**Дәріс 1. Қоршаған ортаның экологиялық қауіпті факторлары - мутагендерге жалпы сипаттама**

**Мутагены** (от [мутация](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D1%83%D1%82%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F) и [др.-греч.](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D1%80%D0%B5%D0%B2%D0%BD%D0%B5%D0%B3%D1%80%D0%B5%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9_%D1%8F%D0%B7%D1%8B%D0%BA%22%20%5Co%20%22%D0%94%D1%80%D0%B5%D0%B2%D0%BD%D0%B5%D0%B3%D1%80%D0%B5%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9%20%D1%8F%D0%B7%D1%8B%D0%BA) γεννάω — рождаю) — химические и физические факторы, вызывающие наследственные изменения — [мутации](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D1%83%D1%82%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F).

Мутагены (равно и вызываемые ими мутации) классифицируют по происхождению (источнику) на эндогенные и экзогенные, а по природе на физические, химические и биологические. Экзогенные мутагены. Их большинство, к ним относятся различные и многочисленные факторы внешней среды (например, радиационное излучение, алкилирующие агенты, окислители, многие вирусы). Эндогенные мутагены образуются в процессе жизнедеятельности организма (например, мутации могут возникать под влиянием свободных радикалов, продуктов липопероксидации). Физические мутагены — ионизирующее излучение и температурный фактор: - ионизирующее излучение (например, а-, (3-, у-лучи, рентгеновское излучение, нейтроны); - радиоактивные элементы (например, радий, радон, изотопы калия, углерода и т.д. — источники ионизирующего излучения); - УФ-излучение; - чрезмерно высокая или низкая температура. Химические мутагены — самая многочисленная группа мутагенов. К химическим мутагенам относятся: - сильные окислители или восстановители (например, нитраты, нитриты, активные формы кислорода); - алкилирующие агенты (например, йодацетамид); - пестициды (например, гербициды, фунгициды); - некоторые пищевые добавки (например, ароматические углеводороды, цикламаты); - продукты переработки нефти; - органические растворители; - Л С (например, цитостатики, содержащие ртуть средства, иммунодеп-рессанты); - другие химические соединения. Биологические мутагены: - вирусы (например, кори, краснухи, гриппа); - Антигены некоторых микроорганизмов.

[Мутации](http://sbio.info/dic/11679), как правило, вредны для организма. Поэтому новые химические вещества, с которыми может соприкасаться [человек](http://sbio.info/dic/12620) ([лекарства](http://sbio.info/dic/11454), пищевые консерванты, красители для [волос](http://sbio.info/dic/10744) и др. [косметика](http://sbio.info/dic/11339), средства бытовой химии, [пестициды](http://sbio.info/dic/11913) и др.), проверяют (тестируют) на мутагенную активность. Для этого разработаны стандартные методы и тест-объекты ([микроорганизмы](http://sbio.info/dic/11599), культуры клеток [животных](http://sbio.info/dic/11050) и [человека](http://sbio.info/dic/12620), некоторые[растения](http://sbio.info/materials/orgbiol/orgrastvizsh/) и [животные](http://sbio.info/dic/11050)), позволяющие быстро определять чувствительность генетиче-ского аппарата к тем или иным агентам. Установлено, что многие мутагены являются одновременно и канцерогенами, т. е. веществами, вызывающими развитие злокачественных опухолей.

В связи с этим одна из важнейших задач [охраны природы](http://sbio.info/dic/11839) и обеспечения генетической безопасности человека –[*мониторинг*](http://sbio.info/dic/11640) окружающей среды и выявление загрязнителей, обладающих мутагенной и канцерогенной активностью. Вредное действие мутагенов на организм в ряде случаев может быть предотвращено или уменьшено применением специальных физических или химических факторов – антимутагенов.

Мутагены используют при искусственном (индуцированном) получении [мутаций](http://sbio.info/dic/11679) – мутагенезе, широко применяемом в генетических исследованиях и для создания исходного материала (набора перспективных мутантов) в [селекции микроорганизмов](http://sbio.info/materials/obbiology/obbosnovgen/obbselect/42), [растений](http://sbio.info/materials/orgbiol/orgrastvizsh/) и животных.

**Дәріс 2. Қоршаған ортадағы физикалық мутагендер**

## Физические мутагены: общие сведения

Первые физические мутагены, открытые учеными,- это разные виды излучений. Еще в 1925 г. российские генетики [Г.А.Надсон](http://medbiol.ru/medbiol/genetic_sk/0001ffb4.htm) и [Г.С.Филиппов](http://medbiol.ru/medbiol/genetic_sk/00000c97.htm) показали, что при облучении дрожжей лучами радия возникают разнообразные новые формы. Но генетические особенности дрожжей тогда были исследованы слабо и было трудно доказать, что под действием излучения возникают наследуемые мутации. Однако уже в 1927 г. [Г.Меллер](http://medbiol.ru/medbiol/genetic_sk/0003b650.htm) показал на [дрозофиле](http://medbiol.ru/medbiol/epigenetica/0003779f.htm) , хорошо изученной к тому времени генетиками, что под действием рентгеновских лучей у дрозофил возникают мутации. Один из методов, которым было доказано возникновение летальных мутаций в Х-хромосомах, состоял в следующем. Рентгеновскими лучами облучали половозрелых самцов дрозофил. От этого у части облученных самцов в [гаметах](http://medbiol.ru/medbiol/biology_sk/00069670.htm) в единственной Х- хромосоме возникали летальные мутации. (Конечно, мутации возникали и в[аутосомах](http://medbiol.ru/medbiol/slov_sverd/00006025.htm) , но там их было труднее выявить: если в каком-то [аллеле](http://medbiol.ru/medbiol/slov_sverd/000036b6.htm) возникала мутация, в гомологичной хромосоме был нормальный аллель, который маскировал эту мутацию) ([рис. 120](http://medbiol.ru/medbiol/genetic_sk/00061843.htm) , А, II). Тогда дочери от скрещивания облученных самцов с нормальными самками получали дефектную Х-хромосому. Они были гетерозиготны по летальному аллелю и сами не погибали; однако при скрещивании этих самок с самцами "дикого" типа половина рожденных самцов погибала ([рис. 120](http://medbiol.ru/medbiol/genetic_sk/00061843.htm) , Б, II). И тогда отношение числа самок к числу самцов в потомстве от этого скрещивания было 2:1, а не 1:1 как обычно.

[Рентгеновские лучи](http://medbiol.ru/medbiol/har/00528f59.htm) - это, как и свет, электромагнитные волны, только с очень маленькой длиной волны. Электромагнитные волны испускаются в виде отдельных порций ([квантов](http://medbiol.ru/medbiol/genetic_sk/00013c0b.htm) ), причем энергия кванта тем выше, чем короче длина волны. Некоторые другие виды электромагнитных волн с маленькой длиной волны - [гамма лучи](http://medbiol.ru/medbiol/har/0034d773.htm) и [ультрафиолетовое излучение](http://medbiol.ru/medbiol/har/00621087.htm) - тоже вызывают мутации. Мы не будем рассматривать механизмы, в результате которых излучение вызывает мутации; они достаточно сложны. Упрощенно суть дела можно описать так: кванты с высокой энергией глубоко проникают в ткани и там поглощаются компонентами клетки, в том числе и ДНК. Высокая энергия этих квантов приводит к тому, что они повреждают молекулы ДНК или так видоизменяют другие молекулы, что те вызывают повреждения ДНК.

[Ультрафиолет](http://medbiol.ru/medbiol/har/00621087.htm) сильно поглощается тканями и вызывает мутации лишь в поверхностно расположенных клетках многоклеточных животных, однако на одноклеточных он действует эффективно. (Мутагенное действие ультрафиолета было установлено в 1931 г. [А.Н.Промптовым](http://medbiol.ru/medbiol/genetic_sk/0002bee5.htm) ).

Другими физическими мутагенами являются частицы разной природы, имеющие высокую энергию: это альфа- и бета-излучения радиоактивных веществ ([альфа-частицы](http://medbiol.ru/medbiol/genetic_sk/00002121.htm) - ядра гелия, а [бета-частицы](http://medbiol.ru/medbiol/genetic_sk/00004ad2.htm) - электроны) и [нейтронное излучение](http://medbiol.ru/medbiol/genetic_sk/000435a7.htm) .

Мутации может вызывать также высокая температура (в 1928 г. Меллер показал, что повышение температуры на 10 градусов по С повышает частоту мутаций у дрозофил в 2-3 раза).

Зная способ действия этих мутагенов, можно было предположить, что они должны действовать на ДНК любых организмов. И действительно, вскоре было обнаружено, что например, рентгеновские лучи вызывают мутации у самых разных животных, растений и микроорганизмов. При этом было выяснено, что мутации, вызванные излучениями, могут затрагивать любые признаки организма. Это тоже неудивительно, ведь квант излучения или частица с высокой энергией чисто случайно может повредить любой участок ДНК. Число возникающих мутаций тем больше, чем выше интенсивность излучения, т.е. чем больше квантов или частиц попадало в клетку в единицу времени ([рис. 121](http://medbiol.ru/medbiol/genetic_sk/00061bbe.htm) ).

Было показано также, что физические факторы вызывают те же мутации, которые возникают и при спонтанном [мутагенезе](http://medbiol.ru/medbiol/genexp/00128acb.htm) .

