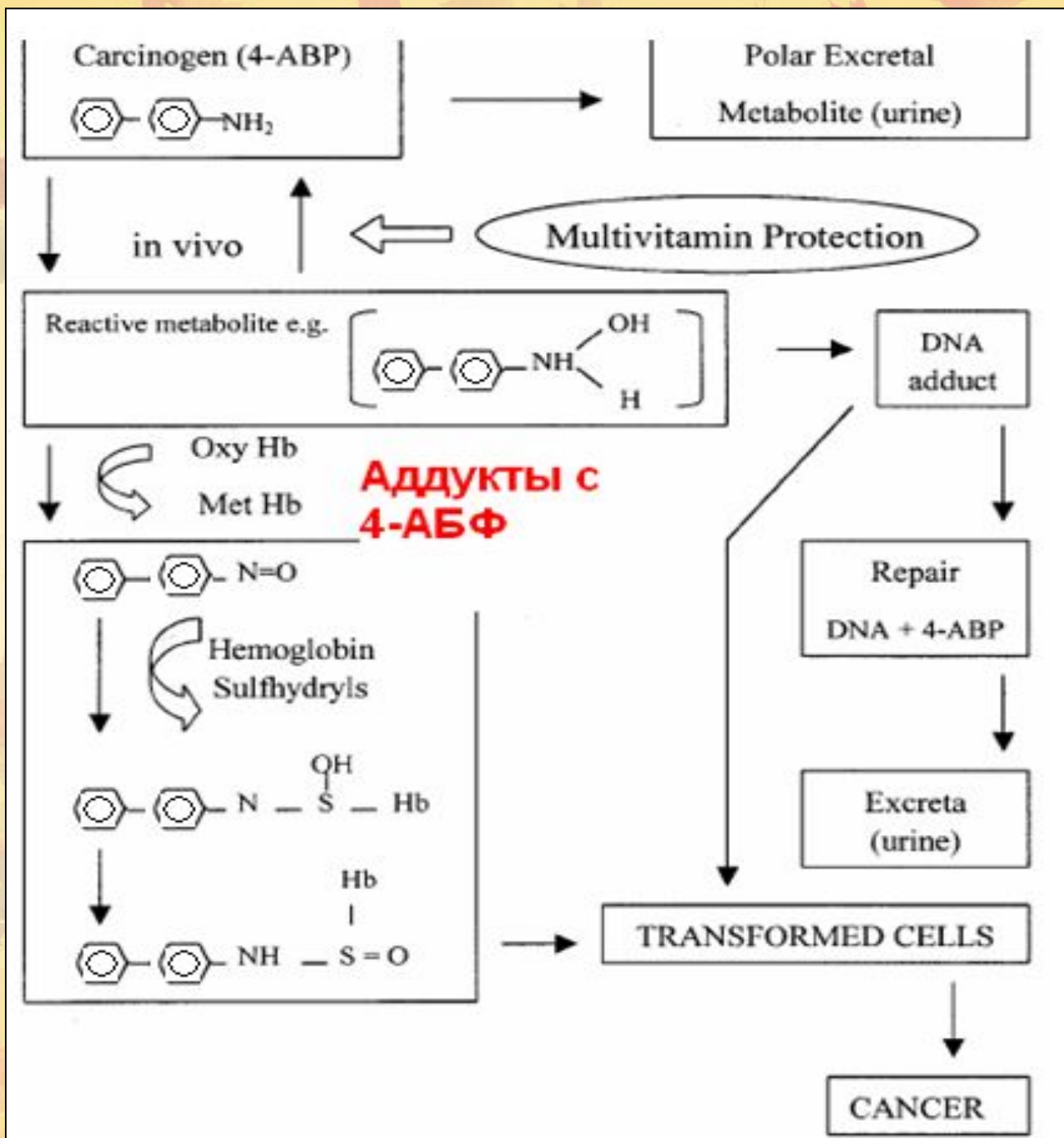
dAdo



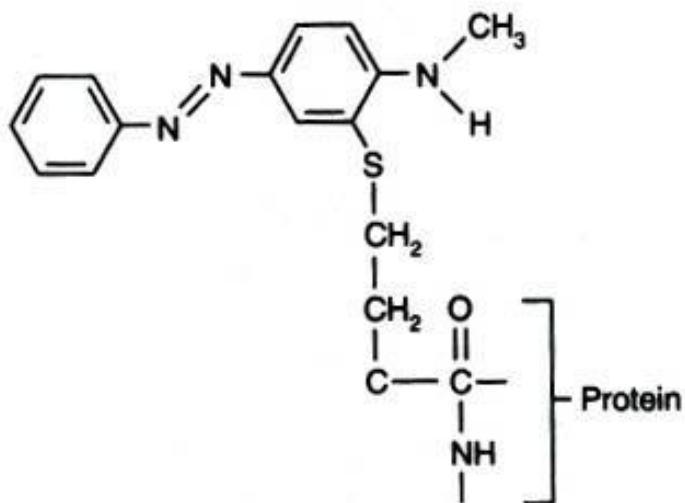
No Adduct



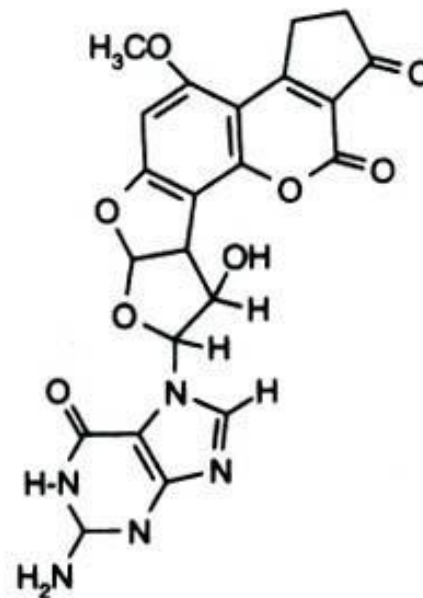
Активация метил-замещенных ПАУ через образование электрофильных сульфо-эфиров



# Аддукты других канцерогенов

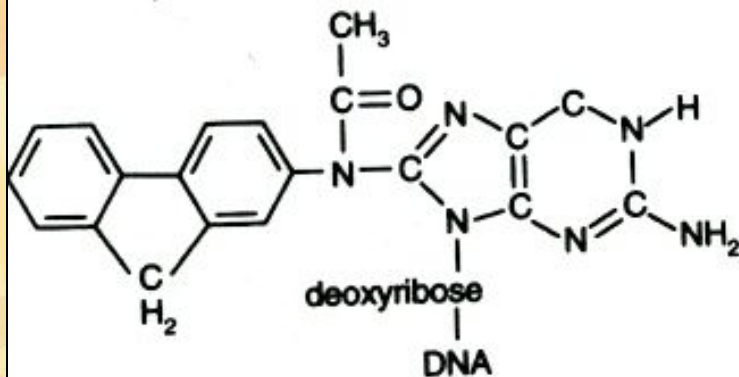


3-(homocysteine-S-yl) *N*-methyl-4-aminoazobenzene in peptide linkage

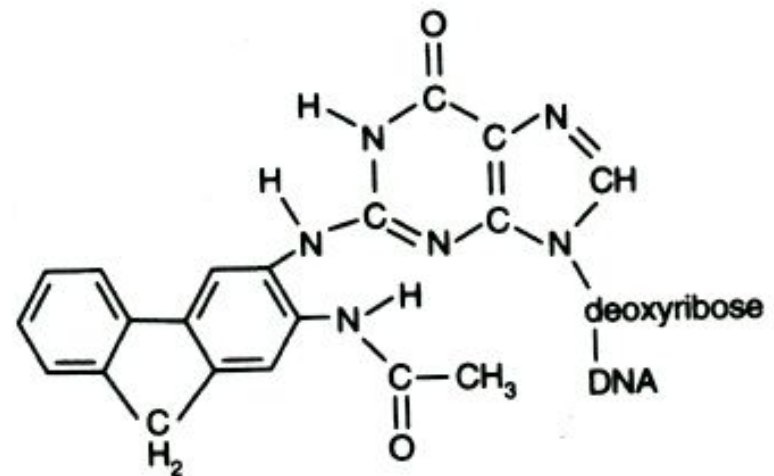


Aflatoxin B<sub>1</sub> *N*<sup>7</sup> guanine-adduct

# Аддукты других канцерогенов

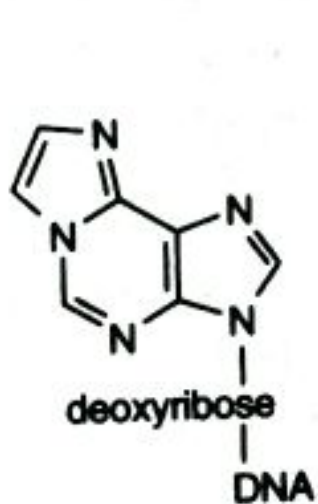


*N*-(deoxyguanosin-8-yl)-  
acetylaminofluorene in DNA

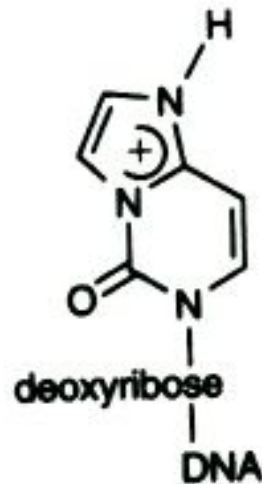


3-(deoxyguanosin  $N^2$ -yl)-acetylaminofluorene  
in DNA

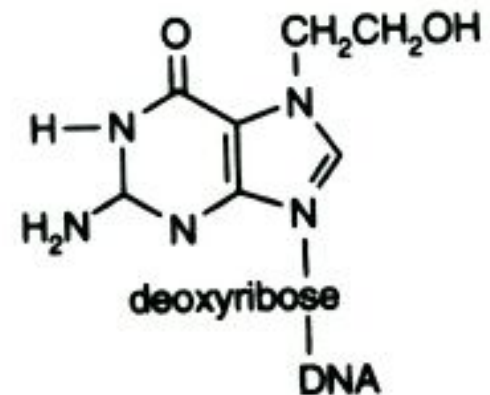
# Аддукты других канцерогенов



1, N<sup>6</sup>-ethenoadenine  
in DNA



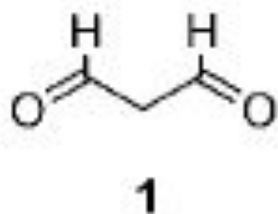
3, N<sup>4</sup>-ethenocytosine  
in DNA



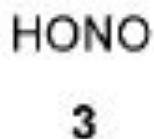
7, -(2-hydroxyethyl) guanosine  
in DNA

# Межнитевые сшивки ДНК (ICL- interstrand crosslink)

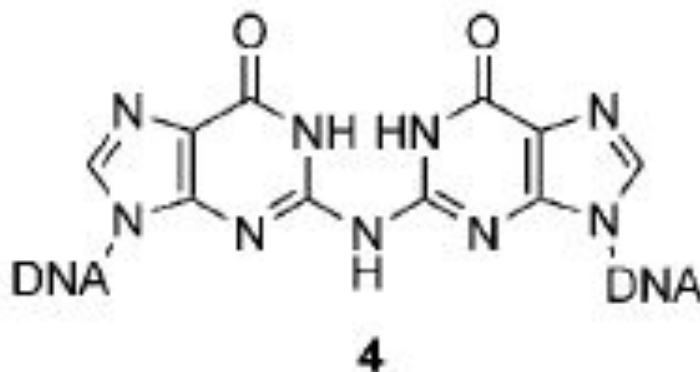
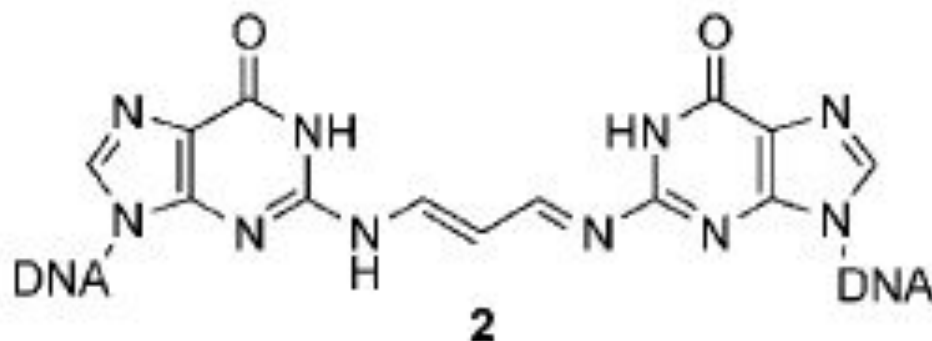
Агенты,  
обр. сшивки



Малоновый  
диальдегид



ICL



# Аддукты ДНК и рак

| Cancer or organ/tissue                                                      | Are adduct levels elevated in smokers? |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| (1) DNA adducts in tissues where smoking causes cancer <sup>b</sup>         |                                        |
| Lung                                                                        | Yes                                    |
| Larynx                                                                      | Yes                                    |
| Naso/oro/hypopharynx                                                        | Not known                              |
| Oesophagus                                                                  | Yes                                    |
| Oral/nasal cavities                                                         | Yes                                    |
| Pancreas                                                                    | Yes                                    |
| Bladder                                                                     | Yes                                    |
| Kidney                                                                      | Not known                              |
| Liver                                                                       | Not known                              |
| Colon (?) <sup>c</sup>                                                      | Yes (limited data)                     |
| Stomach                                                                     | Yes (limited data)                     |
| Uterine cervix                                                              | Yes                                    |
| Myeloid leukaemia                                                           | Not known                              |
| (2) DNA adducts in tissues where smoking does not cause cancer <sup>a</sup> |                                        |
| Breast                                                                      | No                                     |
| Prostate                                                                    | Not known                              |
| Endometrium                                                                 | Not known                              |

# Алкилирование ДНК (<sup>6</sup>О-гуанин и <sup>7</sup> N-гуанин) и индукция тимомы у мышей

| Алкилирующий агент         | Сокращенное название | Структура                                                      | Соотношение <sup>6</sup> О к <sup>7</sup> N <i>in vitro</i> | Количество <sup>6</sup> О-Г/10 <sup>6</sup> нуклеотидов | Появление опухоли <i>in vivo</i> |
|----------------------------|----------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Метилметан-сульфонат       | MMS                  | CH <sub>3</sub> OSCH <sub>3</sub>                              | 0.004                                                       | 0.1                                                     | + -                              |
| Этилметан-сульфонат        | EMS                  | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 0.03                                                        | 1.0                                                     | + -                              |
| N-метил-N-Нитрозо-мочевина | MNU                  | CH <sub>3</sub> N(NO)CONH <sub>2</sub>                         | 0.11                                                        | 20                                                      | ++                               |
| N-этил-N-Нитрозо-мочевина  | EMU                  | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N(NO)CONH <sub>2</sub>           | 0.7                                                         | 40                                                      | ++++                             |

# Методы измерения аддуктов

- <sup>32</sup>P-после мечение
- - Иммунохимические (Pab, Mab)
- - Флуоресцентная спектроскопия
- - HPLC
- - Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)

Эти методы позволяют определять 1 аддукт на 1 000 000 – 10 000 000 нуклеотидов. Или 1-1000 аддуктов на клетку.

# Тестирование аддуктов

Радиохимические методы исследования позволяют определять аддукты ДНК в малых концентрациях (1 аддукт на 1000 000-100 000 000 нуклеотидов).

# Метод <sup>32</sup>P послемечения

5'NpNpNpNpNpNpNpNpNpNpNpNpXpNpNpNpNpNpNpNpNpNpNpNpNp3' ДНК

↓ гидролиз микрококковой нуклеазой (МН) и селезеночной  
фосфодиэстеразой (СФДЭ)

10<sup>7</sup>Np + Xp

↓ обогащение гидролизата

10<sup>4</sup>Np + Xp

↓ мечение [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ по 5' положению

10<sup>4</sup> p<sup>\*</sup>Np + p<sup>\*</sup>Xp + [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ

↓ отмывка хроматографией в D1 направлении

p<sup>\*</sup>Xp

↓ разделение аддуктов двумерной хроматографией

хроматографическая картина

N - нормальный нуклеозид

X - модифицированный нуклеозид (аддукт)

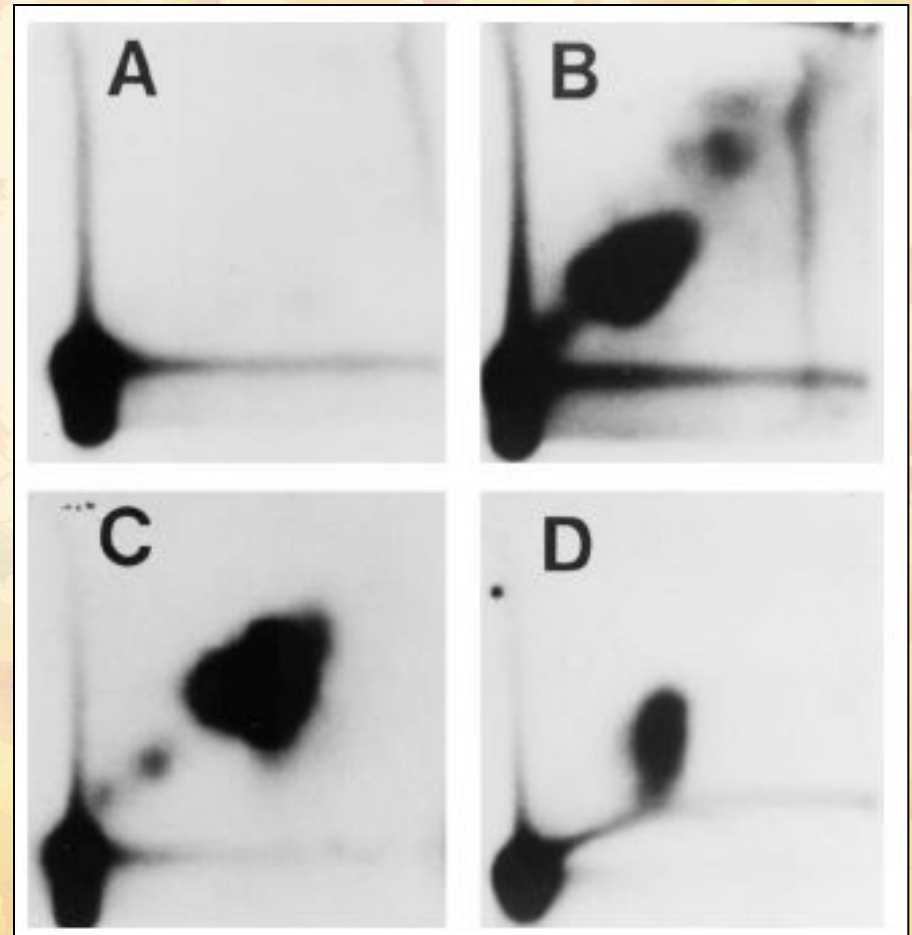
p - неорганический фосфат

p<sup>\*</sup> - меченый неорганический фосфат

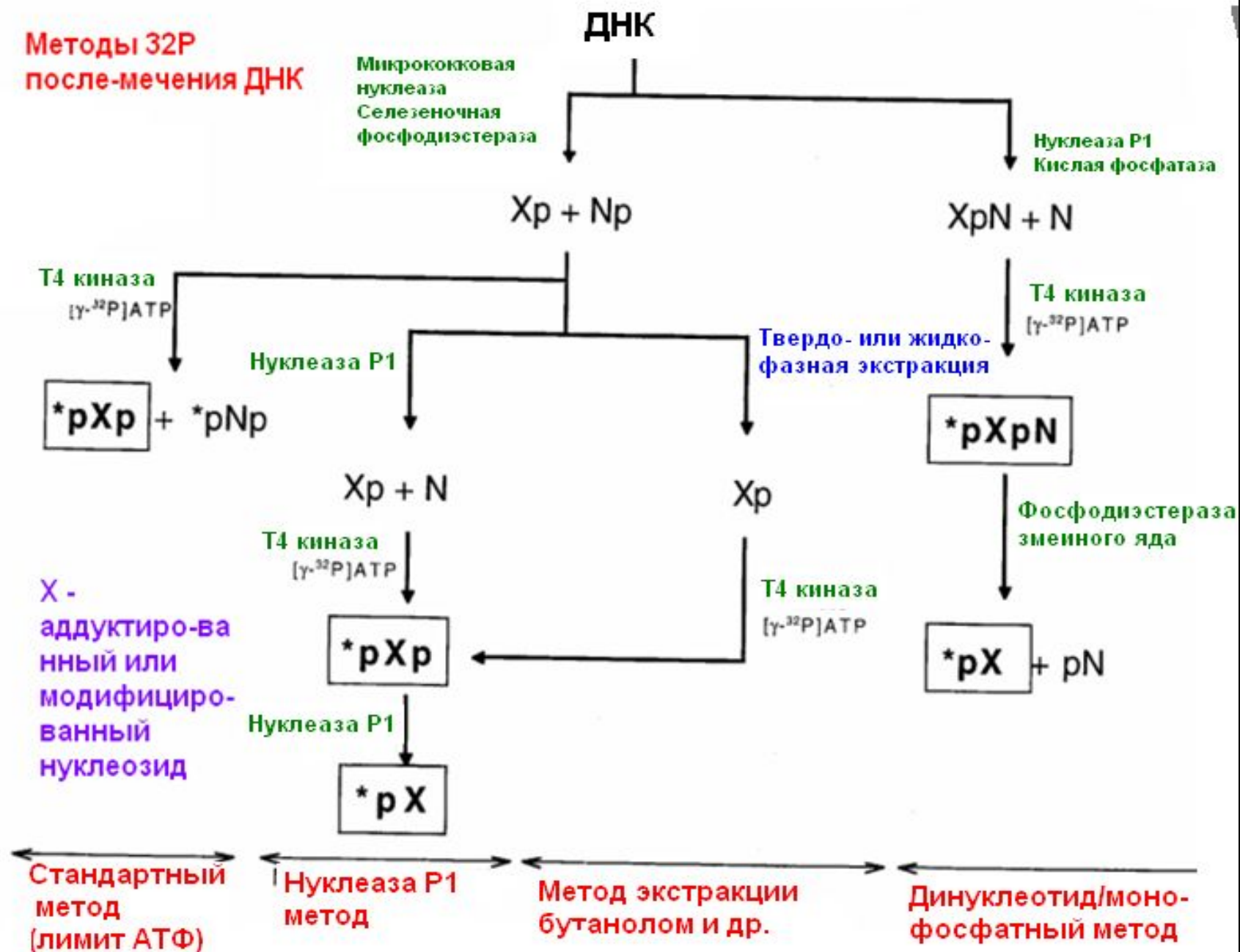
# Радиоактивная детекция аддуктов

Панель (А) и (В) показывает  
хроматограммы ДНК,  
изолированной из мышей,  
получавших контрольную диету  
без и с 200 мг/кг безо(а)пирена.