Все эти работы, с одной стороны, дали в руки исследователей инструмент для получения разнообразных мутантов, которые использовались селекционерами. А с другой стороны, показали опасность разных видов излучений. Даже небольшие дозы излучения, которые не представляют прямой угрозы для организма, могут приводить к возникновению разнообразных врожденных уродств в потомстве организмов, подвергшихся облучению. Эти результаты послужили одной из причин борьбы за запрещение испытаний атомного оружия. Строительство атомных электростанций, использование радиоактивных веществ в разных приборах, а также радиоактивных изотопов в исследовательских целях заметно увеличило вероятность воздействия на людей разнообразных физических мутагенов. Это потребовало разработки приборов для измерения уровня излучений и разнообразных средств защиты.

Таким образом, работы Г.Дж.Меллера, который начал изучать действие рентгеновских лучей на дрозофилу, положили начало новой науке - [радиобиологии](http://medbiol.ru/medbiol/genetic_sk/00025d15.htm) . После взрыва атомной бомбы в 1945 г. стала ясна особая важность этой науки, и не случайно в 1946 г. Г.Дж.Меллеру была присуждена Нобелевская премия за исследование мутаций, вызываемых рентгеновскими лучами.

## Ионизирующее излучение: биологические эффекты, краткие сведения

Внутриклеточные механизмы лучевого поражения изучены недостаточно, но повреждение ДНК рассматривается как определяющий фактор. ДНК млекопитающих способна быстро восстанавливаться, если повреждена только одна нуклеотидная цепь, поэтому смерть клетки наступает только при повреждении обеих цепочек. Ионизирующее излучение поражает клетку как непосредственно, так и через взаимодействие с водой, составляющей около 80% объема клетки. При этом образуются[свободные радикалы кислорода](http://medbiol.ru/medbiol/infect_har/001cafac.htm) , обладающие высокой химической активностью за счет неспаренных электронов на внешнем энергетическом уровне. Продолжительность жизни свободных радикалов составляет доли секунды. Установлено, что повреждающее действие рентгеновского излучения связано прежде всего с образованием гидроксильных радикалов:

Ионизирующее излучение + Н2О = Н2О+ + е-;

Н2О+ + Н2О = Н3О+ + ОН\*;

где ОН\* - Повреждение клеток.

В результате лучевого повреждения клетки гибнут. В интенсивно обновляющихся тканях (например, в эпителии) облучение вызывает задержку деления с последующей гибелью части клеток в ходе [митоза](http://medbiol.ru/medbiol/env_fact/000127b7.htm).

Еще один биологический эффект - возникновение мутации и трансформация клеток, которая приводит к развитию [злокачественных новообразований](http://medbiol.ru/medbiol/har/0026ae05.htm) , иногда через много лет после облучения. Показано, что у людей, получивших низкую дозу облучения в детстве, через 20-30 лет злокачественные новообразования развиваются намного чаще, чем среди населения в целом.

**Дәріс 3. Қоршаған ортадағы химиялық мутагендер**

Химические мутагены: общие сведения

В Институте экспериментальной биологии, которым руководил [Н.К.Кольцов](http://medbiol.ru/medbiol/genetic_sk/000359ff.htm) , по его предложению искали химические соединения - мутагены. Первые сильные химические мутагены (формальдегид и другие вещества) были найдены [И.А.Раппопортом](http://medbiol.ru/medbiol/genetic_sk/00011e73.htm) в 1940 г. Но эти данные не были опубликованы, так как Раппопорт в июне 1941 г. ушел добровольцем на фронт. Он опубликовал свои результаты только в 1946 г. А в 1948 г. эти работы были прекращены после того, как к руководству в советской биологией пришел[Т.Д.Лысенко](http://medbiol.ru/medbiol/genetic_sk/000273f4.htm) , считавший генетику вредной буржуазной наукой. В том же 1946 г. появилась работа английских ученых [Шарлотты Ауэрбах](http://medbiol.ru/medbiol/genetic_sk/00003b9c.htm) и [Дж.Робсона](http://medbiol.ru/medbiol/genetic_sk/0006867d.htm) , в которой описывалось сильное мутагенное действие [иприта](http://medbiol.ru/medbiol/har/002a01ba.htm) (отравляющего вещества). Это еще один пример почти одновременных научных открытий.

В дальнейшем было открыто множество очень сильных химических мутагенов, а также показано мутагенное действие многих химических соединений, которые используются в промышленности и в сельском хозяйстве. Приведем несколько примеров. Мутагенами оказались [двуокись серы](http://medbiol.ru/medbiol/har3/00110faf.htm) , [окись азота](http://medbiol.ru/medbiol/har/0041adc7.htm) и[азотистая кислота](http://medbiol.ru/medbiol/microbiol/0001587e.htm) , [нитраты](http://medbiol.ru/medbiol/har3/001f5db2.htm) , многие [пестициды](http://medbiol.ru/medbiol/har/0045238c.htm) , [формальдегиды](http://medbiol.ru/medbiol/biochem/reactions/000295ee.htm) , [хлороформ](http://medbiol.ru/medbiol/drugs/00020b75.htm) , соединения [свинца](http://medbiol.ru/medbiol/har/00554b76.htm) и[ртути](http://medbiol.ru/medbiol/01122001/medgen/x002ed06.htm) и т.д. Всего сейчас известно около 3000 мутагенов, большинство которых искусственно создано людьми. Мутагенами оказались многие растворители, красители, дезинфицирующие вещества, вещества для тушения пламени, вещества, содержащиеся в выхлопных газах автомобилей, некоторые консерванты и др.

Таким образом, развитие химической промышленности, наряду с большой пользой, создает и серьезную опасность для человечества, поскольку многие химические соединения повреждают наследственный аппарат. Это привело к необходимости измерять степень загрязнения окружающей среды разными мутагенами, а также к поиску средств борьбы с действием таких веществ на наследственность людей.

Для многих химических мутагенов хорошо изучен молекулярный механизм их действия. Например, показано, что молекулы акридиновых красителей внедряются в ДНК и при ее удвоении вызывают либо выпадение, либо вставки отдельных оснований. Изучение механизма действия радиации и химических мутагенов на наследственный материал позволяет вести целенаправленный поиск защитных средств от мутагенов.

**Дәріс 4. Мутагенездің биологиялық факторлары**

 Физикалық және химикалық мутагенді факторларға қоса ҚО-да биологиялық мутагендер де бар. Хромосомалық аберрацияларды вирустар, мысалы, желік, қызылша, эпидемиялық паротит тудыратын вирустар туғызуы мүмкін екені белгілі. Вирустармен қоса биологиялық токсиндер де мутация туғыща алады. Миллиондаған адамдардың паразиті болып табылатын протозоологиялық сипаты бар организмдер, гельминттер т.б. өзінің токсинді қосылыстарын адамға енгізу арқылы оның метаболизмдік процестерінөзгерте алады және мутагенезді өзгерте алады. Паразитті организмдерден кейбір аймақтарда халықтың 100%-ы зардап шегеді. Адам организмінің ішкі ортасы үлкен роль атқарады. Зат алмасудағы генетикалық анықталған бұзылулардың көпшілігі табиғи мутациялауға жағымды жағдай жасайды.

Табиғи түрде өсімдіктерде кездесетін мутагендердің ішінде циказинге тоқтала кету қажет. Ол саговниктен бөлінеді және тропиктік және субтропиктік белдеуде кездеседі. Саговник тағамда, дәрі жасауда қолданылады. Саговникті тағамға пайдаланған аймақтаржа жиі токсикоз, улану, орталық нерв жүйесінің зақымдануы байқалады. Саговниктің кейбір мүшелерінен (тұқым, тамыр) циказин (метилозоксиметанол –β,D-гликозид) бөлініп алынды. Сүтқоректілердің ішегінде микроорганизмдердің түзетін β-глюкозидаза әсерінен β,D-гликозид ыдырап, агликон түзеді. Бұл жоғары мутагенді белсенділігі бар нитрозогуанидинге ұқсайды. Тәжірибелер циказиннің агликоны да мутагендік әсері барлығын көрсетті. Алайда циказиннің өзі мутагендік немесе улы әсер көрсетпейтіні белгілі болды. Түрлі өсімдіктерден (үнді капустасы, түрлі-түсті капустаның түрлері) бөлінген өнім ферментативті гдролизден соң аллилизотиоцианатқа айналатыны анықталды. Оның мутагендік әсері Дрозофилаға көрестілді.

Тағам өнімдері Streptomyces achromogenes тіршілік әрекетінде түзілген қосылыстармен ластануы мүмкін, одан бөлінген стрептозотоцин антибиотигі N-нитрозоқосылыстарға жатады. Стрептозотоциннің мутагендік белсенділігі тәжірибелерде көрсетілді. Далалық астықтардан, алмадан және жеміс шырындарынан басқа антибиотик – патулин бөлінді, ол кейбір Peniecillium және Aspergillus түрлерінің өнімі болып табылады. Патулин адмның өсірілген лейкоциттерінде хромосомалық аберрациялар туғызған.

Кофе дәндерінде және шай жапырақтарында кездесетін кофеин табиғи мутагендердің бірі болып табылады. Кофеиннің адам организмінде ыдырау жылдамдығы сағатына 15% құрайды, алайда бұл кофеиннің толығымен ыдырауына әкелмейді. Сондықтан кофе немесе шайды күнде ішкен уақытта кофеиннің концентрациясы 10-5 М, кейбір жағдайда ол 10-4 М жетеді. Бұл тақырыпқа көптеген жұмыстар жасалды. Кофеиннің жоғары мөлшерінде оның дам мен дрозофилаға тікелей мутагендік әсері көрсетілді. Хромосомалардың үзілулер туғызады. Аз концентрацияда кофеин синергиялық әсер етеді. Радиациямен қосылғанда ферменттердің репарациясын тежеген.

Табиғи мутагендерге колхицин және т.б. полиплоидия мен басқа хромосомалық бұзылуларға әкелетін митотикалық у болып табылатын қосылыстар жатады. ДНҚ құрылысына қатысатын пурин мен пиримидиннің құрылымдық аналогтарының кейбіреуі нүктелік мутацияны туғызады.

**Дәріс 5. Қоршаған ортаның пестицидтермен ластануы, олардың мутагендік әсері**

Көптеген әдеби мәліметтер ауылшаруашылығында қолданылып жүрген пестицидтер мутаген ретінде әсер ететіндігін көрсетті. Олар цитотоксинді және генетикалық жағымсыз әсер етеді. Токсикологтардың айтуынша пестицидтердің көпшілігі азық-түлік құрамында бар, және Әлемдікденсаулық сақтау ұйымының мәліметі бойынша олармен жылына 1% уланады. Пестицидтер топырақта ұзақ уақыт бойы сақталуы мүмкін. Миграциялай отырып, олар жерүсті және жерасты суларын ластайды. Пестицидтердің әсерінің нәтижесінде агро- және биоценоздарағы популяцияның құрамы бұзылады, табиғи жыртқыштардың және зиянкестердің паразиттері жойылады, жағымды фаунаға жағымсыз әсер, зиянкес жануарлардың пестицидке төзімді түрлерінің пайда болуы, өнім сапасының өзгеруі, тірі организмдердің генетикалық аппаратына жағымсыз әсер байқалады.

Қоршаған ортаның химиялық қосылыстармен ластануы популяцияның, соның ішінде адамның мутациялық фоны күрт өсуі мүмкіндігін көрсетеді. Алайда әлі күнге дейін популяцияның мутациялануының деңгейін дұ­рыс баға беру қойылмаған.

Бірге әсер ететін химиялық қосылыстардың иондаушы сәлелерге қарағанда генетикалық зардабы әлдеқайда жоғары екендігі белгілі. Сондықтан қосылысты қолдануға жіберер алдында оның қауіптілігін жжан-жақты зерттеу қажет. 2001 жылы Женевадаөткен ауылшаруашылығындағы қауіпсіздік пен еңбек гигиенасының 89-шы конференциясындаауылшаруашылығында қолданылатын химиялық заттарды импорттау, классификациялау және штампілеугі қатысты сәйкесінше ұлттық жүйені құру қажеттігі;оларды шектеу және оларға тыйым салу;адам қауіпсіздігі және денаулығы мен қоршаған ортаға деген зардабын шектеу туралы үкім қабылданды.

 **Пестицидтердің қысқаша классификациясы және сипаттамасы**. Пестицидтер (латынның *pest –* жұқпа және *zido* – өлтіремін) – ауылшаруашылық дақылдарының зиянкестерімен, ауруларымен және арамшөппен күресуге арналған түрлі қосылыстарды біріктіретін жинақтаушы термин. Пестицидтер химиялық құрамы, қолданылатын объектілері, организмге ену жолдары бойынша классификацияланады.

Әлемдегі және Қазақстандағы пестицидпен байланысты мәселелер. Пестицидтер – ауылшаруашылығық өнімін арттыруға көмектесетін бірден-бір химиялық қосылыс. Биологиялық тәсілдер химиялық қосылыстарға қарағанда өзінің тиімділігі жағынан нашарлау. Сондықтан пестицидтерді қолдануы алдағы уақытта әлі жалғаса береді. Алайда улы химикаттармен жұмыс істегенде оларды дұрыс пайдалану ережелері сақталмайды. Бұл олардың табиғи компоненттерде жинақталуына, улануға әкеледі. Бұл олардың нарыққа түсетін тағам өнімдерінде жинақталуына әкеледі

 Пестицидтер ьасқа антропогенді факторларға қарағанда биосфераға әдейі енгізіледі және оның қолдану масштабы үнемі өсуде. Пестицидтер биосфераны ластаушылардың бірінші ондығына кіреді. Жыл сайын пестицидтердің ассортименті және мөлшері жоғарылауда. ЕРА халықаралық агенттігі тірі организмдерді аурудан, зиянкестерден және арамшөптерден сақтайтын 23400-ден астам пестицид тіркеді. Қазақстан мен ТМД елдерінде соңғы 30-50 жылда пестицидтің 700 түрі практикалық қолданыста болды. Олар түрлі химиялық кластарға жатады. Қазақстан пестицидтің 230-дан астам түрін шетелден әкеледі. Қоймалардың сыйымдығы онда сақталатын пестицидтерге сай емес. Республикамызда пестицидтер сақталатын 1884 қойма бар, олардың типтіктері - 563, авариялық жағдайда - 411. қоймалардың саныжыл сайын кемуде, ал авариялық жағдайдағы қоймалар саны артуда (Семей, Павлодар, Жамбыл облыстарында – 45%-ға дейін). 2001 жылы республикамызда пестицидтерді қайта инвентаризациялау кезінде 1 миллионнан тоннадан астам қауіпті пестицидтер қалдығы табылды.

 Пестицидтердің генотоксиндігі. Пестицидтерге жүргізілетін генетикалық-гигиеналық зерттеулердің ішінде ең дамығаны олардың генетикалық белсенділігін тест-жүйелерде жүргізу болып табылады. М.А.Пилинскаяның мәліметі бойынша 400-ден астам пестицидтер мутаген екен. Бұл ауылшаруашылығында қолданылатын пестицидтердің 67,8%-ін құрайды. Пестицидтердің қазіргі кезде қолданылып жүрген және тый­ым салынған түрлерінің генотоксинділіг көрсетілді.

Пестицидтерді қарқынды пайдаланатын ауылшаруашылық аймақтарында тұқымқуалау бұзылуларының күрт өсуі болатындығы айдай анық. Пестицидтерді қолданудан бас тартудан соң әлемде адамның генофондына деген пестицидтік жүктің салдары үлкен маңызға ие болады. Хромосомалық бұзылулардың жоғары жиілігі көптеген аймақтарда тіркелген - Украинадағы цинеб өндірісінде жұмыс істейтін жұмысшыларда, Ресейдегі гексахлорбутадиен және дактал өндірісінде (Уфа), Өзбекстанның мақта егетін аудандарында, Азербайжан мен Молдавияның ауылшарушылық аймақтарында тұратын балаларда, Симферополь жылыжайында пиримор деген амфицидпен жұмыс істеген соң жұмыс істейтін жұмысшыларда (Украина). Бұл генетикалық мониторинг мәліметтері пестицидтердің мутагендік қауіптілігінің тек шектеулі мамандар үшін еместігі, жалпы халыққа қаупті екендігі көрсетуі қажет.

**Дәріс 6.**

**Қоршаған ортаның ауыр металдармен ластануы және олардың мутагендік әсері**

Ауыр металдар – тығыздығы темірдің тығыздығынан (7,874 г/см3) артық болатын түсті металдар тобы. Олар Менделеев периодтық кестесінің қырықтан астам химиялық элеменнер тобы, салыстырмалы атомдық массасы елуден жоғары. Оларға мырыш, қорғасын, қалайы, марганец, висмут, мыс, сынап, сүрме, никель, кадмийжатады. Ауыр металдардың көптеген қосылыстары, әсіресе, тұздары организм үшін зиянды. Олар тағам, су, ауа арқылы организмге түскенде ыдырамайды, кейбір органдарды (бүйрек, бауыр, буын, т.б.) жиналып, денсаулыққа қауіп төндіреді. Сондықтан ауыр металдардың қоршаған ортадағы мөлшері белгіленген шамадан аспауы керек [1].
 Ауыр металдар көптеген ферменттер құрамына кіріп биологиялық процестерге белсенді қатысады. «Ауыр металдар» тобы көбіне «микроэлементтер» түсінігімен сәйкес келеді. элементтердің экзогендік, жоғары концентрациясына «микроэлементтер» термині жарамайды. Ең алдымен өндірісте кең ауқымда және көп мөлшерде қолданылатын металдар зиянды [2]. Олар биологиялық белсенді және токсинді.
Ауыр металдардың табиғи ортаға түсуі табиғи (тау жыныстары мен минералдардың үгілуі, эрозиялық процестер,жанартау атқылауы) және техногенді (пайдалы қазбаларды өндіру, өңдеу, жанармай жағу, көлік, ауылшаруашылығының әсері) болып екіге бөлінеді. Өндіру мен өңдеу табиғи ортаның металдармен ластанудың күшті көзіне жатпайды. Бұл өндірістердегі ластанушы заттардың қалдығы жылуэнергетика қалдықтарынана әлдеқайда аз. Металлургиялық емес өндіріс, нақты айтқанда көмірдің жануы биосфераға ауыр металадардың түсуінің басты көзі. Жанармай жануынан атмосфераға тасталатын қалдықтар ерекше маңыды. Мыс: сынап, кадмий, кобальт, мышьяктың мөлшері өдірілетін металдардан 3-8 есе көп. ЖЭС-ның бір қазаношағы көмірмен жұмыс істеп, атмосфераға жылына 1-1,5 т сынап буын шығарады [3,4].