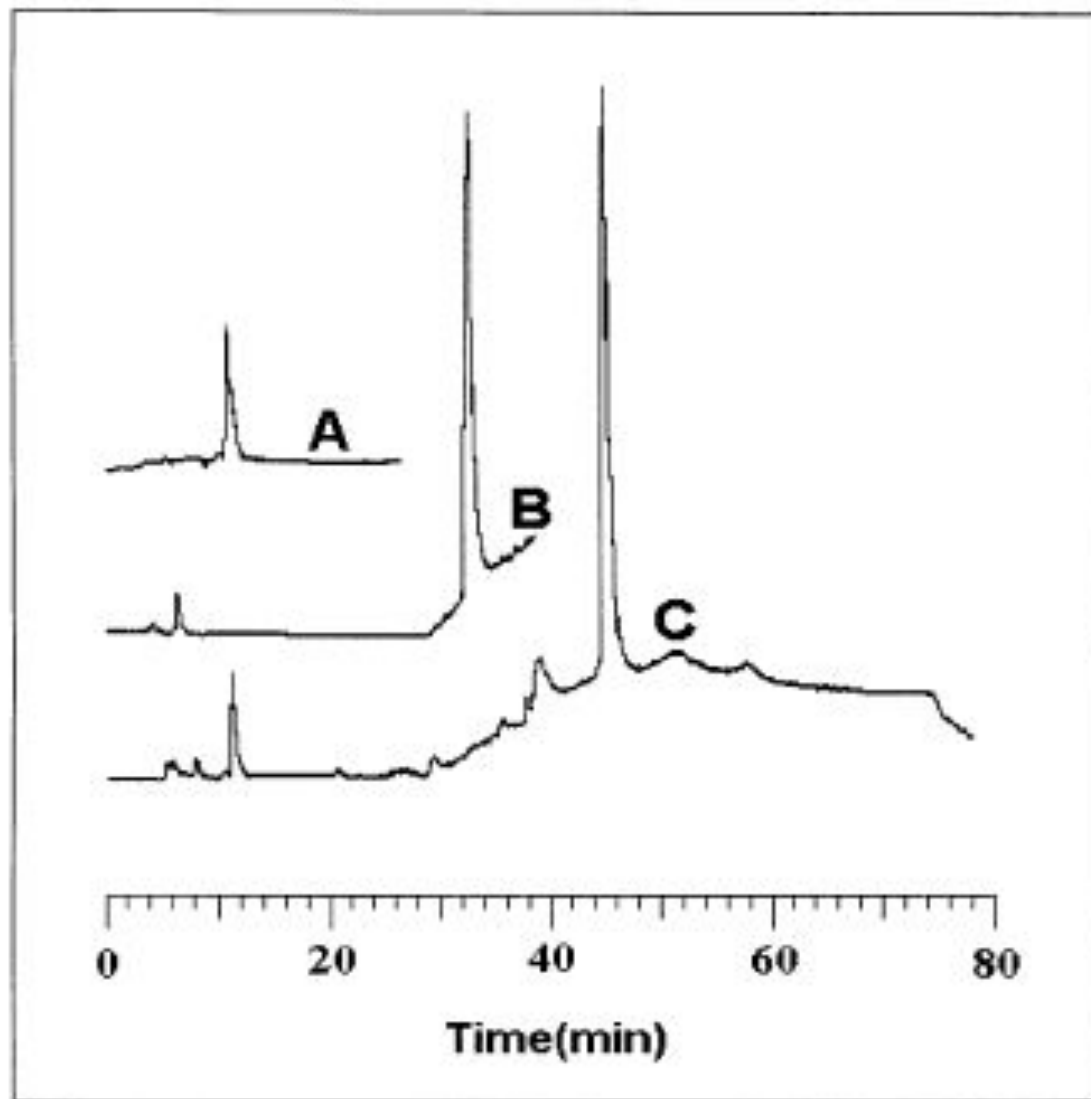
Панели (С) и (D) – БП вместе с 5  
mM baicalein и wogonin  
(флавоноиды).



# Методы $^{32}\text{P}$ после-мечения ДНК



# HPLC метод детекции аддуктов

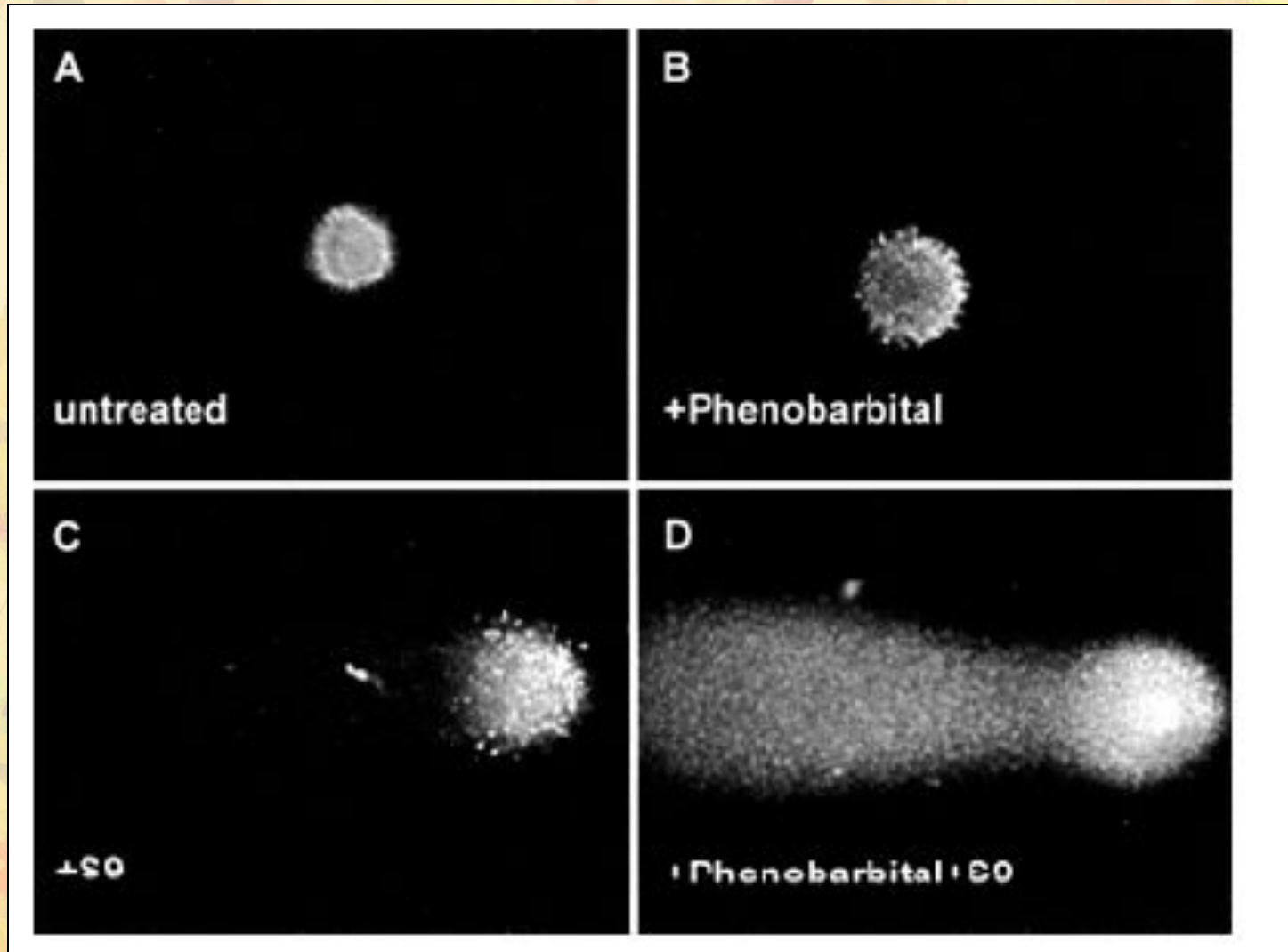


# Аддукты БП в разных органах крыс

| Per 1 mg B[a]P dose (mg) | BPDE-I-adduct (pmol/mg) |                          |                 |                |                |                  |               |                 |
|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------|----------------|----------------|------------------|---------------|-----------------|
|                          |                         | Heart                    | Lung            | Spleen         | Kidney         | Stomach          | Brain         | Liver           |
| DNA                      | 0.33                    | 3.12 ± 1.34 <sup>a</sup> | 4.42 ± 0.94     | 1.28 ± 0.44    | 7.98 ± 1.07    | 11.63 ± 6.78     | 0.96 ± 0.66   | 19.16 ± 1.99    |
|                          | 1                       | 7.68 ± 2.21              | 11.19 ± 2.96    | 3.52 ± 0.38    | 22.98 ± 3.59   | 31.06 ± 7.02     | 2.28 ± 1.19   | 52.21 ± 9.31    |
|                          | 3                       | 20.95 ± 4.68             | 26.18 ± 8.23    | 8.46 ± 1.46    | 54.64 ± 12.74  | 76.43 ± 11.27    | 5.87 ± 3.17   | 126.08 ± 17.35  |
| Protein                  | 0.33                    | 7.57 ± 1.17              | 32.95 ± 3.48    | 4.36 ± 0.62    | 23.49 ± 7.83   | 46.53 ± 3.44     | 1.72 ± 0.61   | 53.32 ± 1.37    |
|                          | 1                       | 19.07 ± 2.61             | 87.33 ± 5.78    | 11.52 ± 2.32   | 68.58 ± 6.92   | 132.13 ± 21.42   | 4.58 ± 1.44   | 141.50 ± 4.65   |
|                          | 3                       | 54.53 ± 14.72            | 249.76 ± 18.37  | 27.41 ± 3.97   | 183.12 ± 19.46 | 358.07 ± 26.74   | 12.33 ± 5.24  | 393.37 ± 13.22  |
| Lipid                    | 0.33                    | 43.80 ± 4.52             | 193.65 ± 13.79  | 48.57 ± 2.77   | 127.44 ± 11.57 | 335.39 ± 17.29   | 14.31 ± 4.77  | 257.91 ± 11.49  |
|                          | 1                       | 117.82 ± 10.85           | 532.55 ± 29.83  | 118.50 ± 9.38  | 369.75 ± 22.55 | 784.80 ± 41.84   | 40.65 ± 10.83 | 684.44 ± 31.94  |
|                          | 3                       | 301.61 ± 29.42           | 1230.19 ± 35.72 | 311.65 ± 42.68 | 965.04 ± 84.92 | 2048.42 ± 121.65 | 96.34 ± 20.03 | 1902.71 ± 60.28 |
| TG                       | 0.33                    | 2.33 ± 1.01              | 20.95 ± 4.11    | 3.52 ± 1.07    | 16.90 ± 4.61   | 22.69 ± 10.19    | 1.29 ± 0.23   | 38.80 ± 6.31    |
|                          | 1                       | 5.42 ± 1.78              | 50.49 ± 12.52   | 8.40 ± 2.23    | 39.53 ± 10.23  | 52.42 ± 17.82    | 3.33 ± 1.19   | 88.86 ± 7.62    |
|                          | 3                       | 13.24 ± 2.91             | 112.07 ± 20.49  | 20.50 ± 4.97   | 93.31 ± 16.71  | 126.33 ± 18.67   | 8.09 ± 2.31   | 206.15 ± 13.55  |

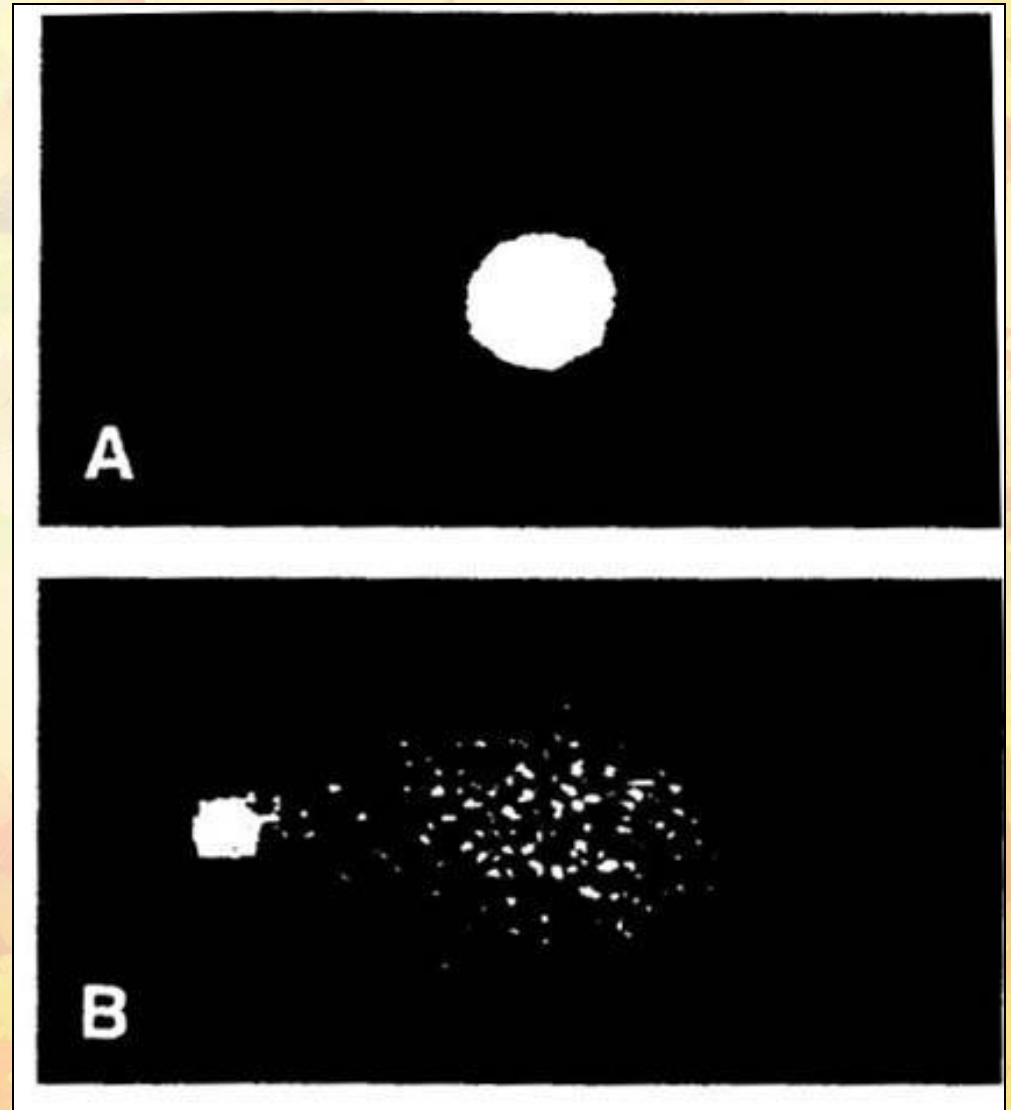
<sup>a</sup> Mean ± SD.

# Comet assay для анализа повреждений ДНК



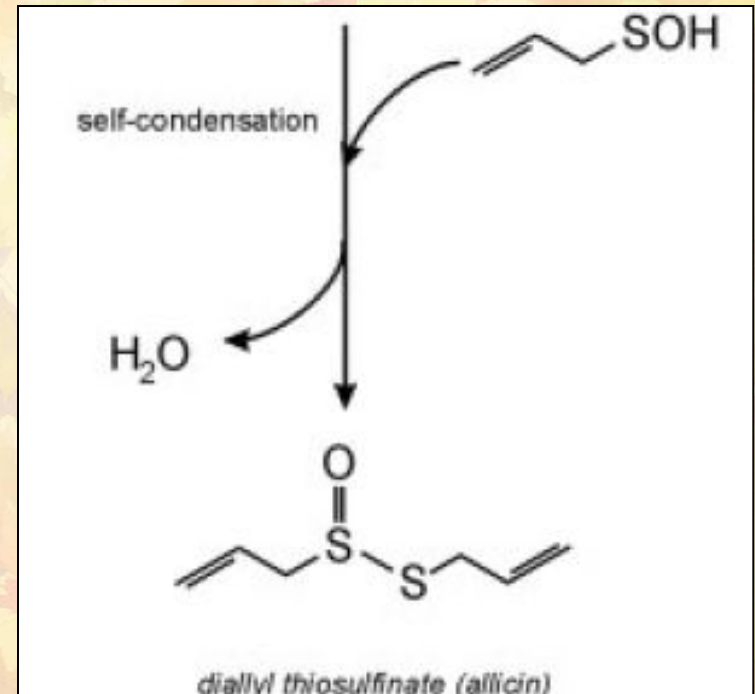
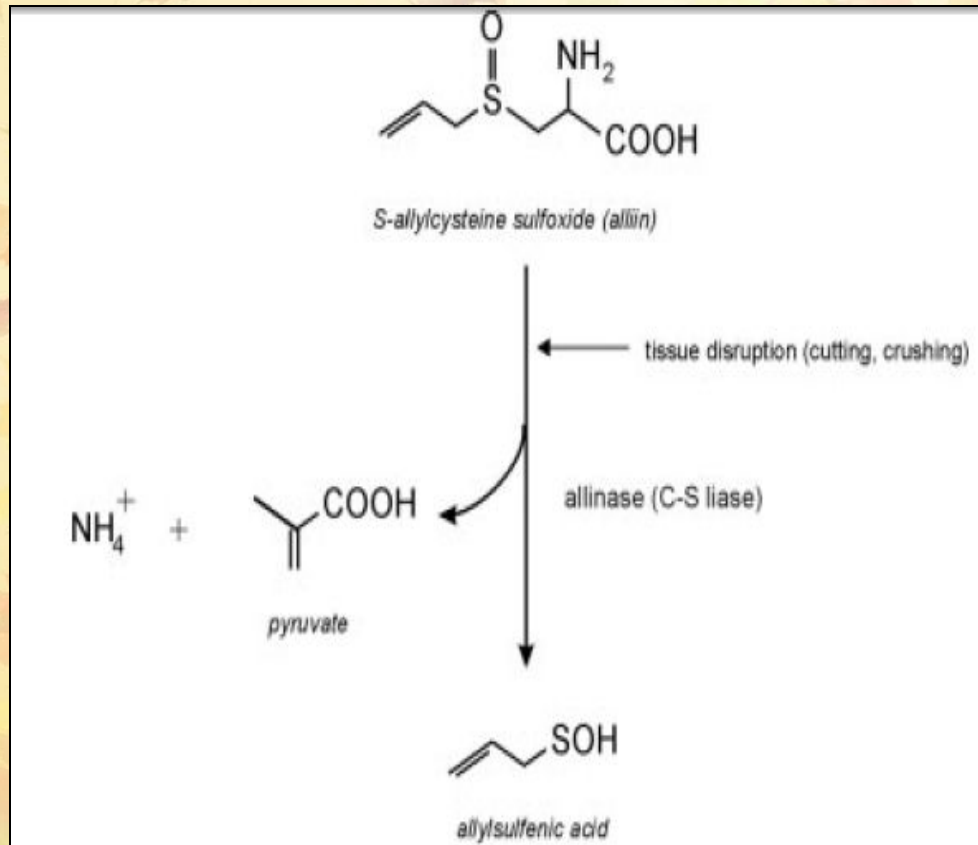
# Лимфоциты человека в comet-assay

А – контроль;  
В – после действия  
мутагена

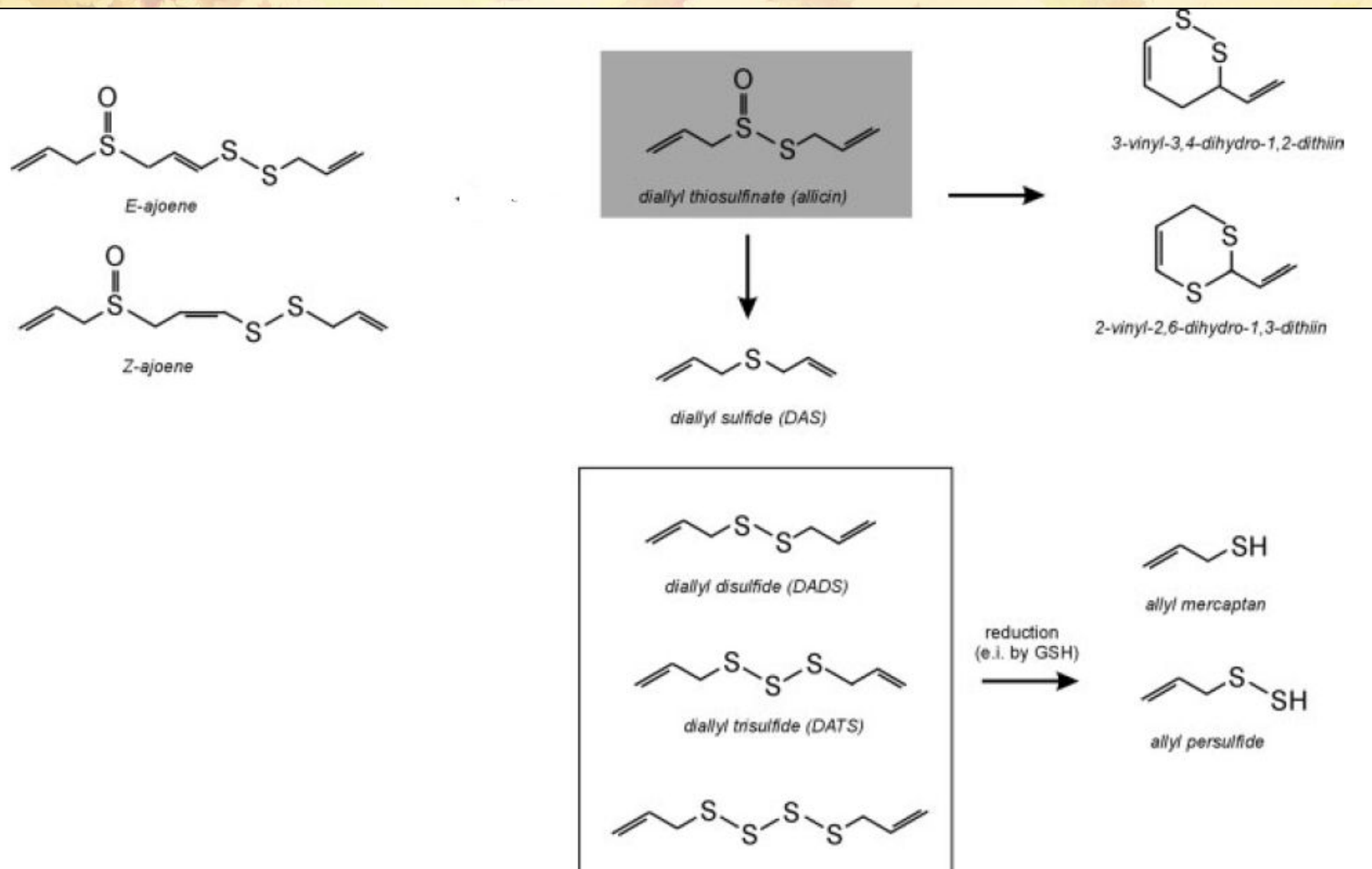


# Защита от канцерогенов

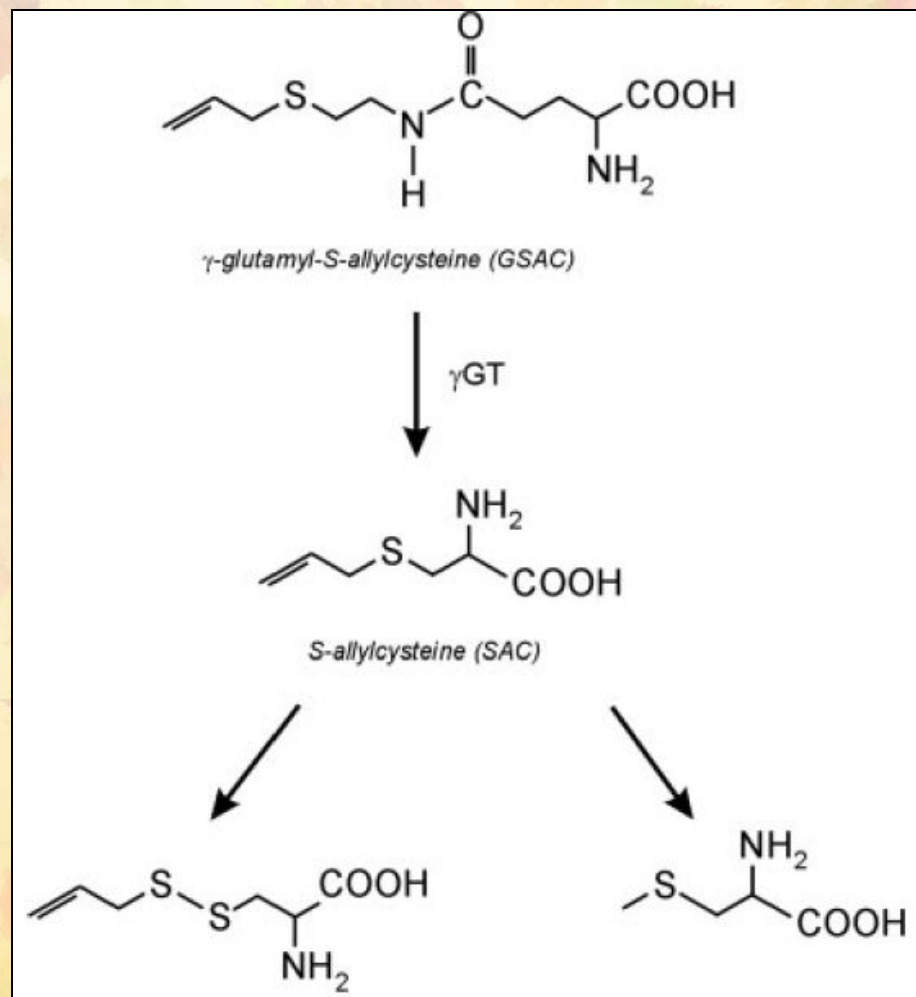
## 1. Чеснок



# Образование жирорастворимых соединений из аллицина чеснока



# Образование жирорастворимых соединений из аллицина чеснока



# Гипотеза о противораковом эффекте чеснока

- Антиоксидант
- Ингибитор активации канцерогенов (CYP2E1)
- Индуктор активности ферментов II фазы детоксификации
- Индуктор апоптоза, ингибитор клеточного цикла
- Пост-трансляционная модификация белков с образованием смешанных дисульфидов, гидроперсульфидов и трисульфидов.