Атмосфера ауасында ауыр металдар органикалық және бейорганикалық қосылыс,шаң-тозаң және газ тәріздес түрінде болады. Осы орайда қорғасын, кадмий,мыс,мырыш аэрозольдері субмикронды диаметрі 0,5-1 мкм б-лшектерден6никель және кобальт аэрозольі ірі дисперсті бөлшектерден тұрады (1 мкм аса). Металлургия өндірісінде Ауыр металдар қалдықтарыкөбіне ерімеген күйде болады [5-9].

Ауыр металдар – қоршаған ортаға көп мөлшерде түскенде организмдерді уландыратын металдар. Бұл терминмен соңғы жылдары тек қана мынадай элементтер: қорғасын, мырыш, кадмий, сынап, никель, молибден, марганец, қалайы, кобальт, титан, мыс, ванадий аталады. Бұл элементтер қоршаған ортаға түскенде экожүйелердің өздігінен тазалану процесімен ыдырамайды. Олар топырақта жинақталып, өсімдіктерге өтіп, әрі қарай биологиялық айналымға түсіп отырады. Ауыр металдардың жартылай ыдырау мерзімі ұзақ, мыс., қорғасындыкі 740 жылдан 5900 жылға дейін, кадмийдікі - 13- 110 жыл, мырыштыкі – 70- 510 жыл, мыстікі – 310- 1500 жылдар аралығына дейін созылады. Биологиялық тізбек: топырақ - өсімдік – адам, топырақ - өсімдік – жануар – адам, топырақ – су – адам және топырақ – атмосфералық ауа – адам арқылы адам организміне өтіп, олар әртүрлі ауруларға ұшыратады [6,7,14].

Ауыр металдарға деген қызығушылық олардың улылығы мен канцерогендік әсерімен қоса мутагендік әсерінің болуында. Бұл ауыр металдардың қоршаған ортада болуына аса көңіл бөлуді түсіндіреді. Өсімдік организмдерінде ауыр металдардың – кадмий, қорғасын, никель, алюминий, мыс және мырыштың фитотоксинділігімен қоса айқын білінетін цитогенетикалық әсер де байқалды. Шетел авторлары кадмийдің оның әсерін дұшар болған 40 жұмысшыға (негізгі топ), және бақылаудың 40 адамына әсерін хромосомалық аберрация мен сестринские хроматидтік алмасуларды тіркеу арқылы және кадмийдің қан мен зәрдегі мөлшерін анықтау арқылы зерттеді. Негізгі топтағыхромосомалық аберрациялар темекі шегуге, оның қан мен зәрдегі мөлшеріне байланыссыз кездесті. Хромосомалық аберрациялар кадмийдің мутагендік әсерінің ерте көрсеткіші екені көрсетілді. Кейбір металлургиялық зауыттарда ауыр металдармен көп әсерлесетін жұмысшылардың лимфоциттерінде хромосомалық аберрациялар деңгейі жоғары екендігі көрсетілді. Кадмий тұздарымен ұзақ уақыт бойы байланыста болу ісік ауруларына, соның ішінде өкпе ісігіне әкелетіні белгілі. Мысалы, темекі шеккен кезде өкпе ісігінің пайда болуы белгілі мөлшерде кадмий тұздарының болуымен байланысты кадмийдің классикалық мутагендердің әсерін жоғарылататындығы белгілі, яғни комутагендік әсері бар. Комутагендер мутациялақ процестің түрлі кезеңд­ерінде әсер етеді. Металл иондарының комутагендік әсері тікелей мутаген туғызған ДНҚ-ның бұзылуының репарациясын тежеуімен байланысты. Комутагендік факторлардың көпшілігі клетканың репарациялық жүйе­сіне әсер ете отырып өзінің әсерін жүргізеді.

**Дәріс 7.** Выявление мутагенов.

Являясь неотъемлемым свойством всех живых организмов, мутационный процесс, в том числе и у человека, может оказывать на жизнеспособность носителей вновь возникающих мутаций влияние как едва заметное, так и катастрофическое. Опасное влияние некоторых физических факторов и химических соединений на частоту мутаций у человека, стало восприниматься в полной мере лишь по прошествии весьма продолжительного периода времени с момента открытия радиационного и химического мутагенеза. Причем для радиационного мутагенеза этот «лаг-период» продлился с момента открытия мутагенного действия рентгеновских лучей до 50-х г. XX века, когда уже нельзя было не замечать и не оценивать последствия испытаний ядерного оружия в атмосфере. Последствиям действия химических мутагенов на клетки человека также долгое время (до 60-х гт.) не уделялось должного внимания. И только после открытия химических супермутагенов эта проблема приобрела актуальность. С середины 70-х гт. XX века число работ, посвященных мутагенному действию химических веществ в среде обитания человека, стало нарастать лавинообразно. Все это привело к появлению нового направления — генетической токсикологии, исследующей мутагенные эффекты факторов окружающей среды. В повседневной жизни человек постоянно сталкивается с химическими мутагенами. Их источниками служат производственные вредности, сельскохозяйственные ядохимикаты, соединения бытовой химии, отдельные лекарства, но, прежде всего -продукты питания. Согласно опубликованному в 1990 г. заключению Международного агентства по исследованию канцерогенного риска при Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), пиша является источником сложной смеси мутагенов и канцерогенов различной природы. Это - нитрозосоединения, растительные алкалоиды, гетероциклические амины, флавоноиды, отдельные ароматические углеводороды и еще целый ряд химических соединений. Кроме того, пищевое сырье может быть загрязнено мутагенами при хранении (они могут образоваться из немугагенных предшественников). К настоящему времени накоплены сведения о генотоксических эффектах (мутагенной и/или ДНК-повреждающей активности) ртути и свинца, а также марганца, меди, мышьяка, кадмия, кобальта, олова, никеля, хрома и цинка в концентрациях, превышающих их физиологическое количество в живых тканях. Эти неорганические соединения поступают в организм человека с растительной и животной пищей. Реальную мутагенную опасность для человека могут представлять остаточные количества препаратов, используемых для стимуляции роста и при лечении сельскохозяйственных животных и птицы. Образование мутагенов (полициклических ароматических углеводородов, нитрозаминов, гетероциклических аминов) неизбежно происходит в результате кулинарной обработки говядины, свинины, рыбы и птицы при температуре, превышающей 150 °С. Результаты, свидетельствующие о таких последствиях термической обработки пищевого сырья, были получены не только в модельных экспериментах, но и при непосредственном тестировании готовых блюд. В частности, положительный результат теста на мутагенность (как на микробиологических объектах, так и у животных) был получен для разных образцов так называемой «быстрой» пищи, которую готовят обычно при температуре 230 °С. Ряд исследователей считает преувеличенными существующие представления о потенциальной опасности пищевых мутагенов, прежде всего, гетероциклических ароматических аминов, потребление которых на 5-6 порядков ниже доз, оказывающих повреждающее воздействие в экспериментальных тест-системах. Однако безоговорочно поддержать их здоровый скепсис мешают, в частности, корреляции, установленные между частотой употребления в пишу жареного мяса.уровнем гетероциклических ароматических аминов, выделяющихся с мочой, и вероятностью возникновения рака поджелудочной железы/ободочной кишки, а также другие, подобные указанным, факты. Генотоксическое воздействие производственных загрязнителей на организм человека было продемонстрировано результатами множества независимых исследований, обобщенных в 1992 г. Н.П. Бочковым и ЛЛ. Катосовой. Значительное количество промышленных производств являются источниками мутагенов, активно воздействующих на людей, непосредственно в них занятых. Это — переработка каменного угля и нефтепродуктов, добыча и газификация бурого угля, используемая во многих отраслях электросварка, производство резины, древесно-стружечных плит, стирола, винилхлорида, цитостатиков, биостимуляторов, а также поставленное на промышленную основу производство свинины и кормов для крупного рогатого скота. Кроме того, перечисленные отрасли могут быть потенциальными источниками генотоксических веществ, влияющих не только на персонал, непосредственно занятый в производстве, но и на не причастных к нему людей. Так, например, установлен повышенный уровень хромосомных перестроек у жителей окрестностей металлургических предприятий и алюминиевых производств. В течение последних 25 лет проводится обязательная проверка на генотоксичность лекарственных препаратов с целью выявления среди них соединений, повреждающих структуру ДНК. Результаты этих исследований, были обобщены в монографии А.Д.Дурнева и С. Б, Середенина, опубликованной в 1998 г. Таким образом, существует множество соединений, с которыми неизбежно приходится контактировать человеку, и которые потенциально опасны для его здоровья и наследственности. Однако заключение о реальной мутагенной активности каждого из них и, как следствие, предупреждение нежелательного контакта может быть сделано только на основании результатов специальных комплексных исследований.