# Оценка негенотоксичных канцерогенов (1)

## Tier 1:

Is there direct or indirect mutagenic action?

Use EPA guidance:

- Measurements of DNA reaction activity
- Measurements of genetic activity
- Observations of carcinogenesis in multiple sites and species

Are there reasons to suspect non-mutagenic modes of action also?

## Tier II:

Tentative categorization of non-mutagenic activity using inferences from initiation, promotion, progression bioassays:

### **Co-initiator Mode of Action**

Early administration enhances carcinogenesis from known initiator

### **Promoter Mode of Action**

Late administration enhances carcinogenesis from known initiator

### **Progressor Mode of Action**

Enhances survival or growth of transplanted tumors

### **Multi-phase**

More than one mode of action observed

# Оценка негенотоксичных канцерогенов (2)

## **Tier III:**

Create a structured description of evidence to establish a basis for risk assessment:

- Demonstrate that the agent has a specific activity within one or more of the identified “alternative” modes of action in the classification
- Describe the hypothesized “alternative” mode of action with detail including a pathway with measured biomarker(s).
- Find theoretical and empirical relationships between dose of the agent and one or more biomarkers related to the mode of action
- Identify relationship between biomarker(s) and tumor incidence
- Observe reductions of tumor incidence related to specific inhibition of processes signaled by the biomarker(s)

## **Tier IV:**

Put quantitative assessments in a risk, variability, uncertainty frame:  
Note that:

- There may be substantial inter-individual variability in some mode of action mechanisms.
- When there is significant uncertainty about mode of action, less likely but higher risk possibilities should not be neglected.

# Часть III. Механизмы мутагенеза

- Мутации делятся на:  
генные и хромосомные  
спонтанные и индуцированные  
герминальные и соматические

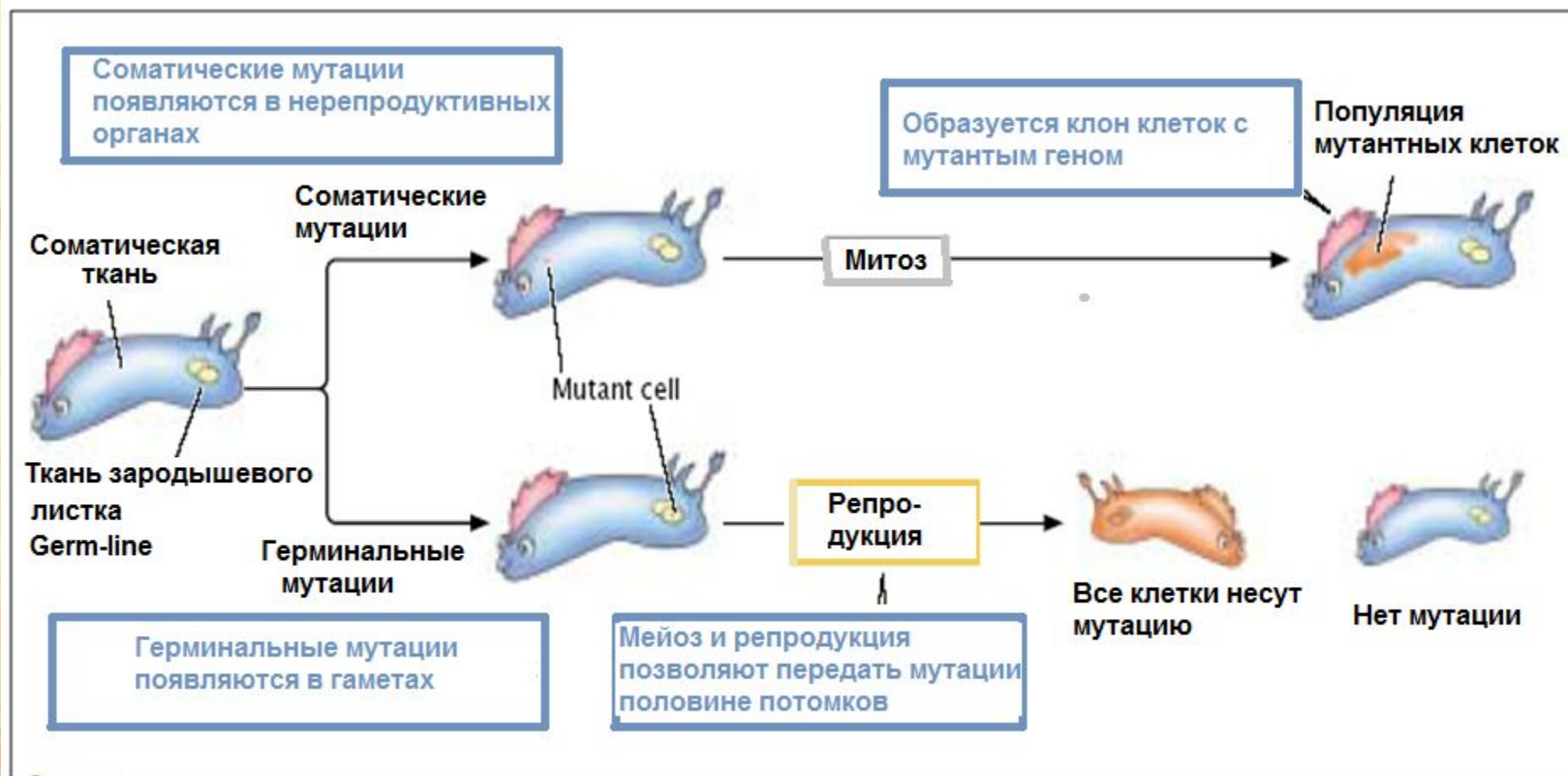
**Трансзиция** – замена пур → пур или  
пир → пир (АТ → ГЦ; ТА → ЦГ и т.д.)

**Трансверсия** – замена пур → пир и  
наоборот (АТ → ТА; ГЦ → ЦА и т.д.)

# Типы мутаций

- Хромосомные: транслокации, амплификации и т.д.
- Генные:
  1. Замена оснований (20% спонтанных мутаций)
  2. Сдвиг рамки считывания (делеция, инсерция)

# Соматические и герминальные мутации



# Типы генных мутаций

**Original DNA sequence**

GGG AGT GTA GAT CGT

**(a) Base substitution**

GGG AGT **GCA** GAT CGT

One codon changed

A base substitution alters a single codon.

**(b) Insertion**

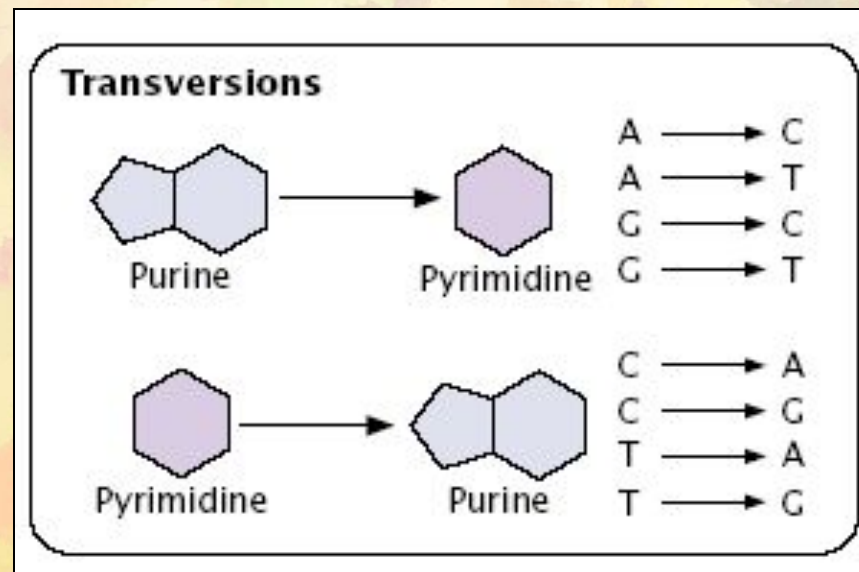
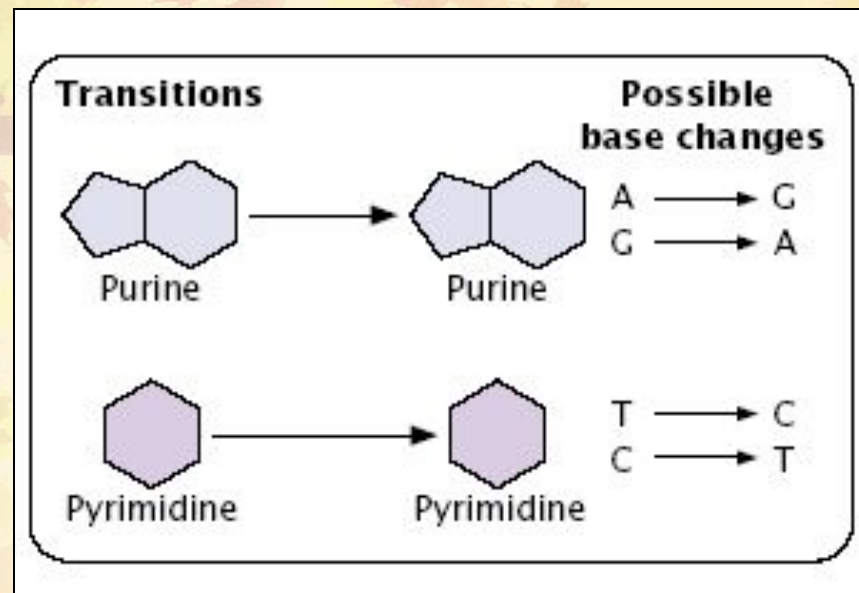
GGG AGT **GT**T**** AGA TCG T

**(c) Deletion**

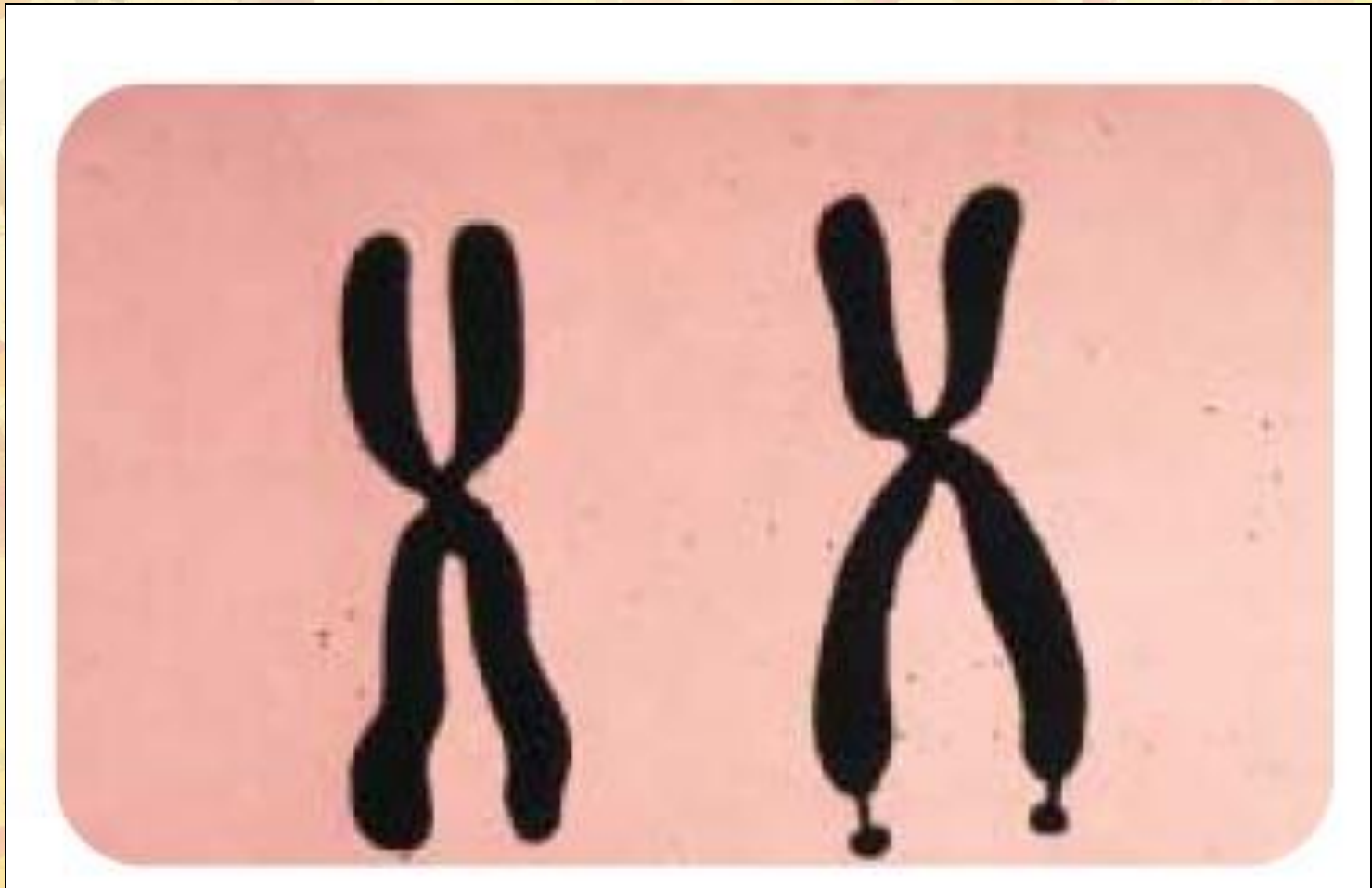
GGG AGT **GAG** ATC GTC

An insertion or a deletion alters the reading frame and may change many codons.

# Транзиция и трансверсия



# Пример хромосомной мутации (X-хромосома)



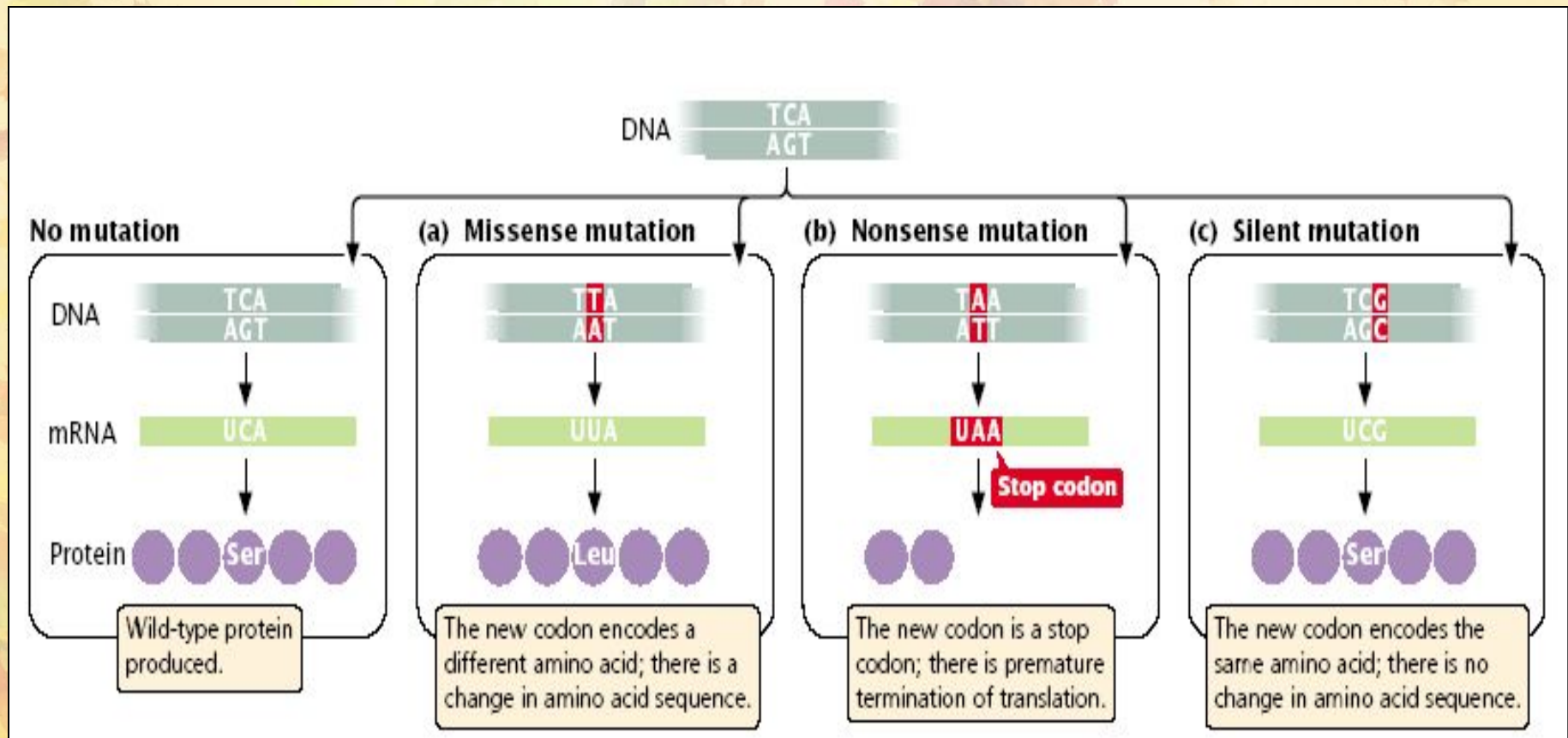
# Примеры генетических болезней, вызванных увеличением тринуклеотидных повторов

| Disease                                             | Repeated Sequence | Number of Copies of Repeat |               |
|-----------------------------------------------------|-------------------|----------------------------|---------------|
|                                                     |                   | Normal Range               | Disease Range |
| Spinal and bulbar muscular atrophy                  | CAG               | 11–33                      | 40–62         |
| Fragile-X syndrome                                  | CGG               | 6–54                       | 50–1500       |
| Jacobsen syndrome                                   | CGG               | 11                         | 100–1000      |
| Spinocerebellar ataxia (several types)              | CAG               | 4–44                       | 21–130        |
| Autosomal dominant cerebellar ataxia                | CAG               | 7–19                       | 37–~220       |
| Myotonic dystrophy                                  | CTG               | 5–37                       | 44–3000       |
| Huntington disease                                  | CAG               | 9–37                       | 37–121        |
| Friedreich ataxia                                   | GAA               | 6–29                       | 200–900       |
| Dentatorubral-pallidoluysian atrophy                | CAG               | 7–25                       | 49–75         |
| Myoclonus epilepsy of the Unverricht-Lundborg type* | CCCGCCCGCG        | 2–3                        | 12–13         |