**Дәріс 8.** Антимутагены. Ингибиторы мутагенеза.

 Еще в 50-х гг. XX века А. Новик и Л. Сцилард показали, что пуриновые рибонуклеозиды вызывают снижение уровня спонтанного и индуцированного мутационного процесса у Е. coli. Так был открыт новый класс соединений - антимутагены. Классификация их представляет не менее сложную задачу, чем классификация мутаций. Тем не менее, С. Де Флора и С. Рэмел, разделили их на две основные группы в зависимости от места действия: внеклеточные (дисмутагены) и внутриклеточные. Еще одна классификация атимутагенов базировалась на предполагаемых механизмах их действия. Так, группа внеклеточных антимугагенов состоит из трех подгрупп: 1) ингибиторы поглощения мутагенов и их предшественников (препятствуют проникновению в организм или ускоряют выведение из организма мутагенов), например, жирные кислоты, ароматические аминокислоты и др.; 2) ингибиторы эндогенного формирования мутагенов (предотвращают/тормозят реакции нитрозирования или изменяют внутрикишечную флору), например, токоферолы, фенолы, аскорбиновая кислота, ферментированные молочные продукты; 3) дезактиваторы мутагенов (в результате физических и/или химических реакций), например, вещества, поддерживающие определенный уровень рН в жидкостях тела, а также тиолы, антиоксиданты. Внутриклеточные ингибиторы мутагенеза также представлены тремя подгруппами: 1) модуляторы метаболизма (ускоряют переход мутагенов в клетки, не являющиеся мишенями, индуцируют механизмы детоксикации), например, тиолы и фенолы; 2) инактиваторы реакционно-способных молекул (взаимодействуют с электрофилами, улавливают кислородные радикалы, защищают нуклеофильные участки ДНК); 3) модуляторы репликации и репарации ДНК (увеличивают точность репликации, повышают эффективность репарации, ингибируют ошибки репарации), например, хлорид кобальта, арсенит натрия, кумарин, ванилин, тиолы, ингибиторы протеаз. Строгость данной классификации нарушается тем, что одно и то же соединение может быть отнесено к нескольким подгруппам антимутагенов. Что касается антимугагенных свойств пищевых компонентов, то в 1992 г. Б. Ставрик выделил из разных типов пищевых продуктов более 25 видов содержащихся в них, так называемых, хкмиопревентеров, среди которых - витамины, селен, кальций, флавоноиды, каротиноиды, кумарины, хлорофилл, растительные кислоты, пищевые волокна, жирные кислоты. К антимутагенам растительного происхождения принято относить капусту, зеленый перец, яблоки, лук, листья мяты, семена растений. Многие из перечисленных соединений в экспериментах снижают повреждающее действие средовых мутагенов. Следует отметить специфичность действия антимутагенов, проявляющуюся, прежде всего, в высокой избирательности, что особенно характерно для пищевых антимутагенов вообще и витаминов, в частности. Антимутагены ингибируют эффекты одних мутагенов, а в отношении других их действие может быть прямо противоположным (так называемое комутагенное действие) или отсутствовать вовсе. Достоверно установлено, что бесспорный компонент полноценного питания - витамин С — проявляет и антимутагенные, и мутагенные, и комутагенные свойства. Комутагенное действие (усиление повреждающего влияния генотоксических соединений) способны оказывать in vitro и другие витамины, втом числе В2 и Е. Результат зависит от дозы антимутагена, применяемой тест-системы и метода учета наблюдаемого эффекта. И, наконец, вследствие высоко специфичного действия антимутагенов по отношению к органам-мишеням, не исключена возможность защиты генетических структур в клетках одних тканей с одновременным потенцированием мутагенного эффекта в других, чему есть косвенные подтверждения. Вопрос создания фармакологических корректоров мутагенеза остается открытым как вследствие множественности мутагенных загрязнений одного и того же объекта, так и по причине смешанных механизмов генотоксического действия химиопревентеров.

**Дәріс 9. Комбинированное действие мутагенов. Оценка безопасности окружающей среды**

В генетике основополагающее биологическое понятие гомеостаза верифицируется как приспособительное свойство организма динамически изменять реакцию генотипа на повторные нарушения условий среды при том, что функции организма существенно не меняются. Поскольку все жизнеобеспечивающие системы организма (иммунная, гормональная, нервная и др.) взаимосвязаны, нарушение гомеостатического равновесия, индуцированное факторами окружающей среды, может быть причиной модификации мутагенных эффектов, что более вероятно при комплексном воздействии генотоксикантов. Например, в соответствии с теорией физиологического мутагенеза, разработанной М.Е.Лобашевым (1947), в экспериментах на млекопитающих была однозначно доказана мутагенность психоэмоционального стресса. Принимая во внимание колоссальные стрессорные нагрузки нашего времени, крайне важно учитывать возможное модифицирующее влияние этого фактора на другие мутационные воздействия. В серии исследований по изучению комбинированных воздействий эмоционального стресса и химических факторов выявлен мутагенный эффект, отличный от аддитивного. Четкие представления о механизме совместного действия ионизирующей радиации и химических соединений отсутствуют, что не дает возможности предсказывать результаты их комбинированного воздействия. Н.П.Бочков и А.Н.Чеботарев при анализе данных о цитогенетических эффектах комбинированного действия химических веществ и облучения на организм человека отметили увеличение общего количества хромосомных аберраций, причем в основном за счет аберраций хромосомного типа. По-видимому, в ближайшее время следует ожидать расширения работ по изучению совместного действия радиации (в первую очередь радионуклидов) и химических загрязнителей среды, что связано с повышенным интересом к этой проблеме после аварии на Чернобыльской АЭС и ряде других. Из сказанного выше следует, что взаимодействие мутагенных факторов окружающей среды отличается многоуровневыми (среда, организм, ткань, клетка) и разнонаправленными характеристиками. Поскольку экспериментальная проработка всех возможных вариантов оценки потенциальной мутагенности сложных смесей и комбинированных мутагенных воздействий не представляется реальной, необходимо оценивать суммарную мутагенность в среде обитания человека. В настоящее время прослеживаются два подхода к решению комплексной проблемы организации и проведения генетического мониторинга загрязнений окружающей среды и генетического здоровья населения: - анализ суммарной мутагенности образцов различных компонентов среды (атмосферного воздуха и воздуха рабочей зоны на предприятиях, питьевой воды и воды водоисточников, почвы и пищевых продуктов, лекарственных средств и пр.) на лабораторных тест-объектах в классических генетических экспериментах; - эпидемиологический подход — проведение натурных исследований на растительных и животных объектах в условиях производства и в экологически опасных регионах, а также оценка генетических повреждений у человека. Остановимся подробнее на основных задачах и сложностях каждого из этих подходов. Отбор и подготовка проб для введения их в генетический эксперимент — один из наиболее важных вопросов при оценке суммарной мутагенности загрязнений различных объектов окружающей среды. Как правило, в связи с низкими (для выявления мутагенов на генетических тест-объектах) концентрациями генотоксикантов прибегают к концентрированию проб воздуха, воды и пр., осуществляемому с помощью экстракции компонентов пробы органическими растворителями и(или) водой. Изучены свойства многих растворителей, пригодных для этих целей, но большинство исследователей пользуются ацетоном, бензолом, диметилсульфоксидом. При сравнении получаемых мутагенных эффектов проб воздуха, отобранных на специальные фильтры различных составов, значительных различий не выявлено. Неоднозначна проблема фракционирования проб (суммарные экстракты). Так, разделение сложных смесей на фракции не позволяет определить возможные антагонистические и синергидные процессы, которые могут происходить в нативных смесях. Например, в тесте Эймса был оценен эффект смешения некоторых полициклических ароматических углеводородов и показано, что мутагенность бенз(а)пирена возрастала при добавлении не мутагенного антрацена. С другой стороны, антрацен снижал мутагенность 7,12-диметилбенз(а)ант-рацена и бенз(а)антрацена. При фракционировании проб нельзя точно предсказать суммарную мутагенность и требуется осторожно интерпретировать такие данные. Интересны результаты международного межлабораторного исследования в зависимости от способов экстракции при изучении мутагенности сложных смесей воздушных загрязнений (выбросы дизельного топлива, угольного дегтя, бенз(а)пирена и 1-нитропирена). Авторы определяли повторяемость (внутрилабораторная вариабельность) и воспроизводимость (межлабораторная вариабельность) оценки мутагенности в тесте Эймса. Оба показателя варьировали очень широко. По общему мнению, именно межлабораторные различия в процедуре экстракции стали главной причиной несовпадения результатов (57 % всей вариабельности). Разработка стандартного протокола экстракции проб воздушных загрязнений крайне необходима для получения сравнимых результатов.