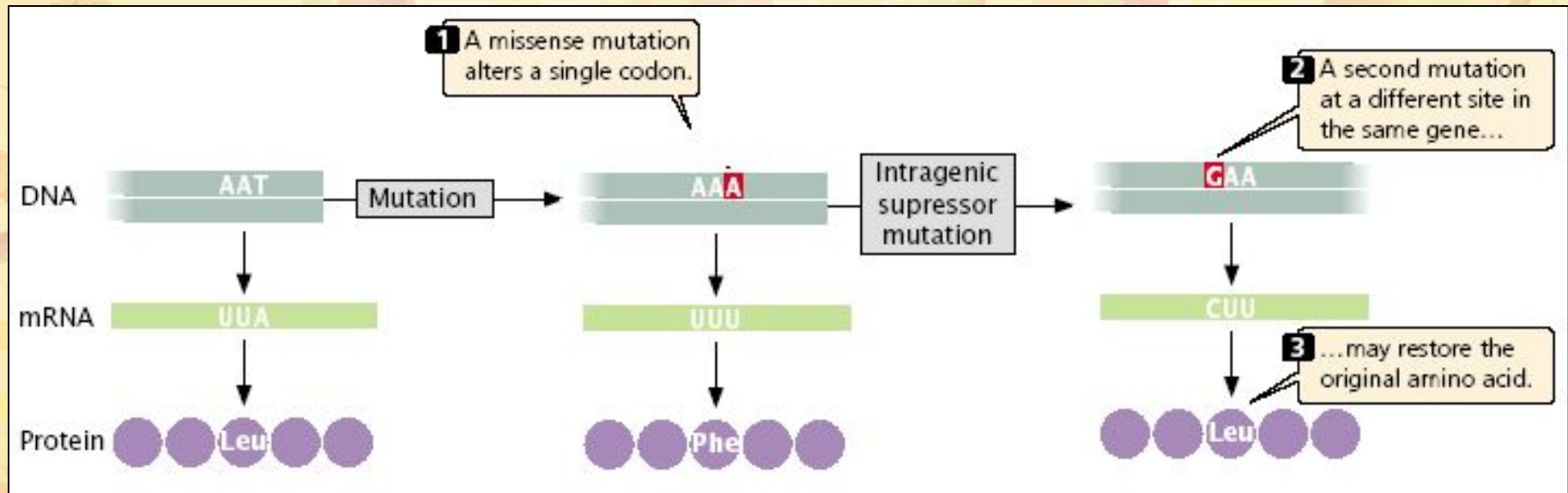
# Замена оснований может вызывать

- (a) миссенс
- (b) нонсенс,
- (c) сайленс мутации

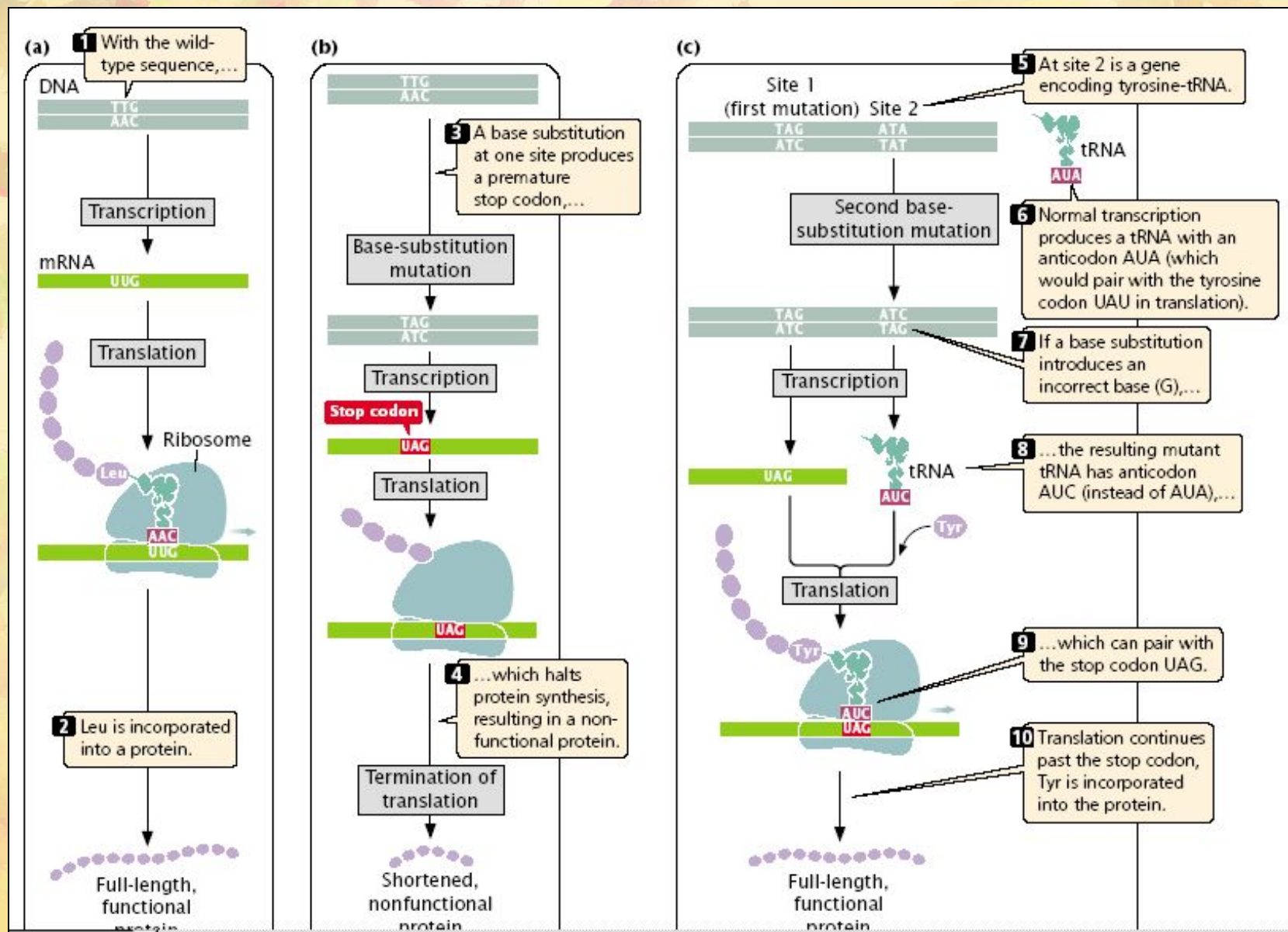


# Супрессорные мутации

## 1. Внутригенные



## 2. Межгенные



# Частота мутаций разных генов

| Organism                 | Mutation                                | Rate                  | Unit              |
|--------------------------|-----------------------------------------|-----------------------|-------------------|
| Bacteriophage T2         | Lysis inhibition                        | $1 \times 10^{-8}$    | Per replication   |
|                          | Host range                              | $3 \times 10^{-9}$    |                   |
| <i>Escherichia coli</i>  | Lactose fermentation                    | $2 \times 10^{-7}$    | Per cell division |
|                          | Histidine requirement                   | $2 \times 10^{-8}$    |                   |
| <i>Neurospora crassa</i> | Inositol requirement                    | $8 \times 10^{-8}$    | Per asexual spore |
|                          | Adenine requirement                     | $4 \times 10^{-8}$    |                   |
| Corn                     | Kernel color                            | $2.2 \times 10^{-6}$  | Per gamete        |
| <i>Drosophila</i>        | Eye color                               | $4 \times 10^{-5}$    | Per gamete        |
|                          | Allozymes                               | $5.14 \times 10^{-6}$ |                   |
| Mouse                    | Albino coat color                       | $4.5 \times 10^{-5}$  | Per gamete        |
|                          | Dilution coat color                     | $3 \times 10^{-5}$    |                   |
| Human                    | Huntington disease                      | $1 \times 10^{-6}$    | Per gamete        |
|                          | Achondroplasia                          | $1 \times 10^{-5}$    |                   |
|                          | Neurofibromatosis (Michigan)            | $1 \times 10^{-4}$    |                   |
|                          | Hemophilia A (Finland)                  | $3.2 \times 10^{-5}$  |                   |
|                          | Duchenne muscular dystrophy (Wisconsin) | $9.2 \times 10^{-5}$  |                   |

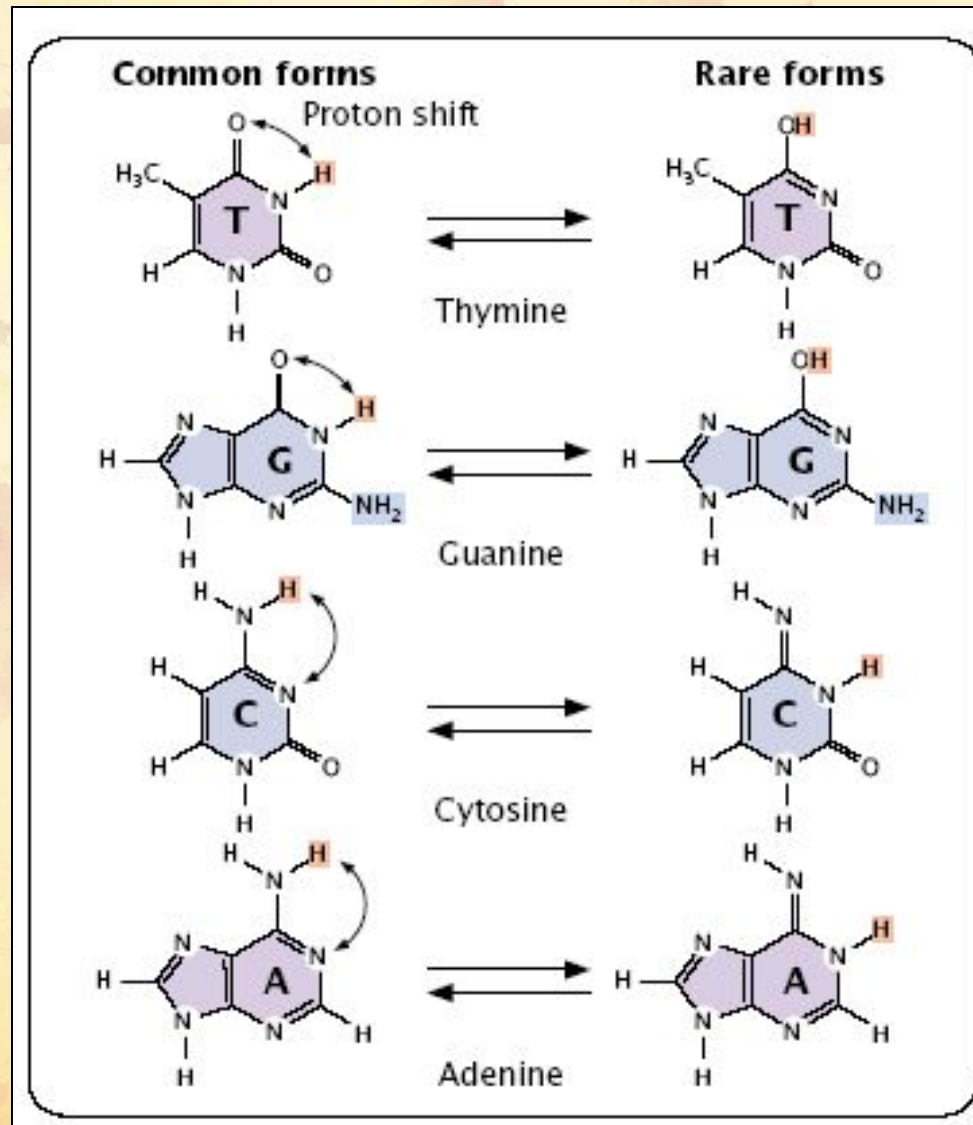
# Ахондроплазия



The background of the slide is a dense, repeating pattern of autumn leaves. The leaves are in various shades of yellow, orange, and red, with some green still visible, suggesting a transition from summer to autumn. They are scattered across the entire surface, creating a textured, organic feel.

# **I. Механизмы спонтанного мутагенеза**

# Таутомерные формы оснований и нарушение спаривания



### Standard base-pairing arrangements



Thymine (common form)

Adenine (common form)



Cytosine (common form)

Guanine (common form)

### Anomalous base-pairing arrangements



Cytosine (rare form)

Adenine (common form)

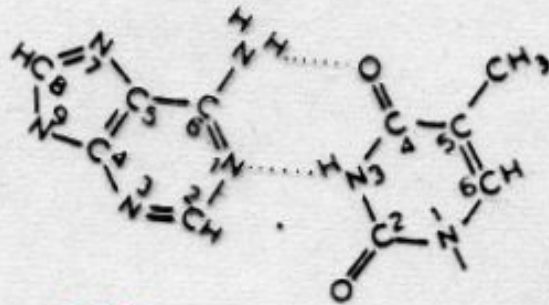


Thymine (common form)

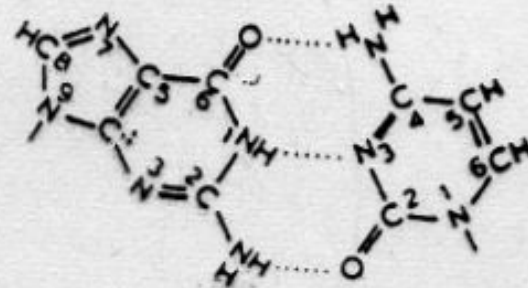
Guanine (rare form)

# Модель Уотсона-Крика спонтанного мутагенеза

Нормальное спаривание оснований

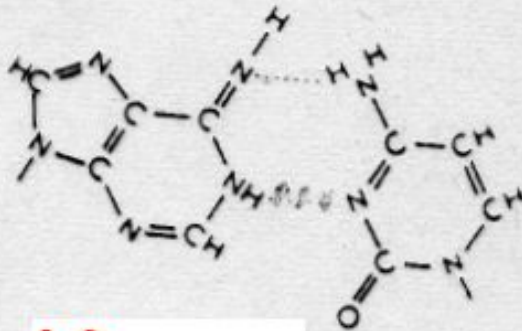


A-T

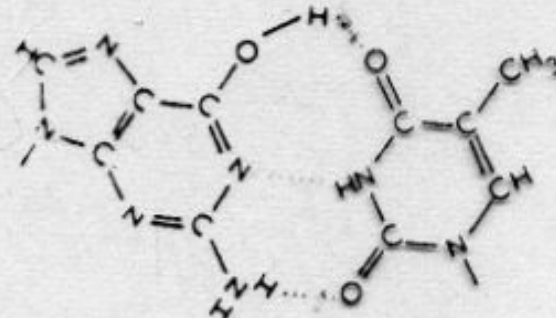


G-C

Нарушение спаривания

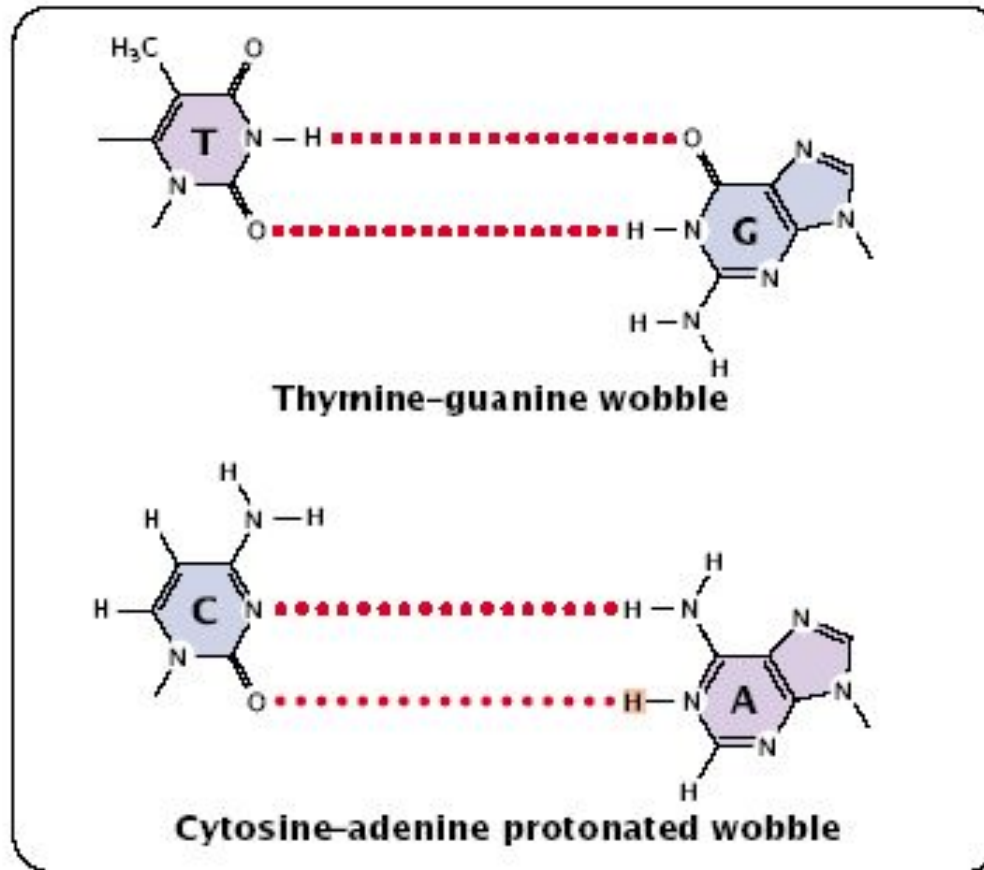


A-C



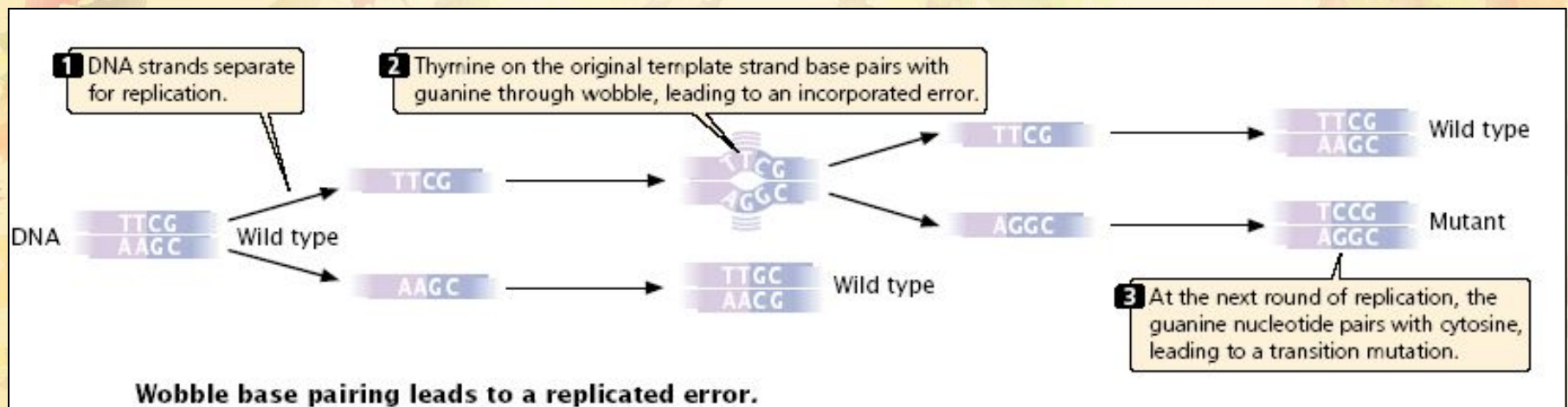
G-T

# Non-Watson-Crick base pairing

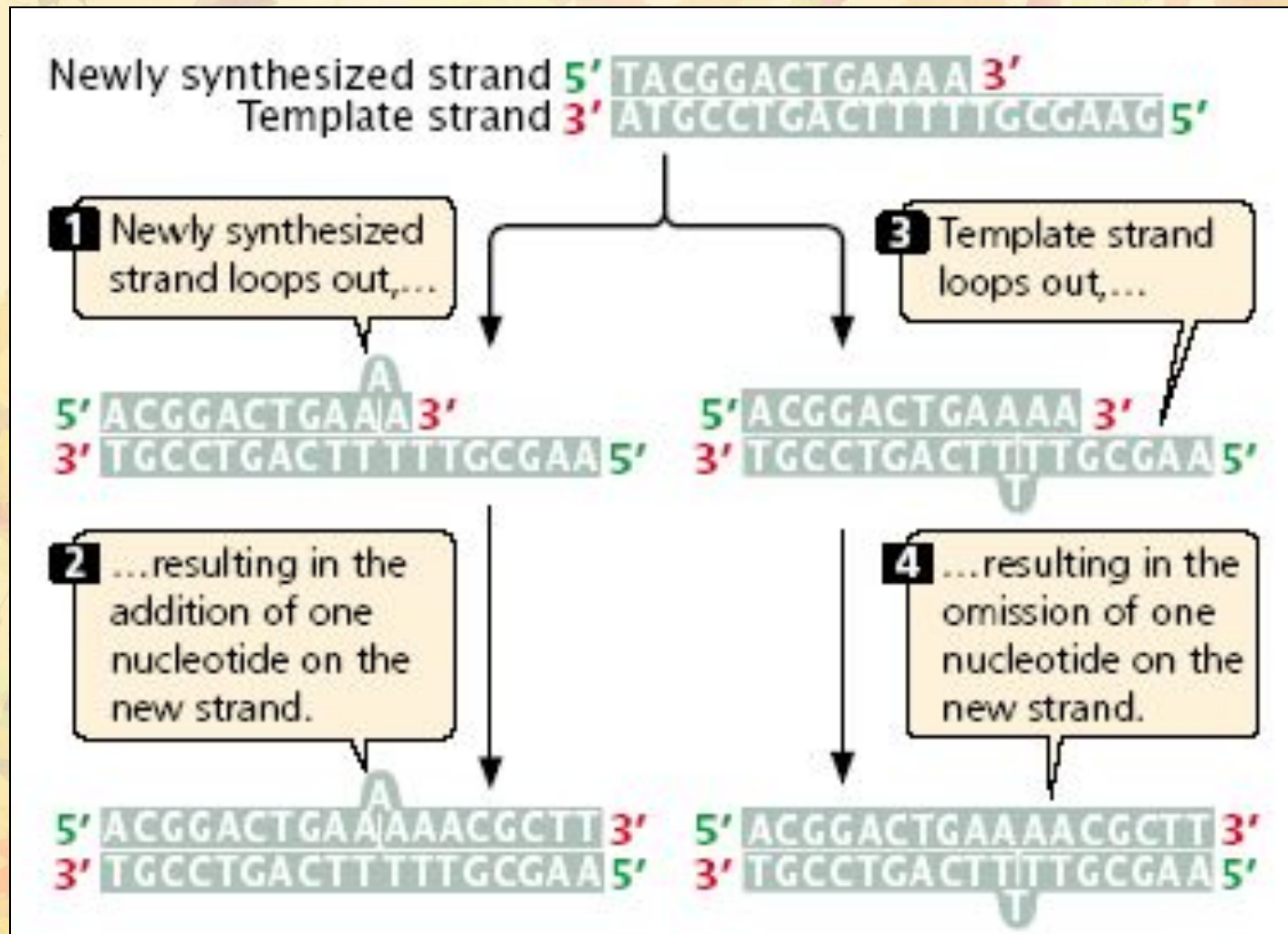


**Nonstandard base pairings can occur as a result of the flexibility in DNA structure.** Thymine and guanine can pair through wobble between normal bases. Cytosine and adenine can pair through wobble when adenine is protonated (has an extra hydrogen).