**Дәріс 10. Тестирование на мутагенность. Стратегия тестирования на мутагенность.**

Для тестирования всех веществ, с которыми на протяжении жизни человек может контактировать, потребовался бы непомерно большой объем работы, поэтому была признана необходимость первоочередной проверки на мутагенность лекарств, пищевых добавок, пестицидов, гербицидов, инсектицидов, косметических средств, наиболее широко распространенных загрязнителей воды и воздуха, а также производственных вредностей. Второй методологический принцип заключается в выборочности тестирования. Это означает, что вещество анализируется на мутагенность при наличии двух обязательных условий: распространенности в среде обитания человека и наличии структурного сходства с известными мутагенами или канцерогенами. Отсутствие универсального теста, позволяющего одномоментно регистрировать индукцию изучаемым веществом (и его возможными метаболитами) различных категорий мутаций в половых и соматических клетках, служит основанием третьего принципа - комплексного использования специализированных тест-систем. Наконец, четвертый методологический принцип подразумевает ступенчатость тестирования веществ на мутагенную активность. Этот принцип берет начало от одной из первых и наиболее известных схем, предложенной в 1973 г. Б, Бриджесом и предусматривавшей три последовательных этапа исследования. 1. На первом этапе мутагенные свойства вещества изучали простыми и быстро выполнимыми методами (с использованием микроорганизмов и дрозофилы в качестве тест-объектов) для определения его способности индуцировать генные мутации. Выявление такой способности предполагало запрет на применение данного вещества. 2. В случае особой медицинской или экономической значимости мутагена его тестировали на млекопитающих in vivo. Аналогичное исследование проводилось также для веществ, не продемонстрировавших мутагенных свойств в тестах первого этапа. Если исследуемый агент не проявлял мутагенных свойств, постулировалась безопасность применения его человеком. Вещества, проявившие мутагенность, либо запрещали для использования, либо, если они относились к категории особо значимых, или незаменимых, исследовали дополнительно. 3. На заключительном этапе проводили тестирование для установления количественных закономерностей мутагенного действия таких специфических веществ и оценку риска применения их человеком. Данная схема послужила прототипом целого ряда методик комплексного тестирования на мутагенность. Принципиально новым шагом на пути развития этого направления следует считать программу, предложенную в 1996 г. Дж. Эшби с соавторами, Исключительно важной особенностью этой программы является ее направленность не только на оценку мутагенности тестируемого вещества, но и на прогноз канцерогенности данного химического соединения и возможного механизма канцерогенеза. Современная система доказательств взаимосвязи между процессами мутагенеза и канцерогенеза включает целый ряд экспериментальных подтверждений обсуждаемой проблемы. Среди них: 1) наличие хорошо изученных наследственных заболеваний, при которых одновременно с повышенной чувствительностью к действию мутагенов наблюдается многократное превышение средней частоты возникновения злокачественных новообразований; 2) четко установленная сопряженность мутагенного и канцерогенного действия противоопухолевых цитостатиков, индуцирующих мутации в соматических клетках и за счет этого оказывающих терапевтическое воздействие, но способных вызывать у леченных онкологических больных развитие вторичных опухолей; 3) накопленные сведения о возможной активации протоонкогенов за счет индукции генных и хромосомных мутаций; 4) описание случаев спорадических моногенных доминантных мутаций, обусловливающих развитие опухолей различных органов. В программе Дж. Эшби постулируется, что вещество не является канцерогеном, если оно не проявляет мутагенного и генотоксического действия in vivo. Те же вещества, которым названные эффекты свойственны, являются потенциальными генотоксическими канцерогенами.

**Дәріс 11. Стандартизация тест систем на мутагенность. Современные тесты мутагенности.**

Публиковавшиеся в периодических научных изданиях результаты тестирования на мутагенность свидетельствовали об отсутствии единого стандарта в этой процедуре. В экспериментах in vitro различия чаше всего касались условий метаболической активации, in vivo — уровня доз, путей введения, сроков экспозиции и некоторых других экспериментальных параметров. Значительным итогом многолетнего обобщения результатов разработки и стандартизации испытаний на генотоксичность явилось выпушенное в 1989 г. ВОЗ «Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ», а также материалы 2-го Международного рабочего совещания в Мельбурне 1994 года. Фармакологический комитет МЗ и МП Российской федерации в 1994 г. опубликовал нормативный документ — методические рекомендации «Опенка мутагенности новых лекарственных средств». В рамках курируемой ВОЗ Международной программы по химической безопасности (International Programme on Chemical Safety, IPCS) были разработаны методические рекомендации для мониторинга генотоксических влияний на организм человека мутагенов и канцерогенов. В последней версии рекомендаций от 2000 г. предлагается следующий набор тестов: 1) цитогенетические методы — классический анализ хромосомных аберраций в лимфоцитах периферической крови, флуоресцентная гибридизация in situ (FISH), определение микроядер (МЯ) влимфоцитах и эпителиальных клетках; 2) анализ повреждений ДНК - определение аддуктов, одно- и двухцепочечных разрывов, перекрестных сшивок, шелочелабильных сайтов с помощью биохимических и электрофоретических (кометный тест) методик, определение сестринских хроматидных обменов (СХО); 3) учет образования аддуктов мутагена с белками и мутаций в локусе гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (ГГФРТ). Один из рекомендованных тестов — кометный (гель-электрофорез отдельной клетки) позволяет определить одно- и двущепочечные разрывы, щелочелабильные сайты, перекрестные сшивки молекул ДНК, а также участки с неполной эксцизионной репарацией в индивидуальной клетке. Материалом для кометного теста могут служить лейкоциты и лимфоциты периферической крови, сперматозоиды, буккальные клетки, клетки желудочного и назального эпителия, суспензию которых заключают в агарозный слой на предметном стекле. Затем клетки лизируют детергентами или растворами солей, и высвобожденную ДНК подвергают электрофорезу в нейтральных или щелочных условиях. ДНК отдельной клетки в процессе миграции к аноду образует так называемую «комету» с характерными «головой» и «хвостом», которую визуализируют с помощью флуоресцентной или световой микроскопии после окрашивания соответствующими красителями. При повреждении ДНК процесс ее миграции к аноду нарушен. Подсчитывают длину кометы, длину хвоста и момент хвоста (отношение длины хвоста к длине всей кометы). Нейтральный вариант кометного теста позволяет определить двухцепочечные разрывы ДНК, щелочной вариант (в зависимости от значения рН) - одно- и двухцепочечные разрывы, шелочелабильные сайты, участки с неполной эксцизионной репарацией, перекрестные сшивки ДНК-ДНК и ДНК-белок. Чрезвычайно важно, что с помощью этого метода удается выявить фракцию клеток с поврежденной ДНК внутри большой популяции непораженных клеток. Разные модификации метода (применение специфических антител против поврежденных участков или специфических ферментов репарации ДНК) позволяют определить специфические классы аддуктов ДНК (например, тимидиновые димеры, участки окислительного повреждения). Согласно другому документу IPCS (2001 Г.) «Биомаркеры при оценке риска. Валидность и верификация», после окончательной расшифровки генома человека наибольшую роль при определении генотоксических воздействий будут играть методики выявления полиморфизма одиночных нуклеотидов и технологии создания микроматриц и микрочипов ДНК и белков. Тем не менее, пока в большинстве случаев оценка генетического риска основана на экстраполяции экспериментальных данных от одного тест-объекта на другой, от высоких доз на низкие и т.д., и, в конечном итоге, от модельных систем in vitro/in vivo — на человека. Практически все исследователи считают проблему количественной экстраполяции чрезвычайно затрудненной, если вообще возможной. Причиной тому являются видовые, возрастные и индивидуальные особенности метаболизма, а также детоксицирующих и сепарирующих систем и многих других параметров. Метаболические особенности человека могут существенно повышать или понижать мутагенный эффект химических соединений. Следовательно, для правильной экстраполяции необходимо знать метаболизм конкретного мутагена и у животных, и у человека. Кроме того, количественные закономерности мутационного процесса неодинаковы у разных животных, в том числе, и при сравнении их с человеком. В зависимости от состава сравниваемых пар индуцированный мутагенез у человека может быть выражен сильнее или слабее. Например, показано, что человек более устойчив к мутагенному действию радиации, чем мышь. Не исключено, что таково же соотношение и в случае действия химических мутагенов. Существование количественных различий в результатах индуцированного радиационного мутагенеза связано с видовыми особенностями функционирования репарационных систем, которые способны восстанавливать первичные повреждении, имеющие потенциальный характер и не обязательно реализующиеся в мутации. Немаловажно и то, что диапазон тех доз, которые используют в эксперименте, как правило, на 2 порядка и более отличается от тех, с которыми реально сталкивается человек. И это только малая часть трудностей, описанию которых можно было бы посвятить отдельную главу. Тем не менее, в 1980 г. Ф. Собелсом сформулировал принцип экстраполяции, получивший название «правило параллелограмма». Его используют в тех случаях, когда необходимые данные невозможно получить путем прямых измерений. Например, в экспериментах на мышах можно сравнить частоту мутаций в соматических (А) и зародышевых (А') клетках. Установив частоту индуцированных мутаций в соматических клетках человека (В) и предположив, что отношение частот мутаций в зародышевых клетках к частотам в соматических одинаковое у мыши и человека (А/А' = В/В'), можно составить представление о возможной частоте мутаций в зародышевых клетках человека (В'), Правило параллелограмма допустимо применять строго при условии линейной зависимости эффекта от дозы. Несмотря на такое ограничение, правило параллелограмма может оказывать реальную помощь для оценки генетического риска влияния мутагенов. Это было подтверждено, в частности, на примере четырех мутагенов: акриламида, этиленоксида, циклофосфана и 1,3-бутадиена. Н.П, Бочков и А.Н. Чеботареве 1989 г., предложили схему, отражающую принцип прогнозирования мутагенного эффекта в зародышевых клетках по имеющимся данным одействии тестируемого соединения надругие объекты и закономерностям сопоставления эффектов в различных системах. Те же авторы в качестве одного из основных условий, повышающих точность экстраполяции, выдвигают максимально возможное сокращение числа ее ступеней и подчеркивают важность расширения знаний о мутационном процессе для объективного выбора моделей и выяснения границ экстраполяционных возможностей.