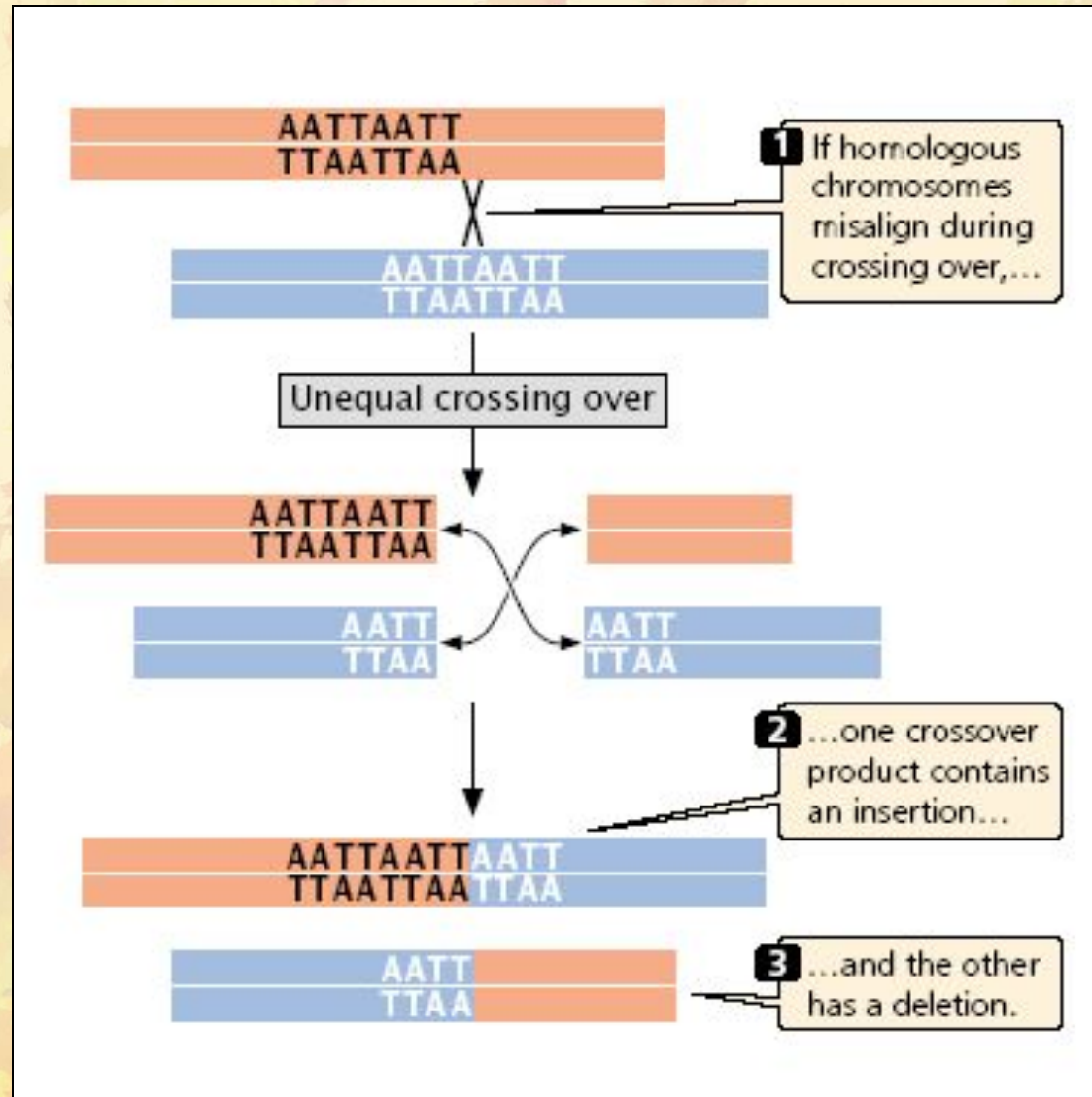
# Ошибка репликации



# Инсерции и делеции могут быть результатом отставания роста цепи при репликации

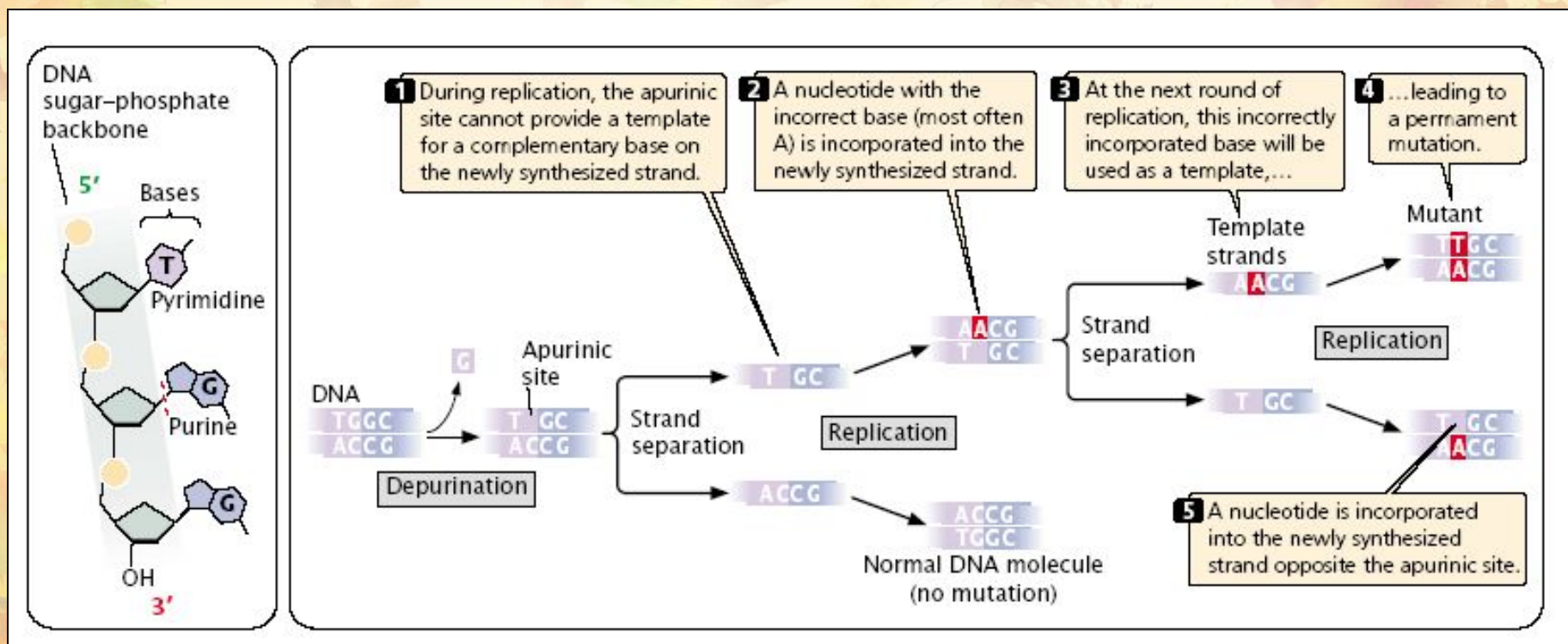


# Инсерции и делеции могут быть результатом неравного кроссинговера



# Спонтанные химические изменения ДНК

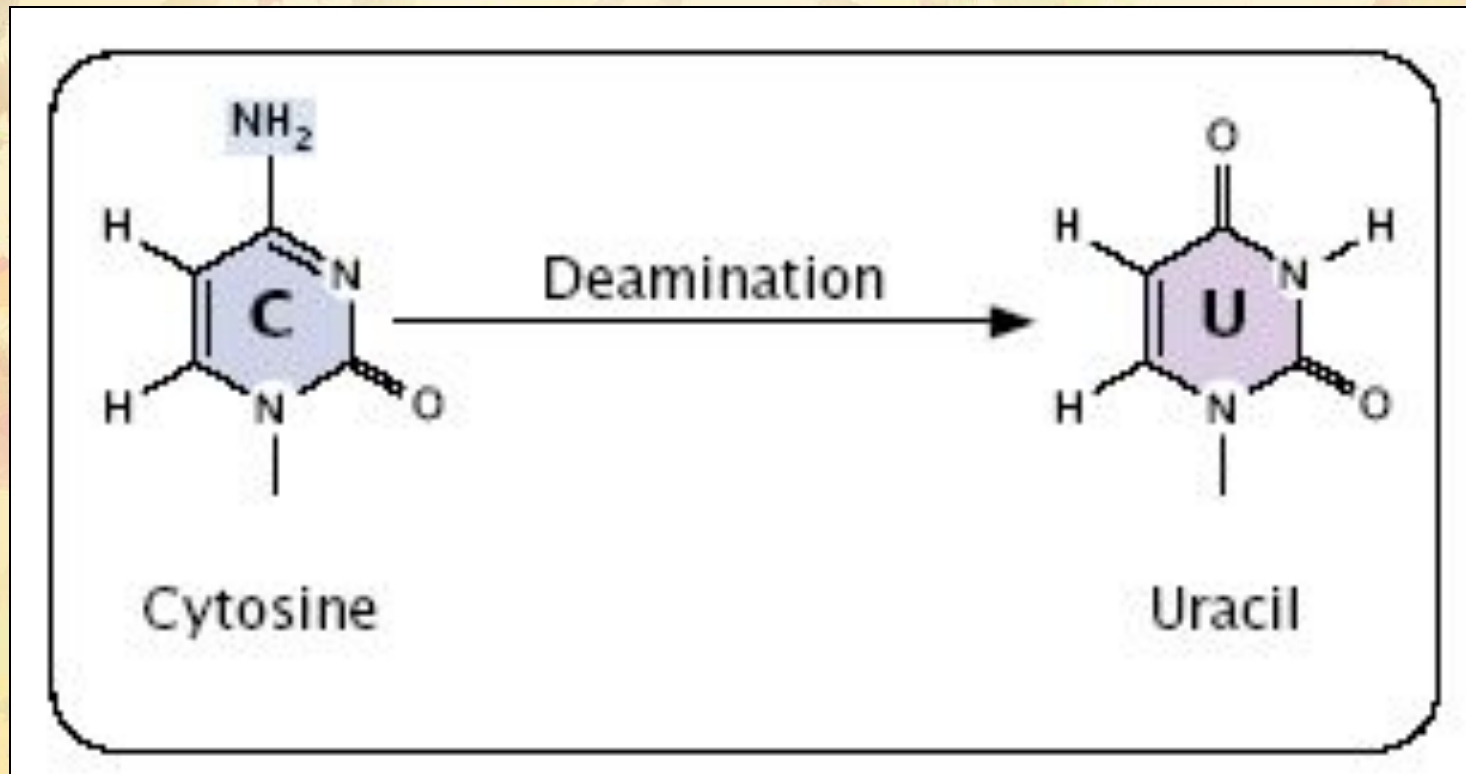
## Депуринация



# Реакции деаминирования

## 1. Цитозин

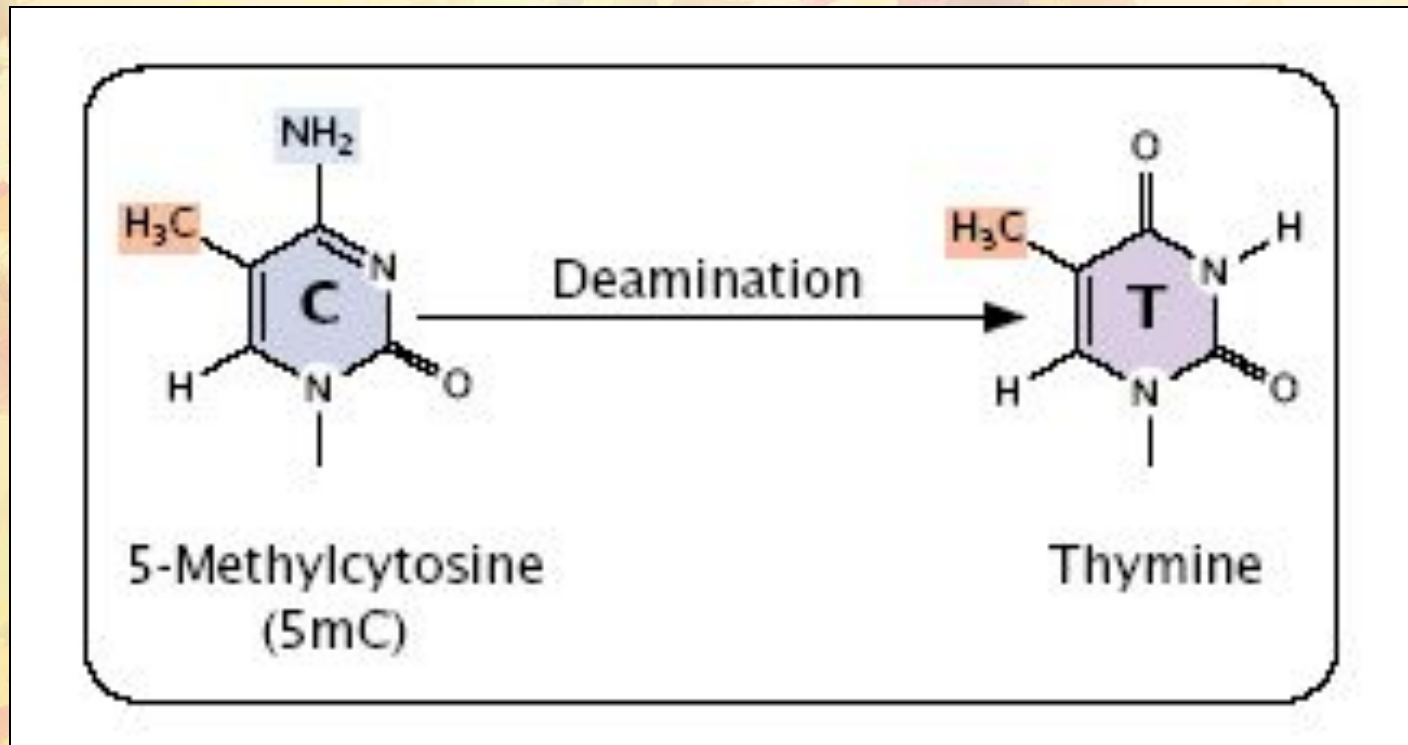
Транзиция: **CG** → **UA** → **TA**

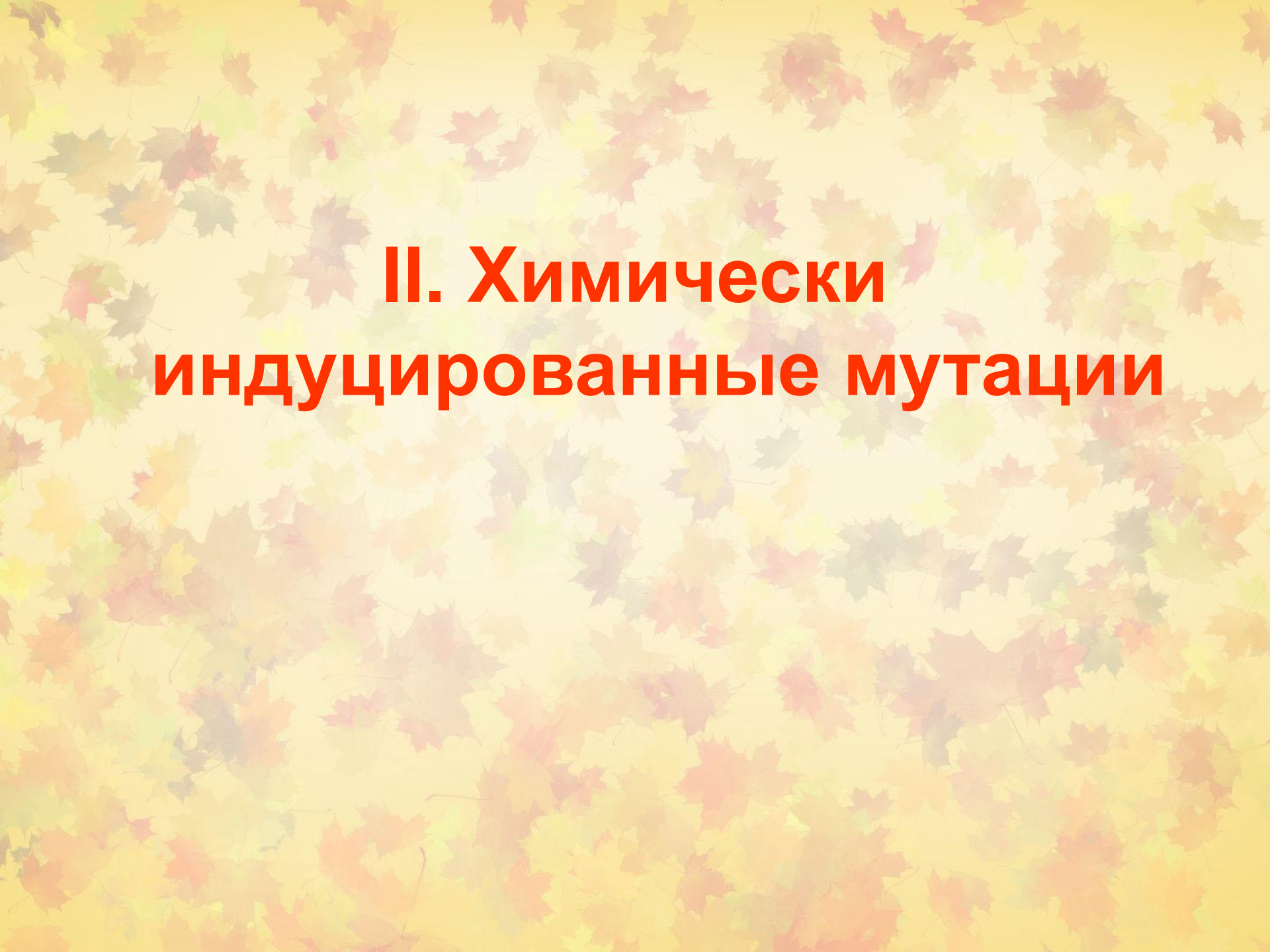


# Реакции деаминирования

## 2. 5-метилцитозин

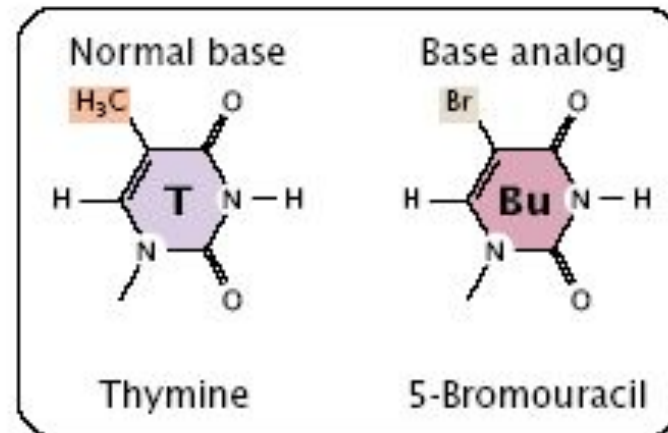
Транзиция: CG  $\rightarrow$  5mCA  $\rightarrow$  TA



The background of the slide is a dense, overlapping pattern of autumn leaves in various shades of yellow, orange, red, and brown, creating a warm and textured effect.

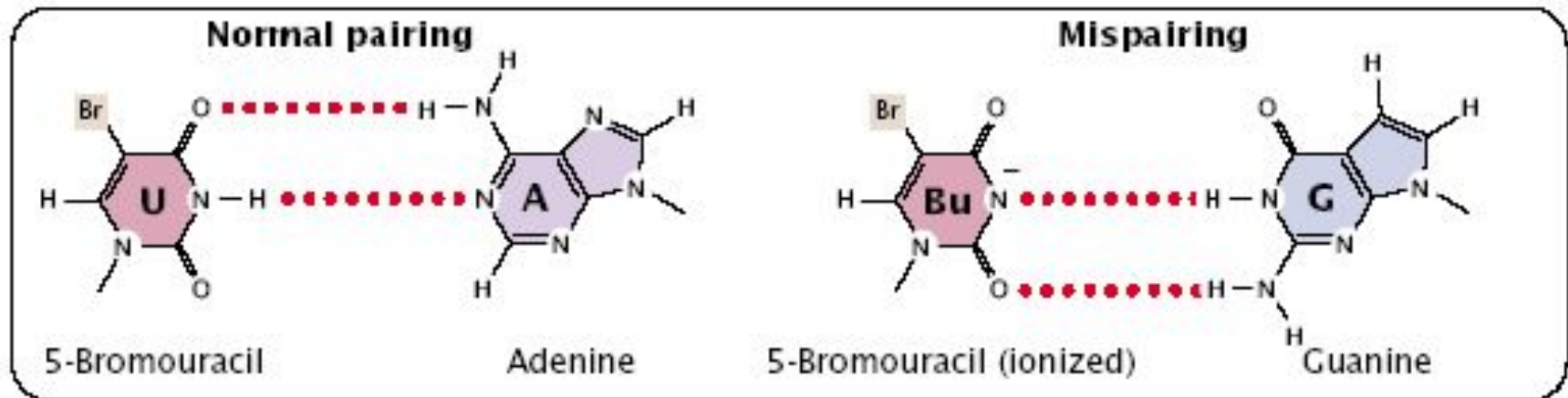
## **II. Химически индуцированные мутации**

# 1. Аналоги оснований

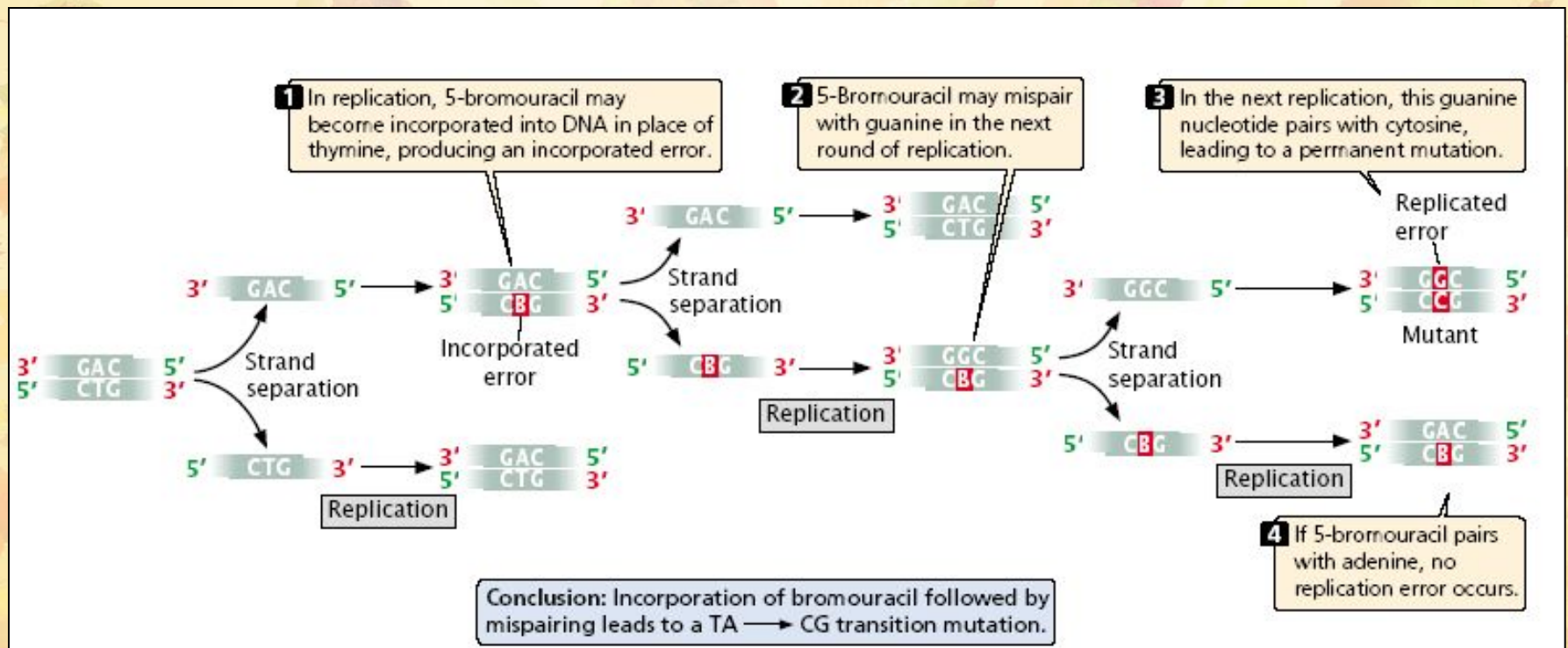


Транзиция: TA →  
5BUA → 5BUG → CG

Или: GC → G5BU →  
A5BU → AT



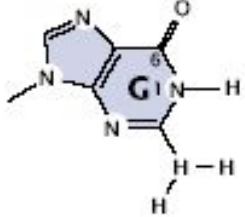
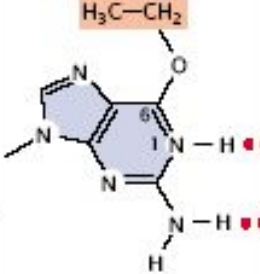
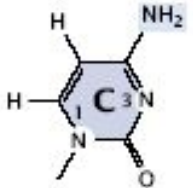
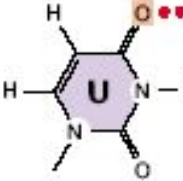
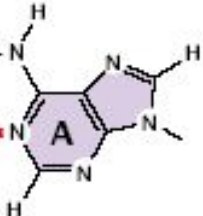
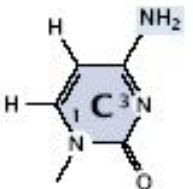
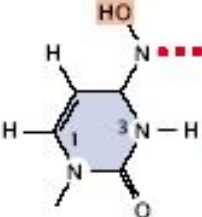
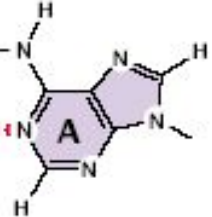
# Ошибки репликации



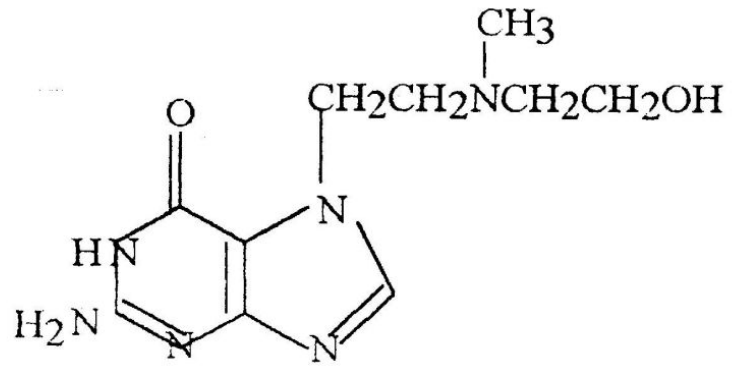
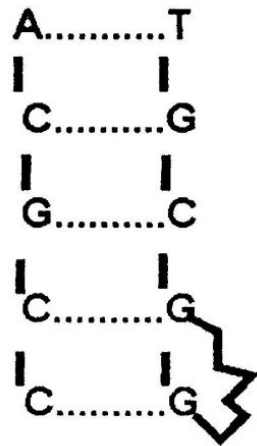
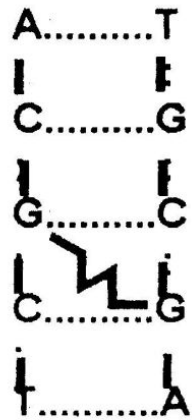
## 2. Алкилирование ДНК

- 1. Прямые алкилирующие агенты (горчичный газ, нитрозомочевина и др.)
- 2. Требующие метаболической активации (нитрозамины, ПАУ и др.)

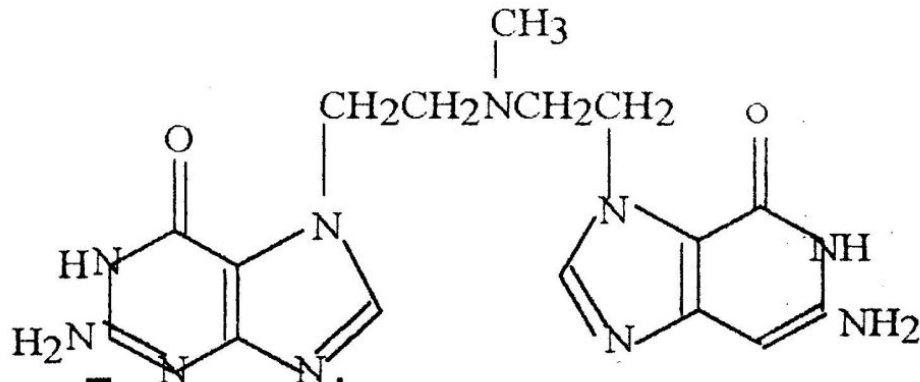
# ДНК-повреждающие агенты

|     | Original base                                                                                       | Mutagen                                 | Modified base                                                                                                        | Pairing partner                                                                                      | Type of mutation |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| (a) |  <p>Guanine</p>    | <p>EMS</p> <p>Этилметансульфонат</p>    |  <p>O<sup>6</sup>-Ethylguanine</p> |  <p>Thymine</p>   | CG → TA          |
| (b) |  <p>Cytosine</p>   | <p>Nitrous acid (HNO<sub>2</sub>)</p>   |  <p>Uracil</p>                     |  <p>Adenine</p>   | CG → TA          |
| (c) |  <p>Cytosine</p> | <p>Hydroxylamine (NH<sub>2</sub>OH)</p> |  <p>Hydroxylamino-cytosine</p>   |  <p>Adenine</p> | CG → TA          |

### Образование поперечных сшивок в ДНК при взаимодействии с ипритом

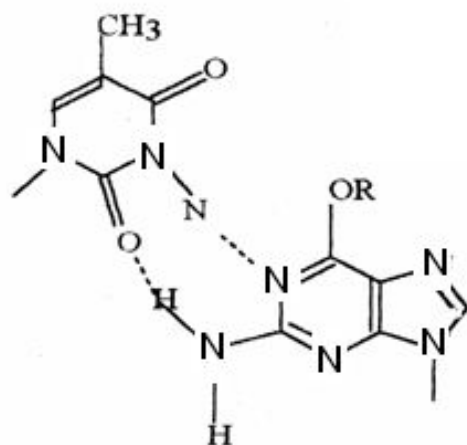


### Продукт моноалкилирования ДНК



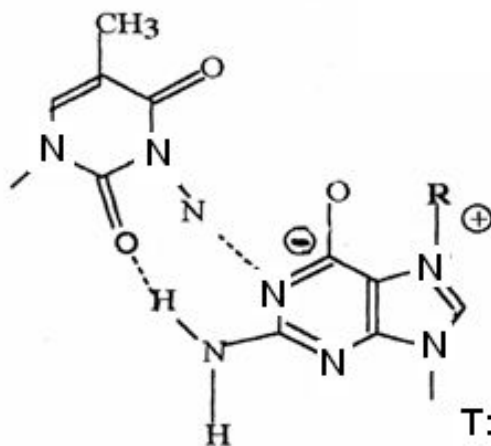
### Продукт дифункционального алкилирования ДНК

# Нарушение спаривания алкилированного гуанина (модель Уотсона-Крика)



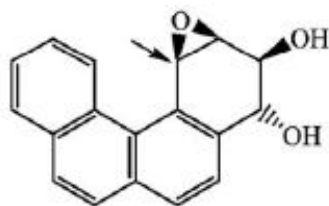
T: O<sup>6</sup>T

Трансзиция: GC-AT

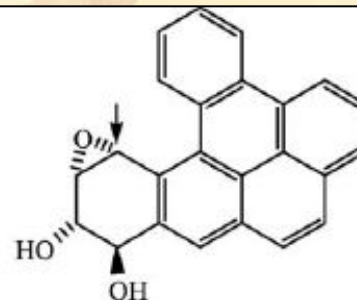


T: N<sup>7</sup> алкилG

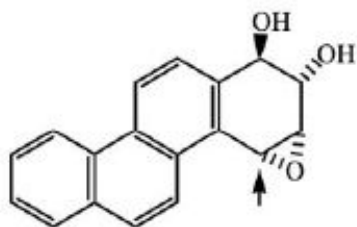
# 3. Аралкилирование ДНК



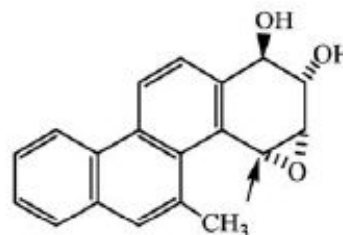
*3S,4R,1R,2S*-BcPh-diol epoxide



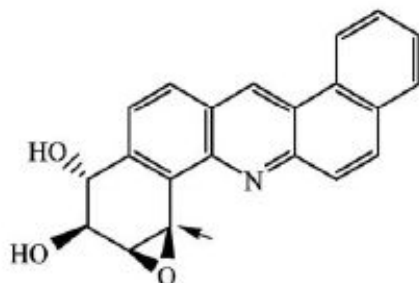
*11R,12S,13S,14R*-DB[a,l]P-diol epoxide



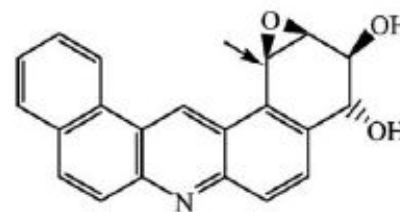
*1R,2S,3S,4R*-CHR-diol epoxide



*1R,2S,3S,4R*-5MC-diol epoxide



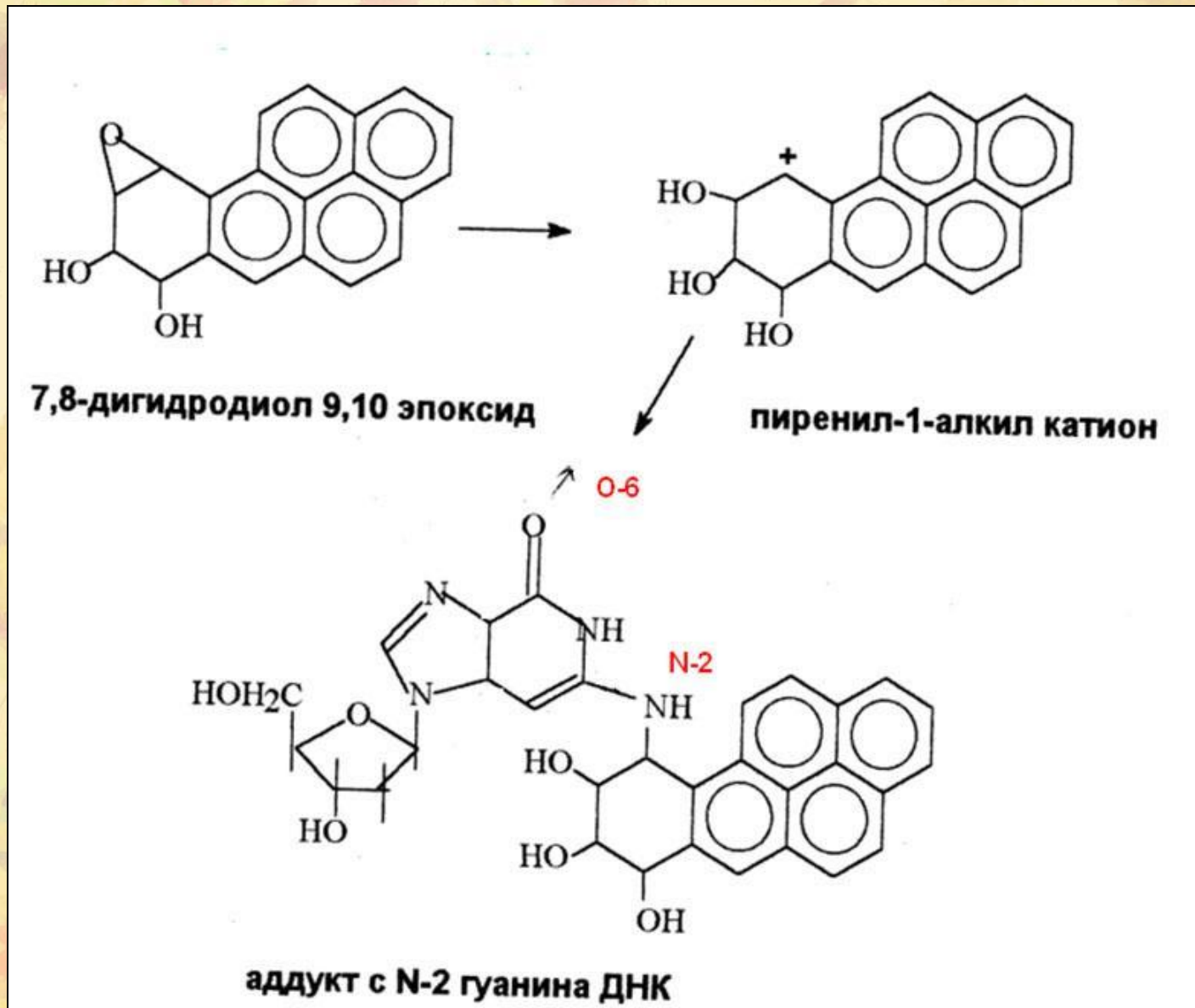
*10S,11R,8R,9S*-DB[a,h]A-diol epoxide

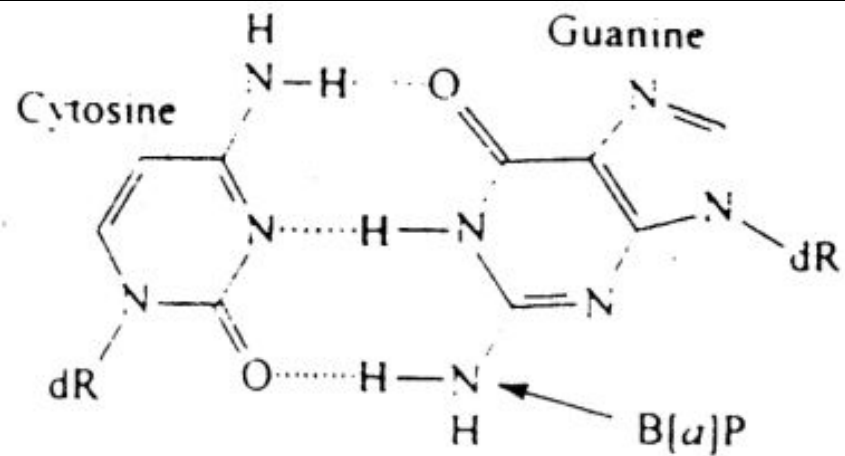


*3S,4R,1R,2S*-DB[a,j]A-diol epoxide

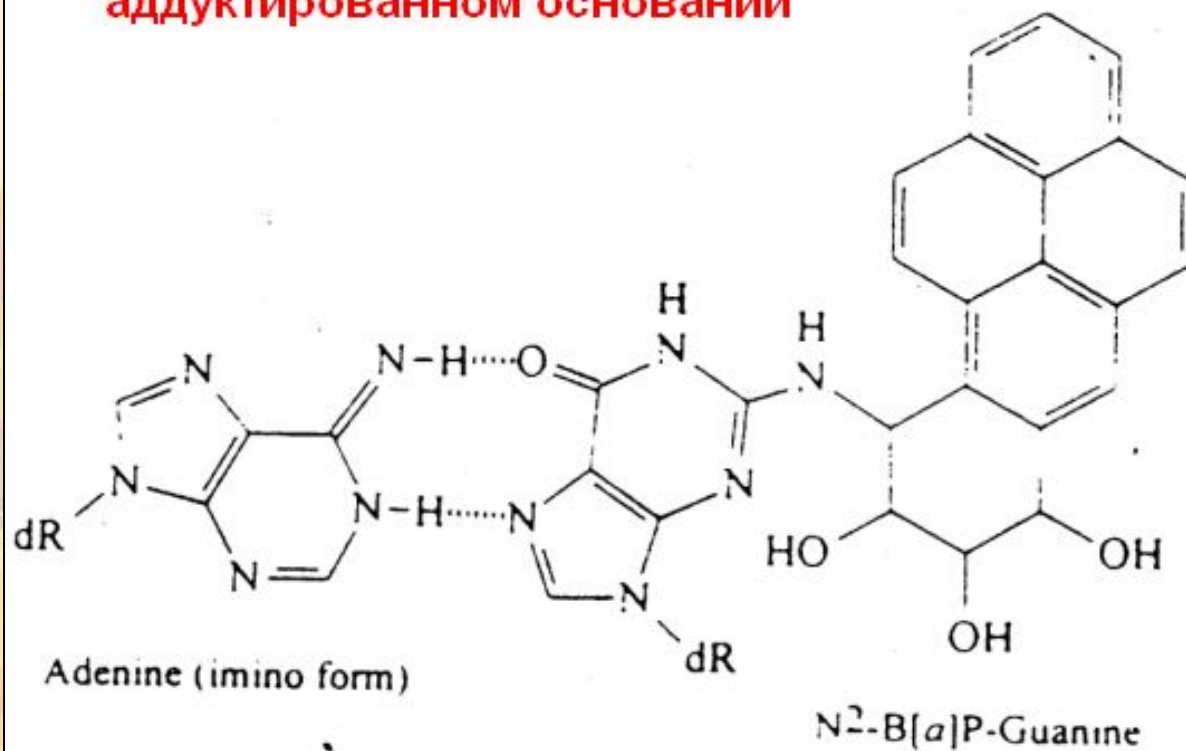
**Примеры энантиомеров эпоксидов В-области ПАУ-соединений**

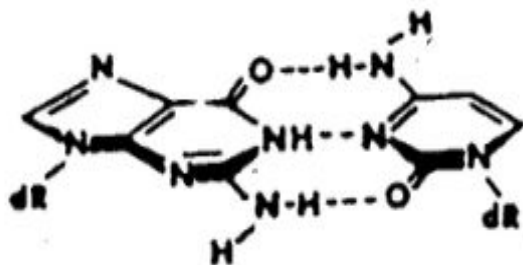
# Образование аддуктов бензо(а)пирена с ДНК



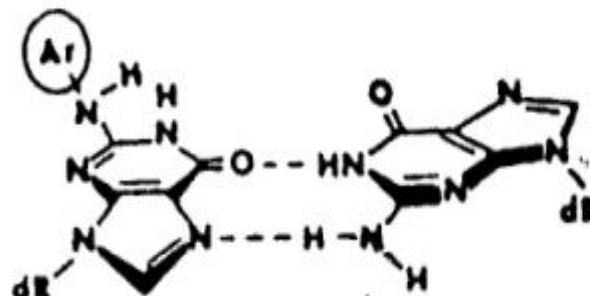


**Нарушение спаривания при  
аддуктированном основании**

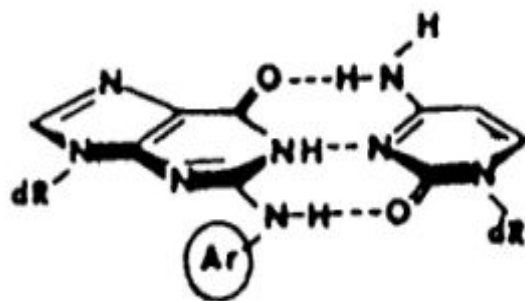




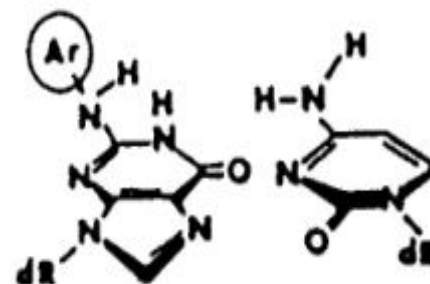
Нормальное GC  
спаривание



Syn N-2-Ar-GC спаривание.  
Вызывает GC → CG трансверсию



Анти N-2-Ar-GC спаривание



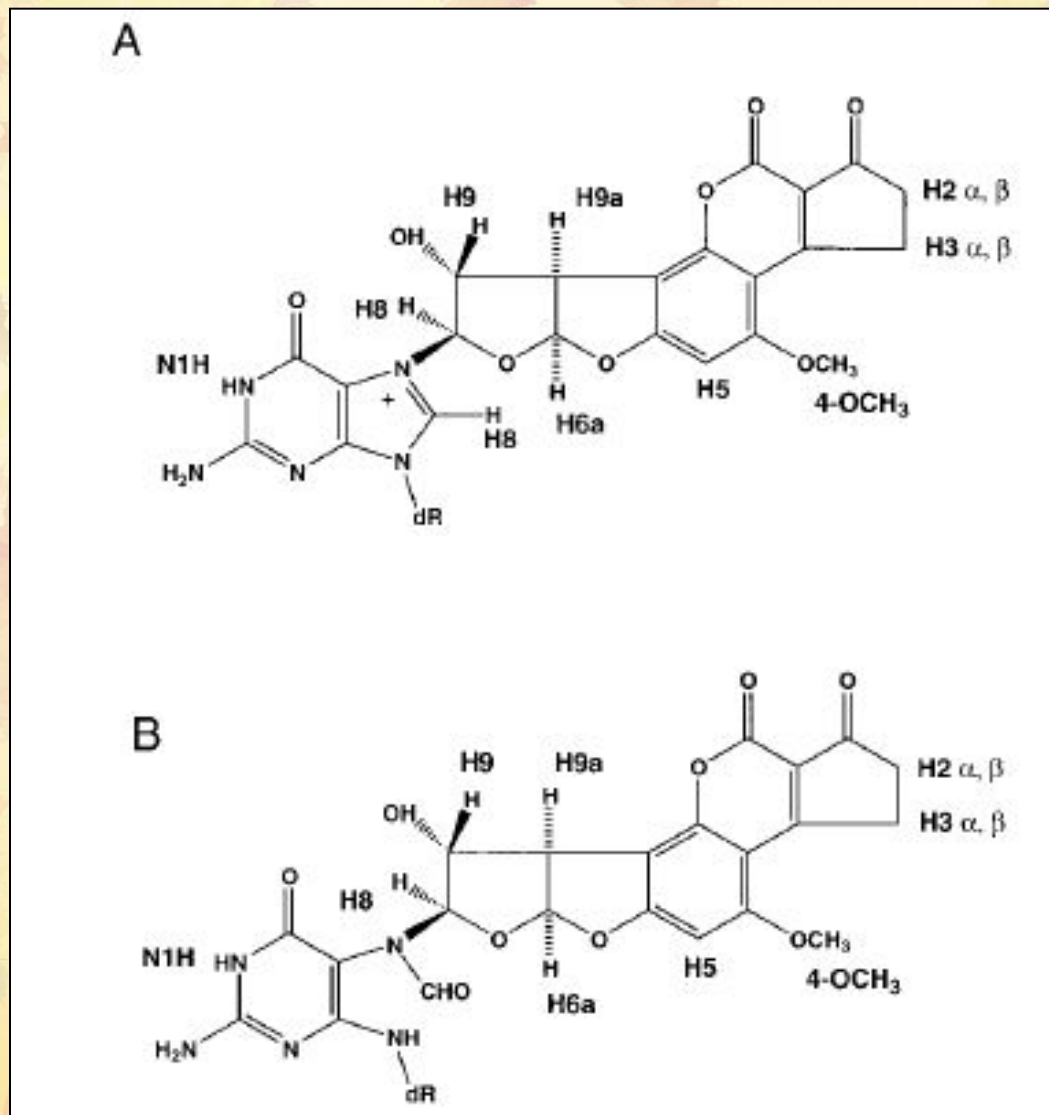
Syn N-2-Ar-G, C неспаривание  
вызывает делецию

Специфические мутации, вызванные N-2- аддуктами

The background of the slide is a dense, repeating pattern of autumn leaves in various shades of yellow, orange, and red, creating a warm and textured effect.