**Дәріс 12**

**Современные краткосрочные тесты для выявления мутагенов и канцерогенов окружающей среды.**

 Для оценки мутагенных свойств химических соединений (ХС) предложено около 200 различных тест-систем, многие из которых хорошо разработаны и  нашли широкое применение. Однако до настоящего времени нет универсальной тест-системы, которая могла бы выявить все основные типы генетических повреждений. Это обстоятельство ведет к необходимости использования в работе по выявлению и оценке мутагенности исследуемых ХС целого набора методов. При этом в качестве тест-объектов служат самые различные виды организмов от микроорганизмов до трансгенных животных и клеток человека  в условиях in vitro   и in vivo.Большинство широко используемых в настоящее время тест-систем  разработаны были  еще в 70-х годах и, соответственно, подробно описаны в различных методических руководствах и обзорах (1,2,4).

     Основные тестирования на мутагенность большого числа ХС, которые в той или иной форме введены в окружающую среду или будут введены в результате возрастающего  химического синтеза, были сформулированы  тоже еше в начале 70-х годов Бриджесом (7) и Фламмом (14).Эти принципы основаны на идее поэтапного тестирования, когда  каждый  из этапов является просеивающим по отношению к  последующему этапу, то есть тестирование ХС на следующем этапе проводится только в случае, если оно  проявило мутагенную активность на  предыдущем этапе. Такое тестирование предполагает  создание набора или батареи тестов, в котором первый этап состоит из простых и высокочувствительных методов, а последующие этапы  состоят из методов  по возрастающей сложности проведения и филогенетической близости к человеку. Следует отметить, что  батарея тестов должна содержат максимально информативный набор методов, позволяющих регистрировать различные типы генетических изменений,  в то же время достаточно экономичных, чтобы обеспечить реальность выполнения программы испытаний. С другой стороны, набор методов, схема испытаний, анализ и оценка результатов должны быть одобрены и утверждены государственными органами, чтобы  все  системы оценки в рамках поставленной задачи имели официальный характер и обеспечивали унификацию проверки на мутагенность во всех лабораториях.

      Анализ  принятых в различных странах, включая США и страны Европы, схем тестирования как для отдельных программ (например, для оценки генетической безопасности фармакологических средств или пестицидов), так и для оценки мутагенного и канцерогенного потенциала ХС - загрязнителей окружающей среды, показывают, что на первом этапе обычно используется бактериальный тест Эймса салмонелла/микросомы, а на втором - тест на микроядра или хромосомные аберрации в клетках костного мозга мышей (5,8). Причем как первый этап, так и второй этап может быть дополнен методами учета точковых мутаций в клеточных культурах (обычно используют клеточные линии  V79, СНО,  L5178 ТК +/- ).   Третий этап состоит  исключительно из тестов учета мутаций в половых клетках, причем основным тестом является метод учета доминантных летальных мутаций у мышей. Таким образом, основной костяк любой батареи тестов  составляют методы учета мутационных событий. Однако  в ряде случаев используются и такие косвенные методы, как тесты на СХО, на репаративный синтез  и разрывы ДНК, а также  на аддукты ХС с ДНК как  в соматических, так и  в половых клетках (тесты на генотоксичность).

       Принятые в различных странах схемы тестирования, и, соответственно, набор методов,   последовательность тестирования и правила принятия решения о прекращении или продолжении испытаний, несколько различаются. Эти различия сложились исторически в 70-80 – годах прошлого  двадцатого века, в период бурного развития работ  по апробации  и валидизации  тест-систем и их батерей. В настоящее время  эти различия являются препятствием на пути к унификации схем тестирования в период необходимости формирования общих требований к химической безопасности, в том числе и к генетической безопасности.

      Создание в начале 70-х годов тест-систем, способных учитывать метаболическую  трансформацию ХС    in vitro (например, тест  Эймса Salmonella/микросомы), показало, что многие канцерогены являются также и мутагенами (18 ). Это привело к тому, что тестирование  ХС на генетическую активность стали проводить  в двух целях. Во-первых, для регистрации собственно мутагенов, то есть ХС, потенциально способных  индуцировать мутации в половых клетках человека, и, во-вторых, для выявления потенциальных канцерогенов, то есть ХС, способных индуцировать мутации в соматических клетках человека. Теоретическое обоснование использования тестов на генотоксичность  для выявления потенциальных канцерогенов связано с представлением  о том, что в основе развития большинства опухолей, индуцированных  канцерогенами (по крайней мере, на стадии инициации), лежит  генотоксический эффект. Сами же тест-системы, используемые  для предсказания канцерогенной активности, получили статус "краткосрочных" тест-систем (КСТ),   под которым  следует понимать ускоренные методы (по отношению к стандартным методам определения канцерогенной активности на животных), позволяющие предсказывать канцерогенный риск для человека тех или иных ХС и основанных на определении биологической активности, прямо или косвенно связанной с канцерогенным потенциалом этих соединений (  2 ). Разработка КСТ  для предсказания канцерогенной  активности  основывается  на представлениях о механизмах действия канцерогенов, то есть, если конечным критерием тестирования на канцерогенность в опытах на животных является опухоль, то в КСТ- это те генетические или иные эффекты, которые ведут к ее возникновению.

        Таким образом, тесты на генотоксичность и их батарей могут быть использованы для определения как мутагенного,  так и канцерогенного потенциала ХС. Все зависит от схемы тестирования. Если для предсказания канцерогенного потенциала достаточно одного или двух этапов тестирования (на  1-м этапе  тестирование проводится в тесте  Эймса  и/или  на клеточных культурах, на 2-м этапе для тестирования используются животные и  регистрируется индукция  микроядер или хромосомных  аберраций в клетках костного мозга мышей), то для предсказания мутагенного потенциала для  половых клеток человека необходима оценка мутагенной активности в половых клетках   животных.

       Следует подчеркнуть, что  широко используемые КСТ и подходы  к оценке мутагенного и канцерогенного потенциала, основаны на достижениях науки  70-х годов. Однако хорошая проработанность протокола проведения тестирования и валидизированность  самих  КСТ, а также наличие   достаточно солидной базы данных по результатам исследования генотоксичности с помощью этих тестов тысячи ХС делает их  вполне применимыми и сегодня.

      Благодаря достижениям  в технологии рекомбинантной ДНК в течение последних  2-х десятилетий произошли существенные изменения в области молекулярного генетического  анализа  и  цитогенетики. Новые методические приемы позволили вводить чужеродные гены в клетки млекопитающих и конструировать сигнальные системы для мутационного анализа.  Так, методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования ДНК  по сути дела сделали революцию в этой области и в настоящее время широко используются для определения типа мутаций в сайтах или кодонах их локализации. Одновременно были достигнуты существенные успехи в изучении механизмов развития опухолей. Если  в течение многих десятилетий развитие опухолей рассматривали как следствие изменений стадий прогрессии и развития опухолей, то в настоящее время больше внимания привлекает точка зрения о том, что рак является следствием ошибки в нормальном жизненном цикле клетки  ( 9  ). Так, изменения в контроле роста клеток может быть результатом функциональных изменений в белках, влияющих на «контрольные точки» или  альтернативные пути клеточного деления. Эти функциональные изменения являются часто следствием мутации  в критических сайтах генов, которые изначально  были идентифицированы как онкогены или антионкогены, то есть опухоль-супрессорные гены (16). Генетические изменения именно в  критических сайтах таких генов, по-видимому, имеют непосредственное  отношение к развитию опухолей, тогда как генетические изменения в других частях генома не имеет или имеет мало последствий. Например, мутации в критических сайтах  опухоль-супрессорного гена р53 предрасполагают к развитию широкого спектра опухолей у человека и, особенно, лимфолейкозов и опухолей молочной железы (16,21). Многочисленные исследования функции онкогенов и антионкогенов показало, что они, как правило, кодируют белки, участвующие в сложной системе  позитивной и негативной регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки.

   Технология рекомбинантной ДНК позволяет конструировать клетки и организмы, содержащие чужеродные гены и  создавать   новые тест-системы для обнаружения мутагенного  или канцерогенного  потенциала ХС. Созданы рекомбинантные клеточные системы, в которых  репортерный ген находится под контролем промоторов, которые активируются под действием генотоксичных ХС. Экспрессию репортерного гена отслеживают биохимическими методами.  Наиболее  ярким примером является  бактериальный  SOS-хромотест, разработанный в 70- и 80-е годы, в котором  экспрессия  галактозидазного гена свидетельствует об активации генов    SOS-ответа (22).