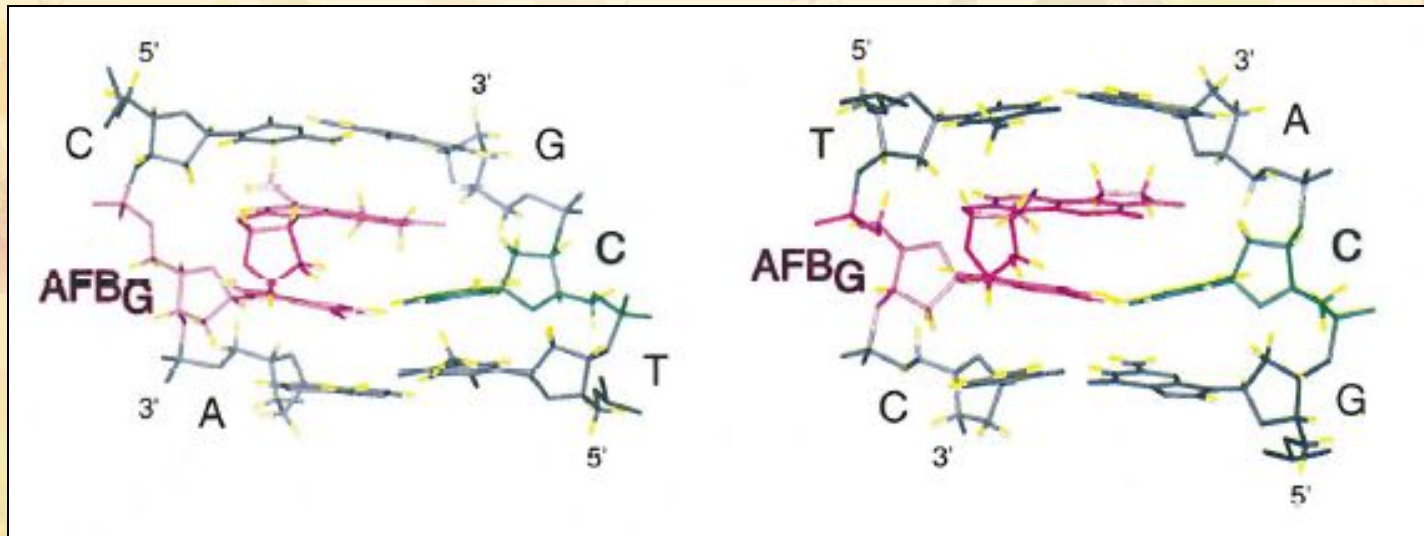
# **4. Аддукты с Афлатоксином В1**

# Структуры АFB1-гуанин N7- катионных и GАРУ-повреждений.



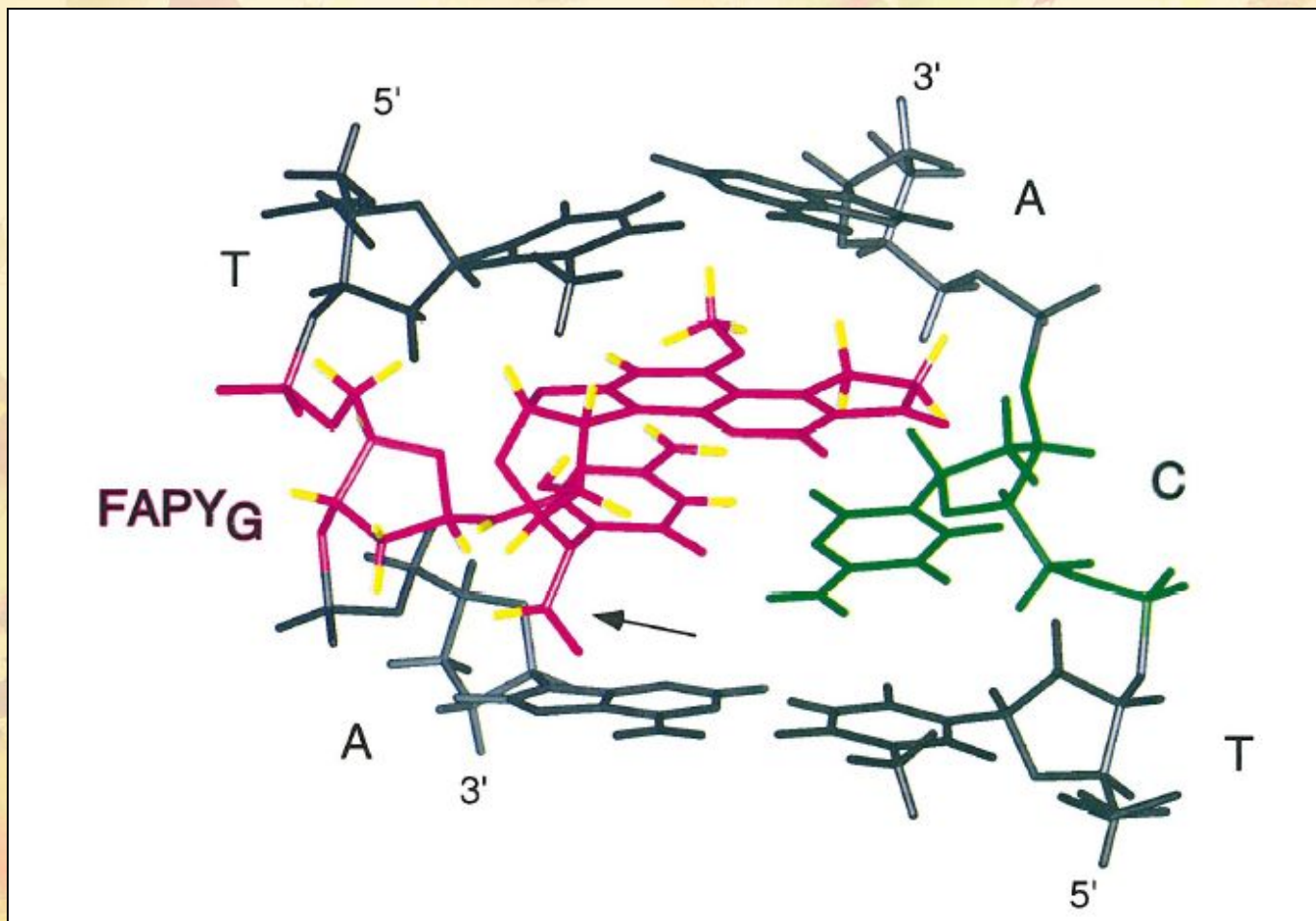
# Аддукты с Афлатоксином В1

G  $\longrightarrow$  T трансверсия

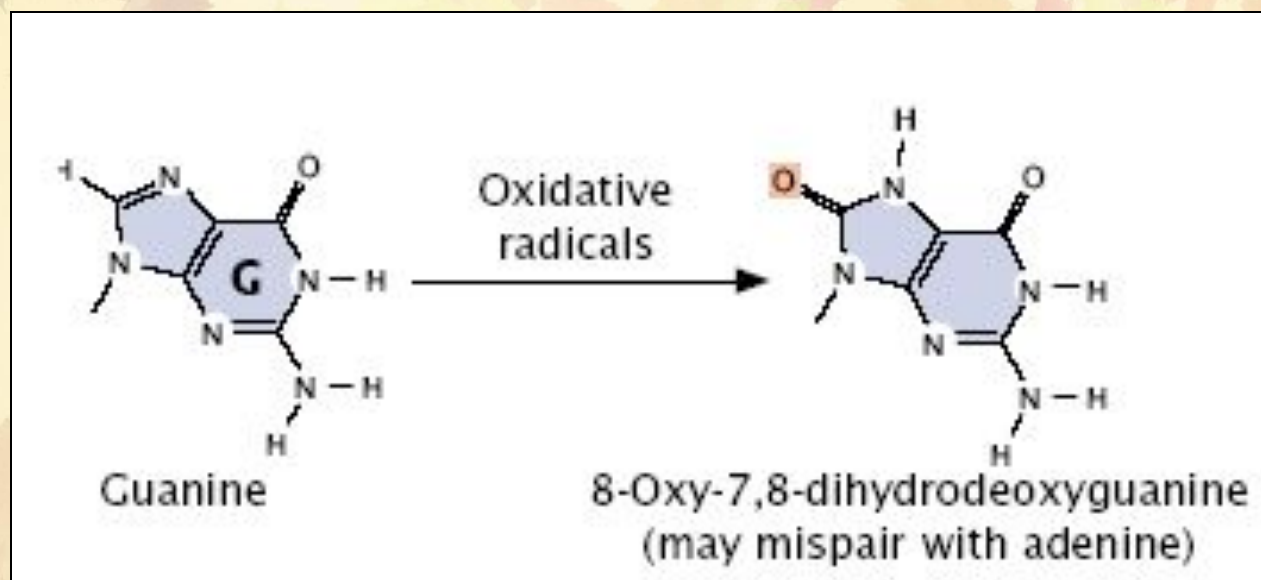


# FAPY-аддукты АФВ1

G  $\longrightarrow$  Т трансверсия

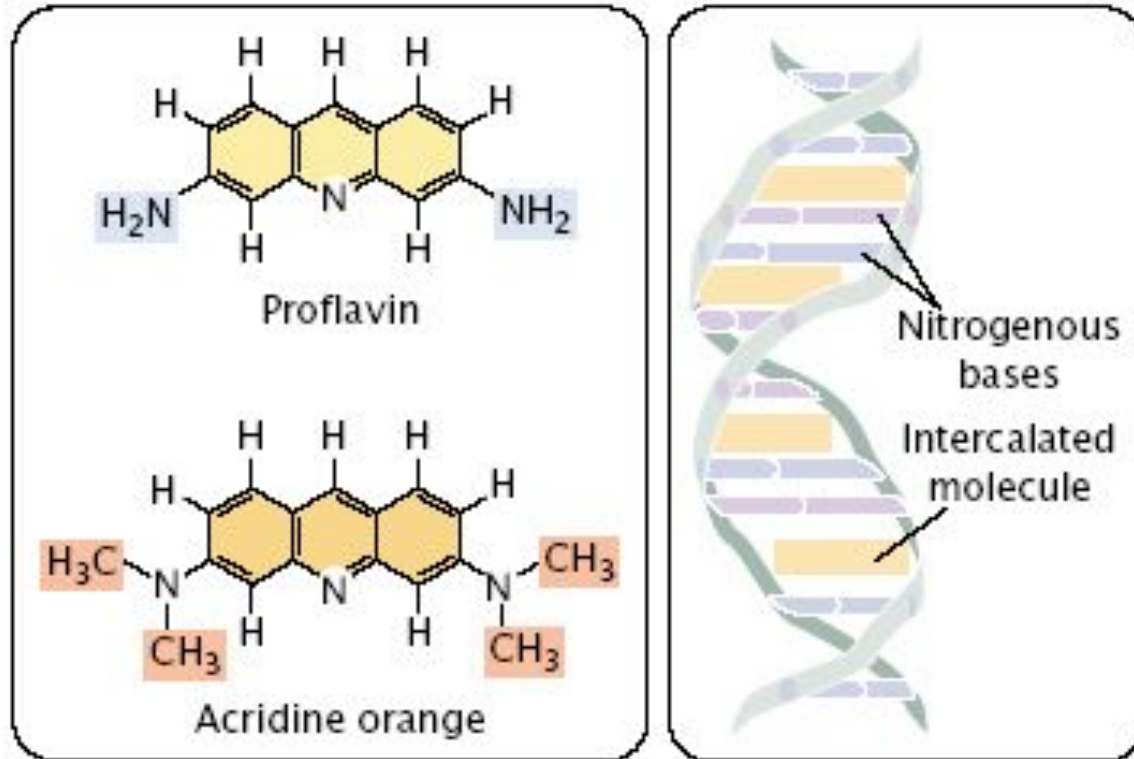


## 5. Окислительное повреждение ДНК

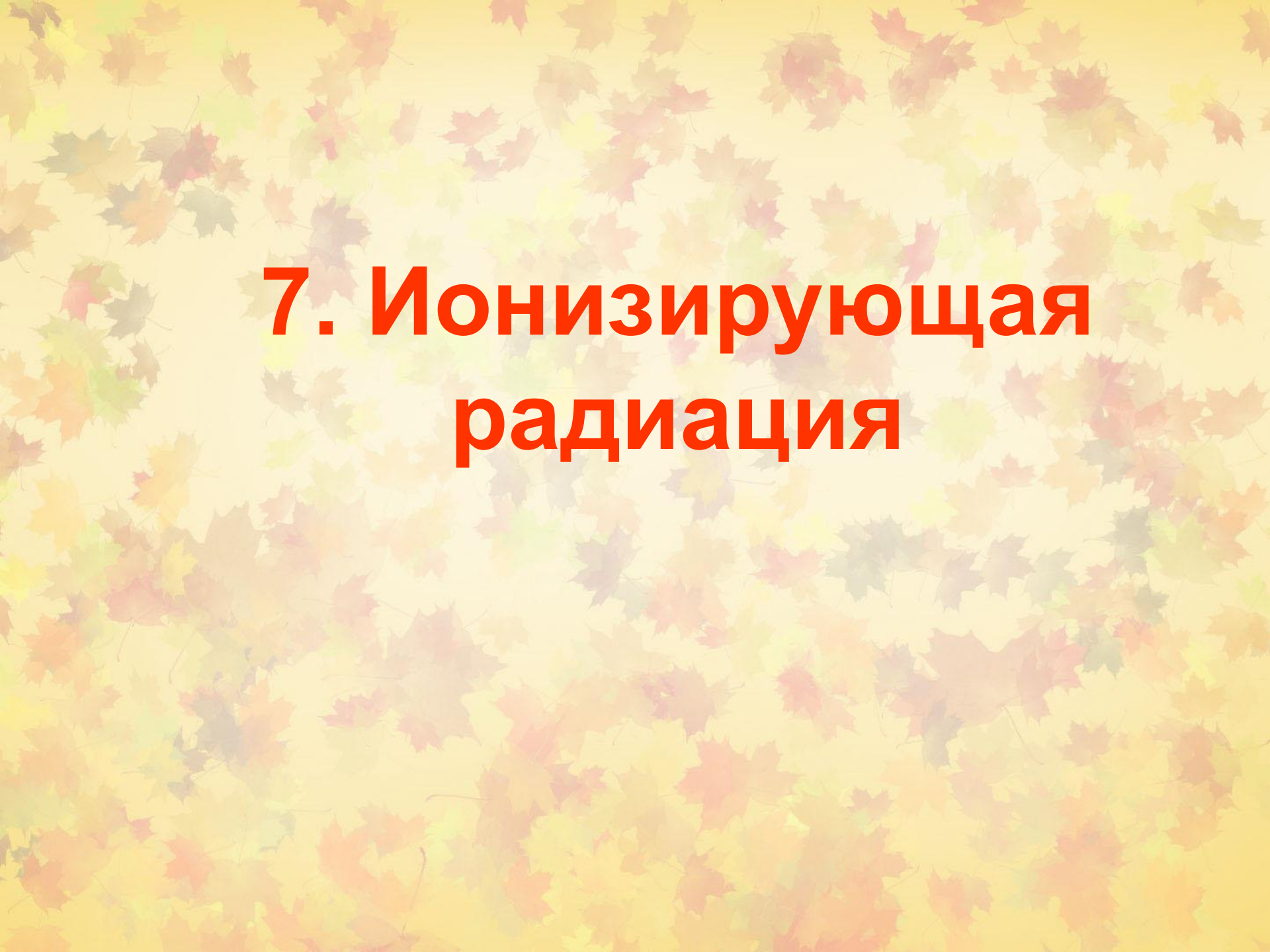


**C·G → T·A transversion.**

## 6. Интеркалирующие агенты

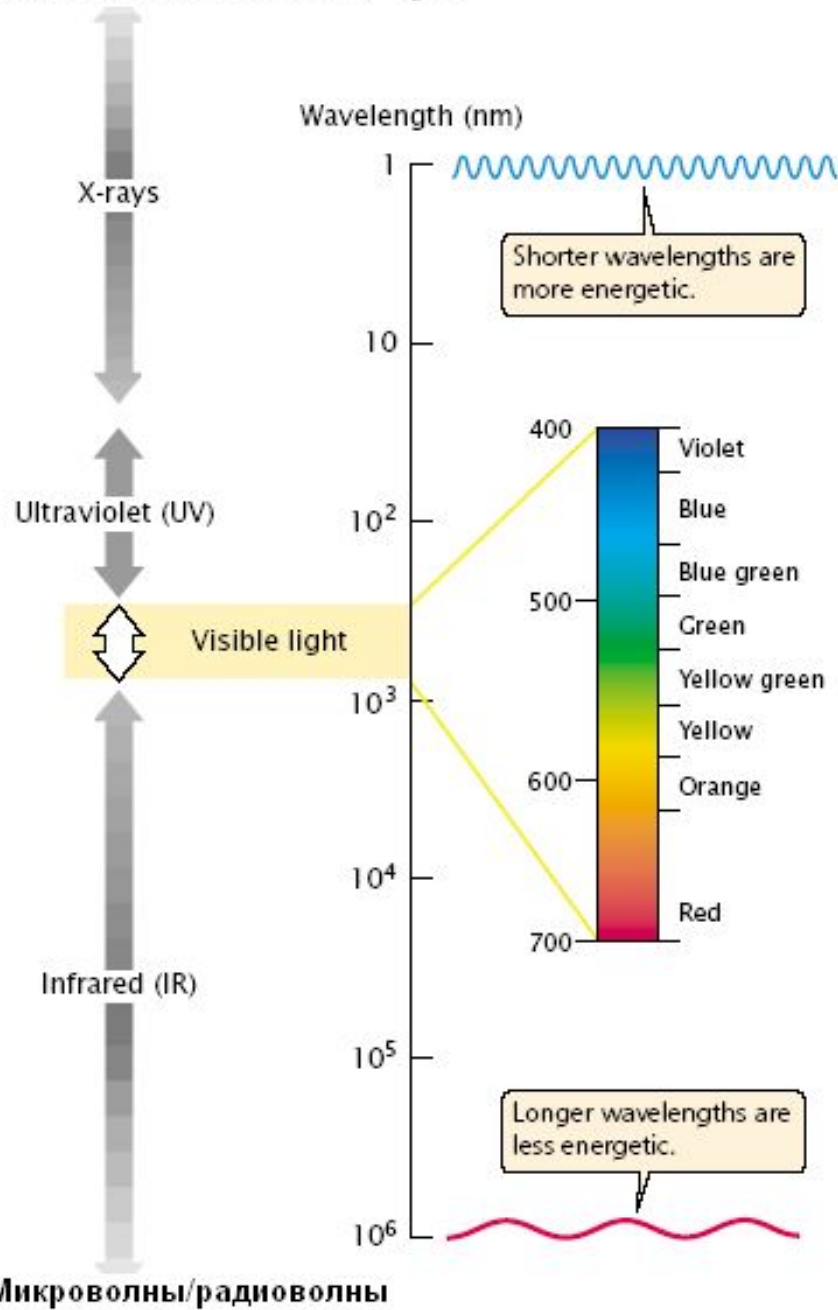


**Intercalating agents such as proflavin and acridine orange insert themselves between adjacent bases in DNA, distorting the three-dimensional structure of the helix and causing single-nucleotide insertions and deletions in replication.**

The background of the slide is a dense, repeating pattern of autumn leaves. The leaves are in various shades of yellow, orange, and red, with some green leaves still visible. They are scattered across the entire background, creating a textured, seasonal feel.

# **7. Ионизирующая радиация**

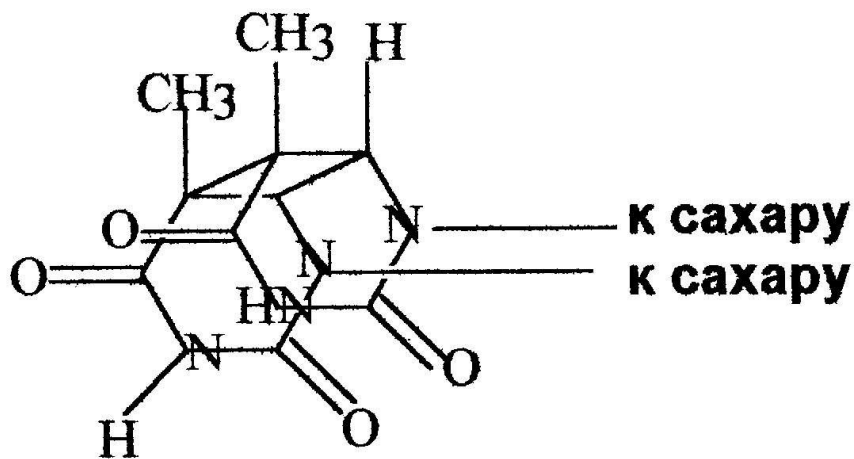
космические лучи/гамма лучи

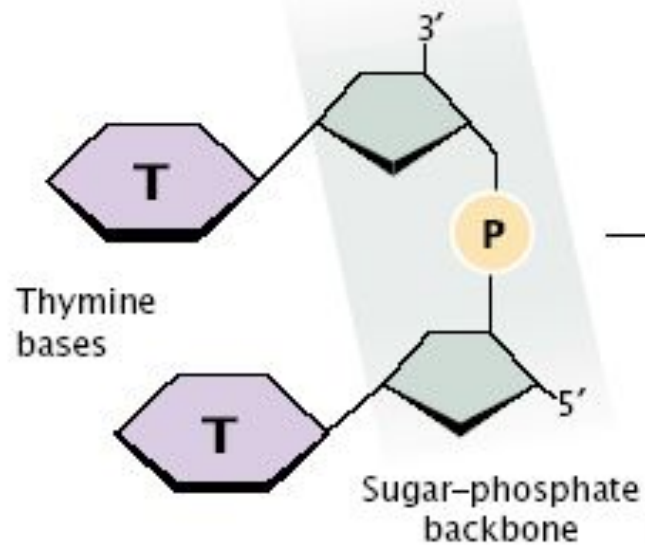


Микроволны/радиоволны

# Повреждение ДНК УФ-облучением

***Образование тиминового димера под действием ультрафиолетовых лучей***





UV light

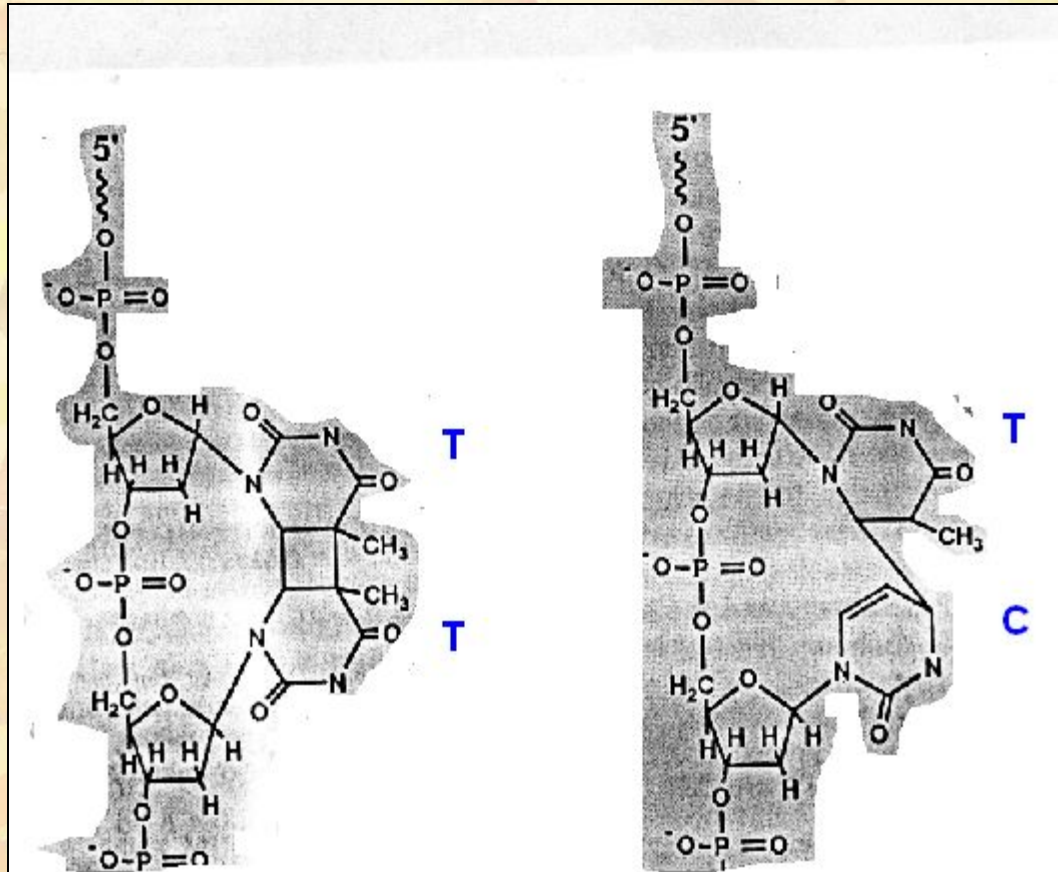
Covalent bonds

**1** UV light causes adjacent thymine bases to be cross-linked by covalent bonds.

**2** Thymine dimers distort the configuration of the DNA molecule.

AGG**T**TGCATC  
TCCAACGTAG

# Образование фотопродуктов ДНК



Циклобутановый димер

6-4 фотопродукты: 5'-Т-С-3'  
И другие: 5'-С-С-3' и 5'-Т-Т-3', но не 5'-С-Т-3'

# Схематическое представление химических и радиационных повреждений ДНК

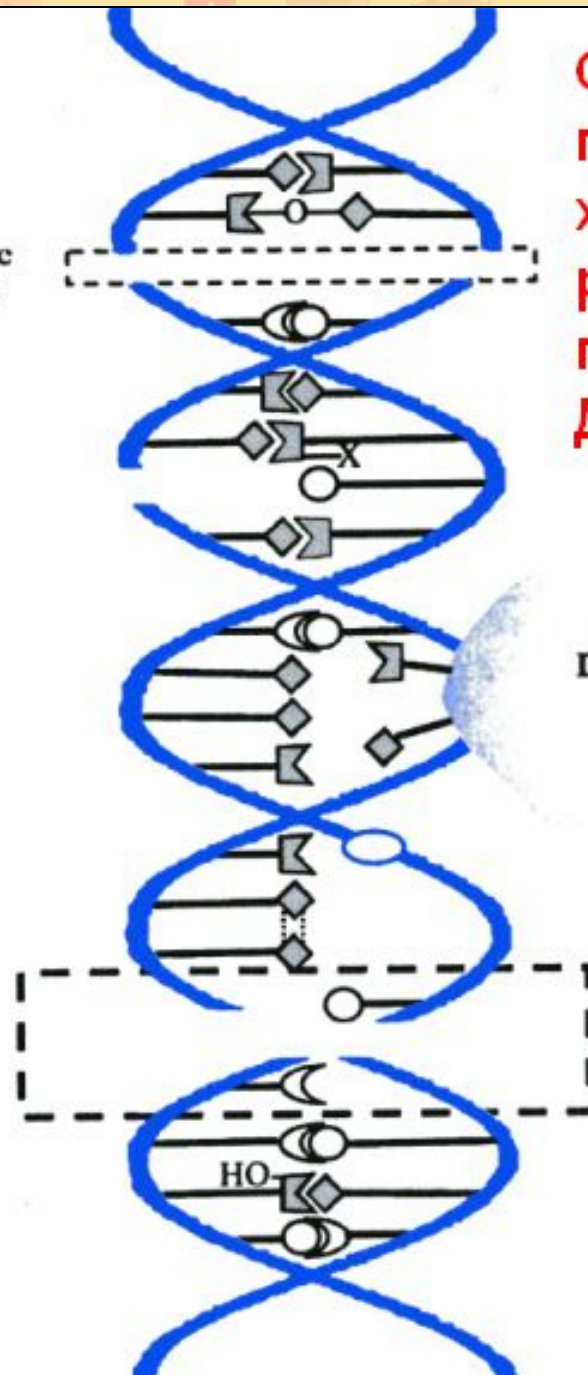
Simple Double Strand Break

Single Strand Break

Complex Lesion

DNA - Protein cross link

- Chemical cross link
- OH Base hydroxylation
- X Chemical adduct
- ⋯ Pyrimidine dimer
- Abasic site
- ◐ Adenine
- ◑ Guanine
- ◒ Cytosine
- Thymine



The background of the slide is a dense, repeating pattern of autumn leaves. The leaves are in various shades of yellow, orange, and red, with some green leaves still visible, suggesting a transition from summer to autumn. They are scattered across the entire frame, creating a textured, organic feel.

# **Методы тестирования мутаций**

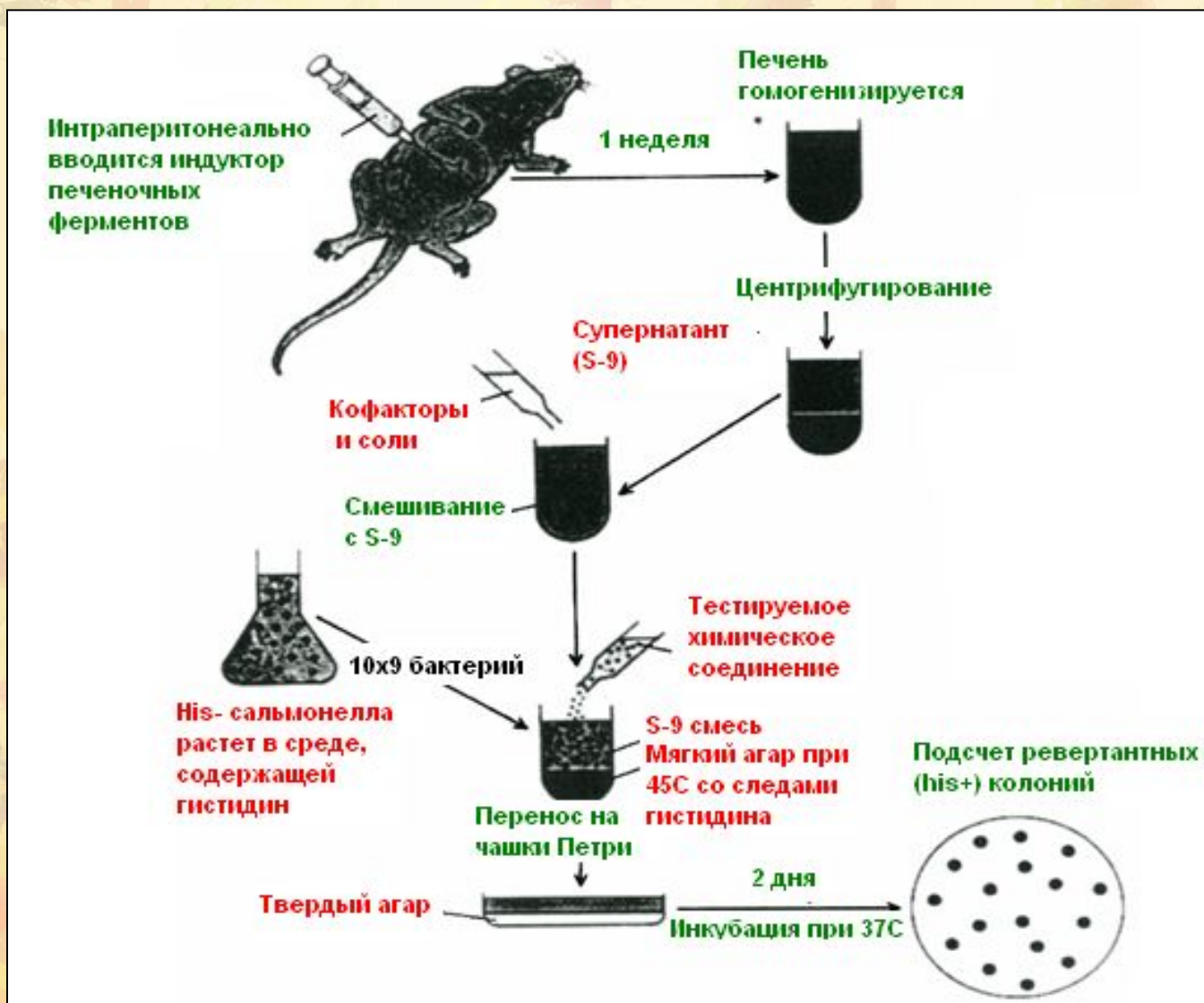
# Анализ реверсионных мутаций

**Table 17.4** Theoretical reverse mutations possible by various mutagenic agents

| Mutagen                | Type of Mutation | Reversal of Mutations by |                |                         |              |                |                 |
|------------------------|------------------|--------------------------|----------------|-------------------------|--------------|----------------|-----------------|
|                        |                  | 5-Bromo-uracil           | 2-Amino-purine | Ethyl methane sulfonate | Nitrous acid | Hydroxyl-amine | Acridine orange |
| 5-Bromouracil          | C-G ↔ T-A        | +                        | +              | +                       | +            | +/-            | -               |
| 2-Aminopurine          | C-G ↔ T-A        | +                        | +              | +                       | +            | +/-            | -               |
| Nitrous acid           | C-G ↔ T-A        | +                        | +              | +                       | +            | +/-            | -               |
| Ethylmethane sulfonate | C-G ↔ T-A        | +                        | +              | +                       | +            | +/-            | -               |
| Hydroxylamine          | C-G ↔ T-A        | +                        | +              | +                       | +            | -              | -               |
| Acridine orange        | Frameshift       | -                        | -              | -                       | -            | -              | +               |

Note: + indicates that reverse mutations occur, - indicates that reverse mutations do not occur, and +/- indicates that only some mutations are reversed. Not all reverse mutations are equally likely.

# Схема проведения теста Эймса

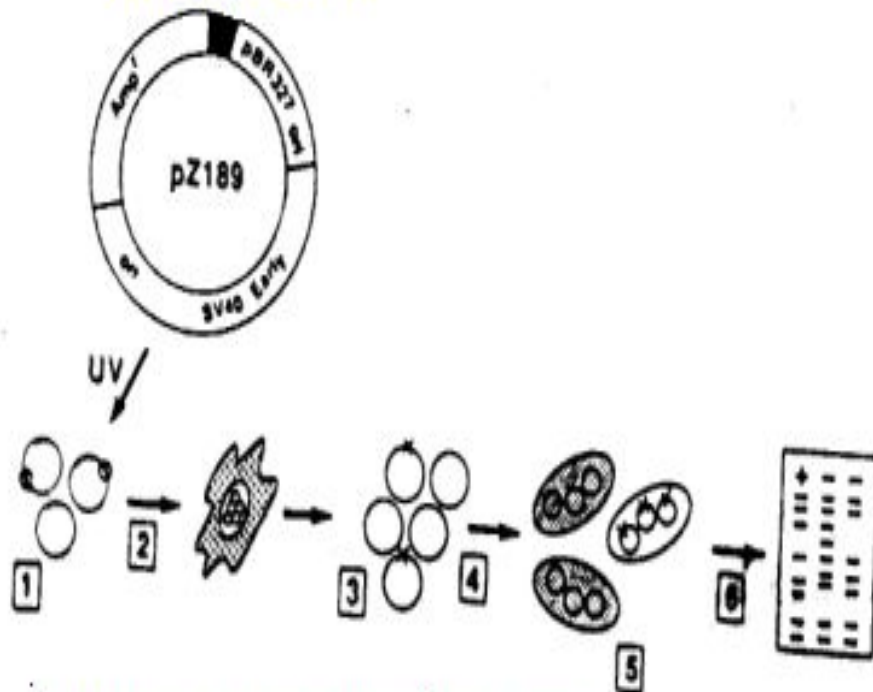


# Примеры линий *Salmonella thyphimurium*

- TA100 – замена определенных пар оснований
- TA98 – делеция, выявление мутагенов, вызывающих сдвиг рамки считывания (GCGCGCGC – «горячая последовательность»)
- TA97 – имеет дополнительный цитозин в HisD гене. Также выявляет сдвиг рамки считывания

## Использование шатловых векторов в детекции мутагенов

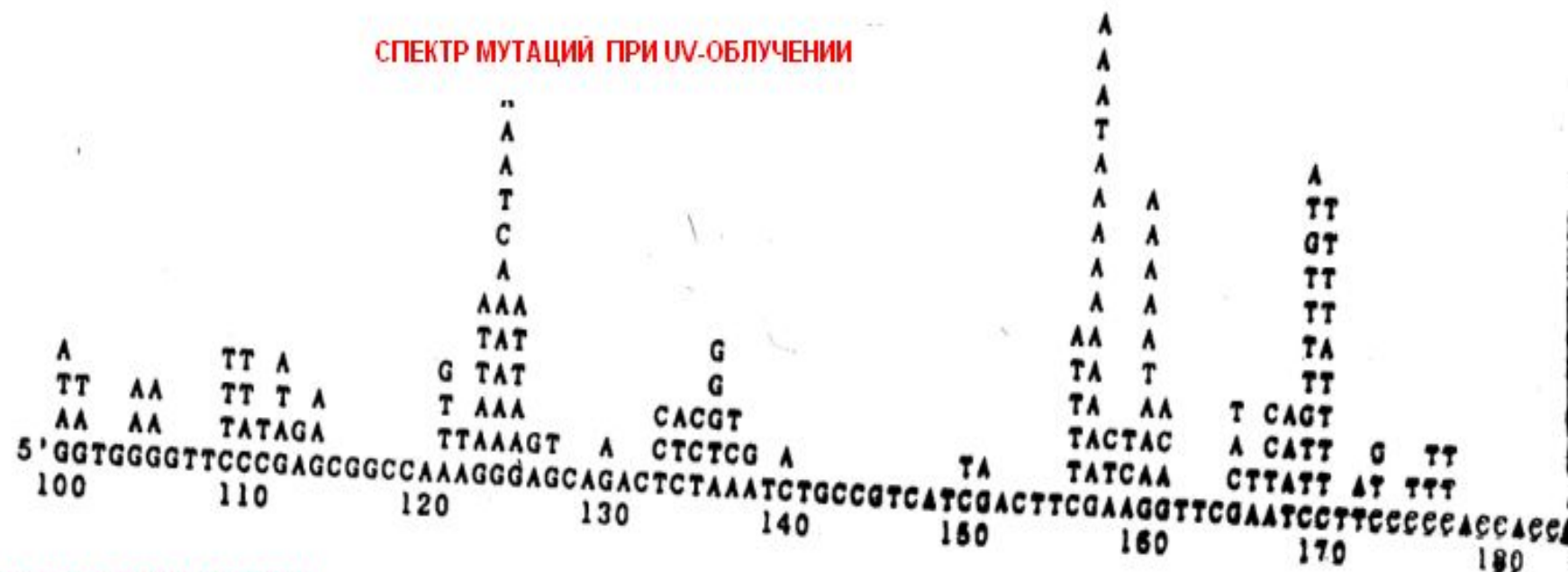
SupF - ген-мишень



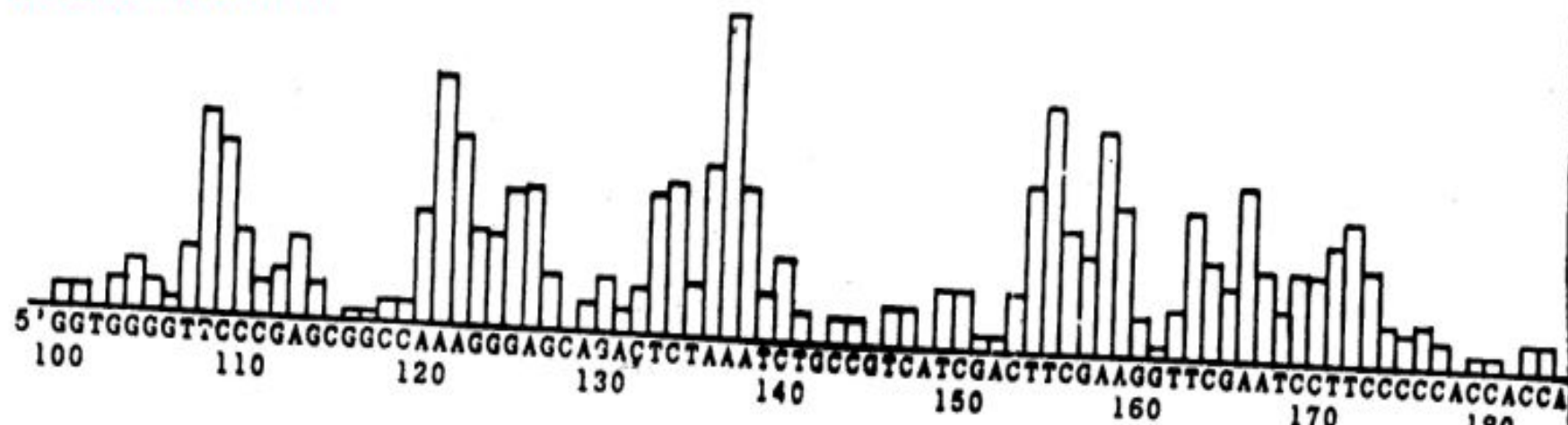
1. Обработка плазмиды канцерогеном
2. Трансфекция в клетки млекопитающих
3. Плазмида реплицируется и мутирует
4. Восстановление плазмиды
5. Трансформация бактериальных клеток для детекции мутаций
6. Секвенирование гена-мишени

|                    | UV-induced <sup>a</sup><br>(%) | BPDE-induced <sup>b</sup><br>(%) |
|--------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| <b>Трансзиции</b>  |                                |                                  |
| G·C → A·T          | 61                             | 22                               |
| A·T → G·C          | 7                              | 2                                |
| <b>трансверсии</b> |                                |                                  |
| G·C → T·A          | 13                             | 34                               |
| G·C → C·G          | 5                              | 34                               |
| A·T → C·G          | 4                              | 0                                |
| A·T → T·A          | 9                              | 7                                |

# СПЕКТР МУТАЦИЙ ПРИ UV-ОБЛУЧЕНИИ



## СПЕКТР ФОТОАДДУКТОВ



本——  
本——  
本——  
方——  
万——  
本——  
本——  
本——  
本——  
地——

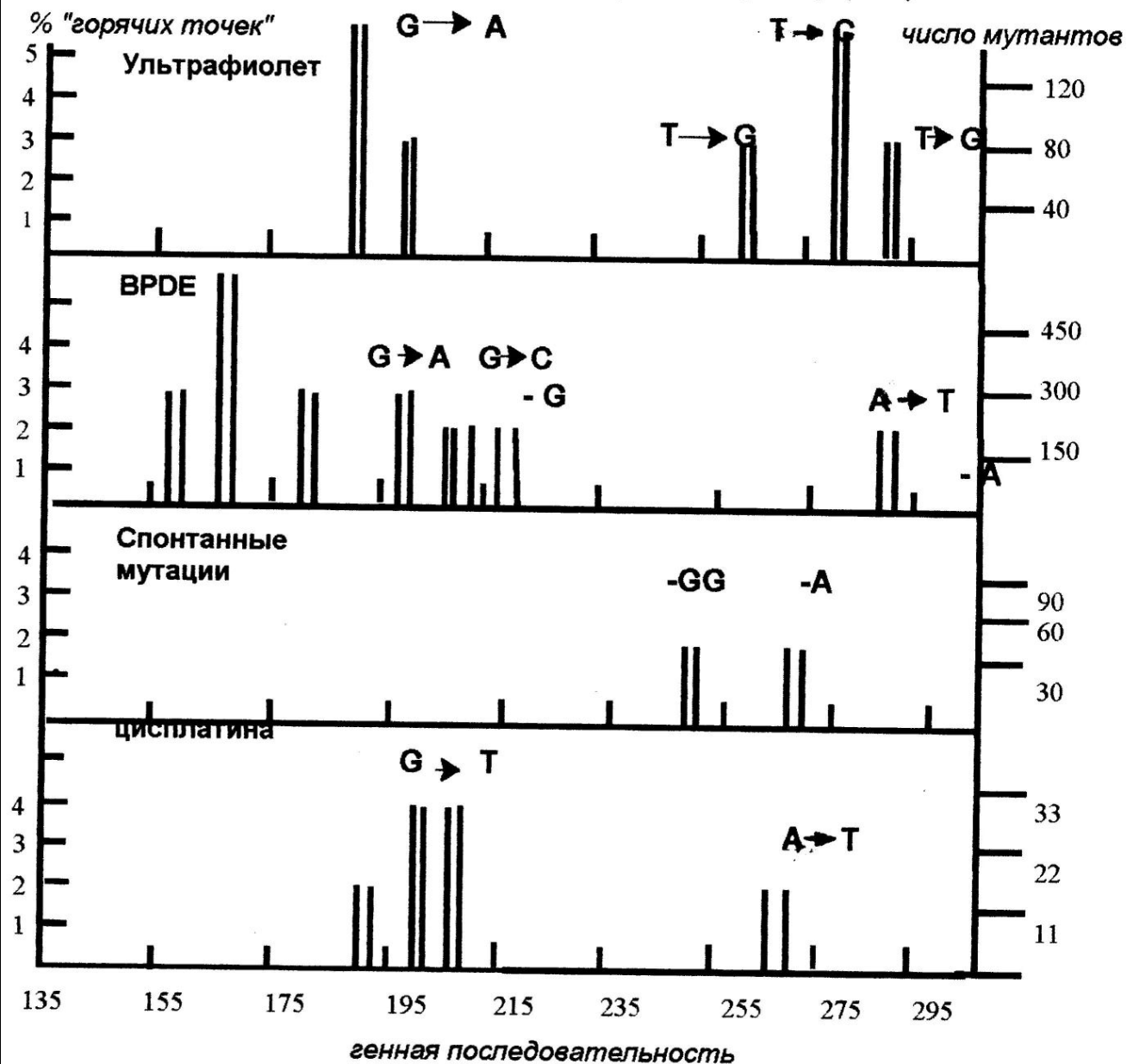
T AG \*-\*  
 C TGA \*-\*  
 C AGAG T GTT \*-\*  
 5'GGTGGGGTTCCCGAGCGCCGAAAGGGAGCAGACTCTAAATCTGCCGTGATCGACTTCGAAGTTTGAATCCTTCCGCCACCACCA  
 100 110 120 130 140 150 160 170 180  
 G A \*  
 C G G T A T A T C A A G

СПЕКТР ВРДЕ АДДУКТОВ

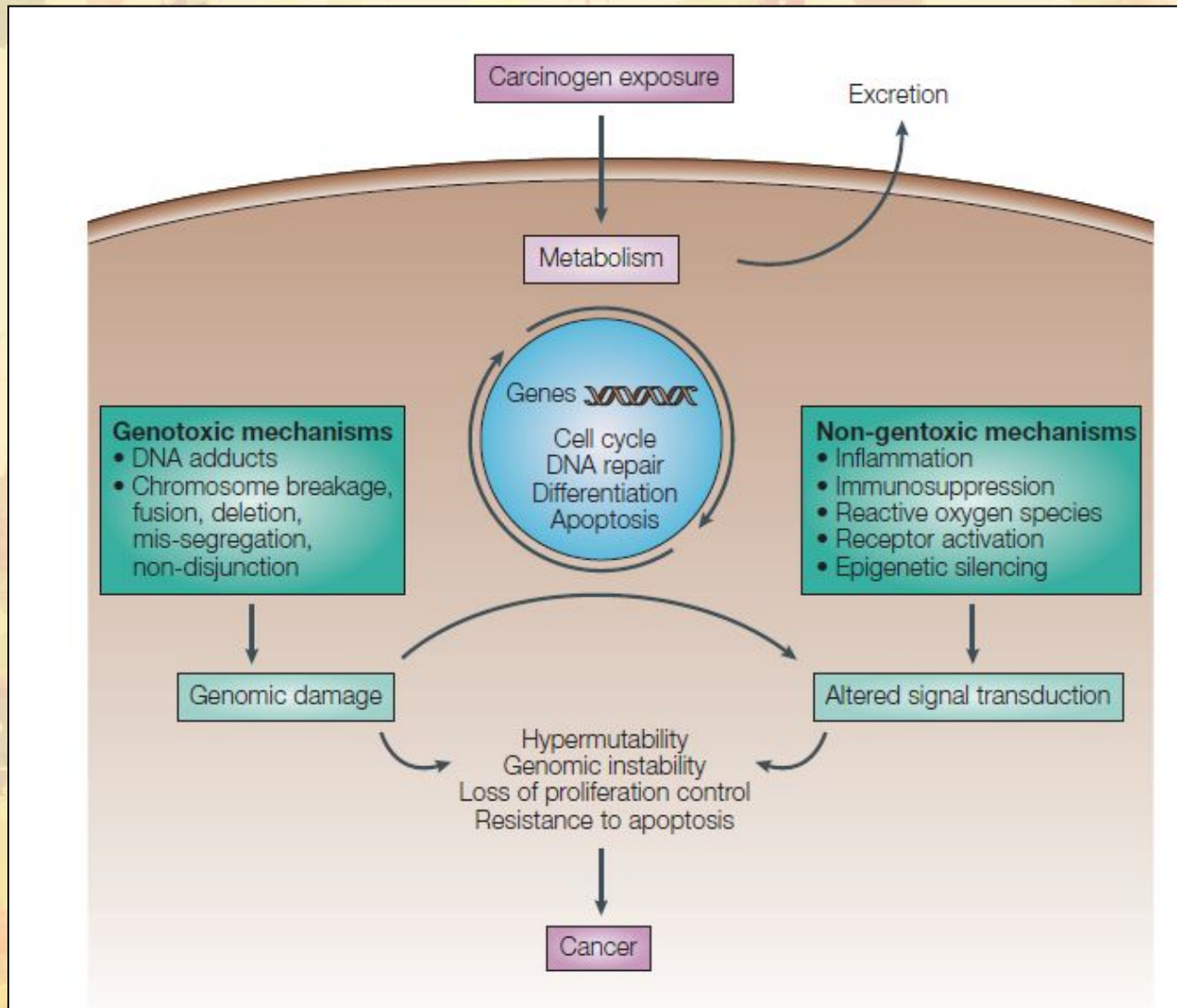
5' GGTGGGGTTTCCCGAAGCCGCGCCAAAGGGGAGCAGACTCTATAAATCTCCCGTCTATCGACTTTCGAAAGGTTTCCGAAATCTCTCCCGACCCACCA

100 110 120 130 140 150 160 170 180

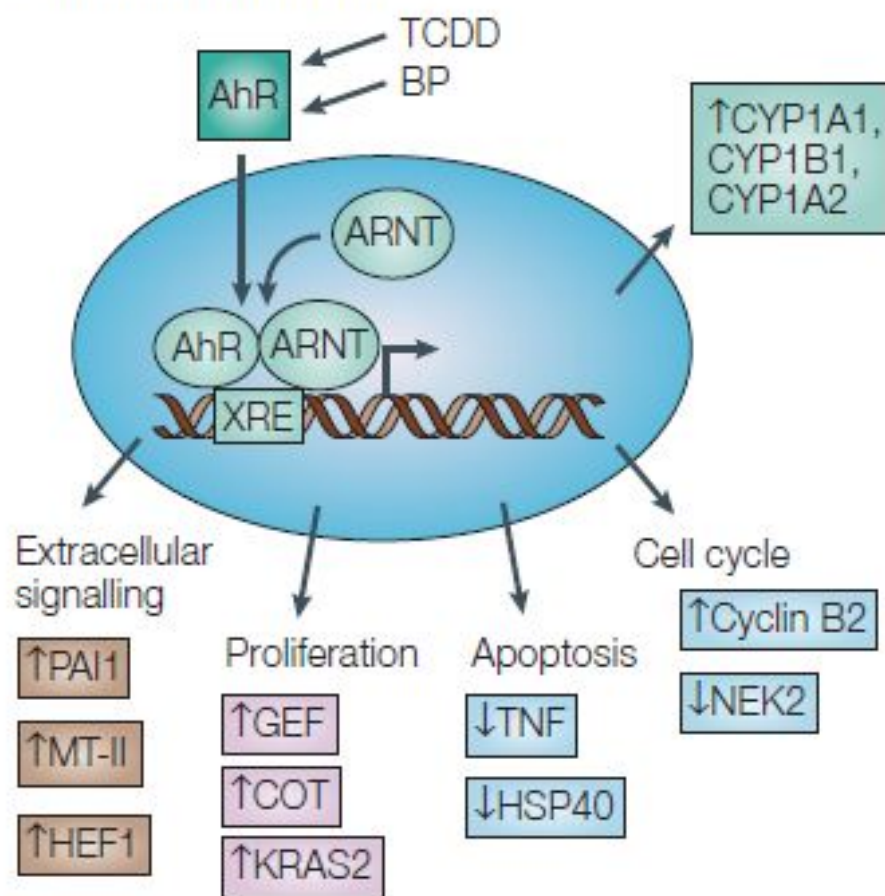
Мутационные спектры, индуцированные различными мутагенами  
(3-й экзон гена HPRT - гипоксантин фосфорибозилтрансфераза)



# Заключение к механизмам действия канцерогенов



### a Tumour promotion



### b Tumour initiation