     Ряд трансгенных мышиных моделей  были  созданы  позже на таком же принципе. Трансгенные мыши  Big Blue  и  Mutamouse  содержат в своем  геноме множественные тандемные дупликации  бактериального  lac-гена (19). Наиболее распространенная модель Big Blue  имеет в своем геноме шаттл вектор фага    (  LIZ), который в качестве мишеня содержит ген lacI,  а в качестве репертора - ген lacZ. После обработки мышей изучаемым агентом, выделяется геномная ДНК из  клеток интересующих  исследователей тканей и затем, используя  упаковочный экстракт фага,  из этой ДНК выделяют  вектор LIZ.  Инфекция клеток E.coli SCS-8  этим фагом позволяет обнаруживать фаги, несущие мутантный ген lacI. Если нормальная функция гена –репрессора  lacI  нарушена, то экспрессируется  ген lacZ, продукт которого,  -галактозидаза, легко обнаруживается по голубому цвету фаговых бляшек в присутствии хромогенного субстрата Х-gal. Подсчет отношения мутантных голубых бляшек к бесцветным немутантным бляшкам позволяет определить частоту мутации  в интересующей ткани (25). В настоящее время с помощью этой модели исследована  мутагенная активность  в различных органах мышей ряда  известных канцерогенов, как афлатоксин В1, 7,12-диметилбензантрацен  и другие (11,15,27). Ценность  данной модели заключается в возможности оценивать мутагенную активность ХС в органах-мишенях и сравнивать ее  с активностью в других органах и тканях. Например, показано, что  уровень мутагенной активности афлатоксина В1    в различных органах мышей  коррелирует с  данными исследования органной специфичности   его канцерогенного действия (11 ).

     Созданы трансгенные модели и для  тестирования канцерогенной

и опухоль-промотирующей активности ХС. Гетерозиготные по мутациям в опухоль- супрессорном гене р53 мыши имеют нормальный уровень спонтанных опухолей, однако отличаются  более укороченным латентным периодом развития опухолей. Такие животные успешно используются для тестирования  генотоксичных канцерогенов (10 ). Мыши TG.AC несут  в своем геноме v-HA-ras

онкоген слитый с промотором фетального глобинового гена (17). Трансген v-Ha-ras  активирован и содержит мутации в кодонах 12 и 59. Показано, что  этот онкоген не экспрессируется конститутивно в кожной ткани мышей  TG.AC  и  поэтому кожа необработанных мышей не отличается от кожи исходной линии мышей  FVB/N. Однако у гетерозиготных или гомозиготных мышей TG.AC , получавших повторяющиеся дозы 12-о-тетрадеканоилфорбол-13-ацетат, или другие описанные в литературе промоторы опухолей  быстро  в течение 4-5 недель,  образуются плоскоклеточные папилломы, переходящие в злокачественные  опухоли (17). Эти  данные позволили сделать заключение о том, что  мыши TG.AC несут  в своем геноме активированный  онкоген, который  «преиницирует» мышей, то есть заменяет этап инициации (мутагенеза) канцерогенеза и тем самым  повышает эффект  действия промоторов.

      Число трансгенных моделей растет с каждым годом. И это является  результатом  не только развития новых методических приемов, но и  результатом расширения наших знаний о механизмах  развития опухолей и путей их  генетического контроля.

     В настоящее время  разработан ряд цитогенетических методов, основанных также на  новых технологиях  молекулярной биологии. Известно, что  гибридизацию ДНК можно проводить не только на геле, на фильтрах или в растворе, но и на гистологических или  хромосомных  препаратах  (гибридизация in situ). Метод, при котором в качестве зондов для гибридизации используют меченые флуорохромом препараты ДНК, получил название FISH-метод (fluorescein in situ hybridization). Анализируемые с помощью этого метода генетические мишени определяются составом зондов или последовательностей, представляющих собой  уникальные фрагменты ДНК. При наличии зондов метод позволяет  исследовать распределение по геному повторяющихя последовательностей, клонированных фрагментов ДНК, внутрихромосомную локализацию уникальных генов, а также обнаруживать  крупные хромосомные изменения, включая делеции, дупликации и транслокации (26).  FISH-метод чаще всего используется для обнаружения анеуплодии в соматических или половых клетках человека и грызунов (28 ).Для этого используются ДНК-зонды к хромосомам, анеуплоидия по которым приводит к тяжелым последствиям у человека ( например, по хромосомам  21 , Х и У). Разработан  вариант метода, позволяющий оценивать наличие  анеуплоидии одновременно по трем хромосомам (  26). Важным аспектом использования FISH-метода является возможность сравнения генетических эффектов исследуемых ХС  одновременно в соматических и половых клетках.

       Метод анализа единичных клеток (Comet assay) позволяет идентифицировать генетические повреждения и нитевые разрывы ДНК в небольшом числе клеток из любого источника (человек или грызуны). Суть метода заключается в том, что образцы клеток лизируют в щелочных условиях и подвергают электрофорезу. Клетки, содержащие  разрывы ДНК проявляются в виде "кометы"  с хвостом из фрагментов ДНК, отходящих от основного ядра (12). Технология метода Comet assay, в отличие от метода  щелочной элюции  ДНК ( 1  ), достаточно проста и может быть использована для  широкого круга ситуаций, когда необходимо определить наличие разрывов  и щелочелабильных  сайтов в ДНК клеток  из различных тканей  человека и животных. При этом анализируется только небольшое число клеток, что делает метод очень удобным при его использовании для тестирования  ХС на  генотоксичность  в клетках  млекопитающих.

       Современные методы анализа  ДНК-аддуктов  отличаются высокой чувствительностью и позволяют обнаруживать аддукты ДНК с генотоксикантом в пределах доз, которым подвергается человек (23). Метод особенно полезен когда природа аддукта известна и связь между аддуктом и конечным биологическим эффектом установлена.  Он успешно был использован для определения воздействия   на человека сигаретного дыма, профессиональных факторов, микотоксинов и химиотерапевтических агентов (20,24). Анализ аддуктов ДНК может быть одним из методов прямого сравнения экспериментальных данных на животных и данных на человеке  и представляет собой значительную ценность в разрешении вопросов дозовой  экстраполяции и оценки риска для человека.

     Для мутационного анализа в эндогенных генах человека наиболее   подходящим  является ген  hprt. Метод селекции   мутантных клеток  по этому гену хорошо разработан (6 ). Например, можно проводить  анализ этих мутаций в лимфоцитах человека, то есть в клетках легко доступной ткани человека, накапливающей мутации в течение многих лет.  Суицидная селективная система позволяет выживать клеткам с мутантным или неактивным геном  hprt, тогда как нормальные клетки в этих условиях погибают. Метод  позволяет отслеживать мутацию   в Х-хромосоме и, соответственно,  только у мужчин.  Данная система является пионером в мониторинге человеческих популяций и может быть полезной для проведения сравнения человек -экспериментальная модель.

      Проводится большая работа  по оценке возможностей новых методов и по их валидизации. Вышеописанные методы могут быть включены  или уже включены  в схему дополнительного тестирования. Следует отметить, что результаты, полученные с помощью дополнительных методов, могут играть в принятии решений такую же роль,  как и результаты, полученные с помощью стандартных методов. В этом отношении  большие перспективы  имеют тесты с использованием трансгенных животных, которые позволяют, по оценкам ряда исследователей, в течение  6 месяцев   получить информацию сравнимую с информацией, получаемой в результате биотестирования   на грызунах течение 2-х лет.

       Для успешной интеграции в схему  генотоксической оценки новые методы  должны быть усовершенствованы с  целью  упрощения технологии их выполнения, валидизированы  и приняты для общего использования, что требует   согласия  на  уровне научных, промышленных и правительственных кругов.

**Дәріс 14**

ОЦЕНКА МУТАГЕННЫХ СВОЙСТВ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

Исследование мутагенности новых фармакологических средств и вспомогательных компонентов лекарственных форм проводится на этапе доклинического изучения безопасности их применения. Эта работа предусматривает оценку способности лекарственных средств к индукции разных типов мутаций в зародышевых и соматических клетках и делает необходимым использование для оценки мутагенных свойств лекарств комплекса методов, выполняемых на разных тест-объектах. Опыт работы по тестированию лекарств, накопленный различными группами исследователей с момента выхода первой редакции "Методических рекомендаций по оценке мутагенности новых лекарственных средств" (1981), показывает, что целесообразным представляется использование этапного подхода, сводящегося к следующему: на уровне доклинических испытаний следует использовать минимальный набор методов для оценки лекарств на мутагенность, а именно - 1) учет хромосомных аберраций или микроядер в клетках костного мозга млекопитающих и 2) учет генных мутаций с использованием в качестве тест-объекта микроорганизмов или дрозофилы. При условии получения отрицательных результатов препарат может быть допущен к первой фазе клинических испытаний. Перед второй фазой клинических испытаний необходимо провести изучение способности лекарственного препарата индуцировать мутации в зародышевых клетках мышей (доминантный летальный тест). В случае отсутствия мутагенной активности можно продолжить клинические испытания. Если в отдельных тестах получены неоднозначные, но воспроизводимые результаты, то на заключительных этапах клинических испытаний следует провести исследование уровня хромосомных аберраций в лимфоцитах периферической крови леченных больных. Дополнения и уточнения регламента выполнения рекомендованных методов и трактовка экспериментальных результатов описаны в соответствующих разделах.

Изучение генетической активности лекарственных средств требует профессиональной подготовки.

Данные методические рекомендации описывают комплексную систему проверки генетической активности новых лекарственных средств, но не являются пособием для освоения методов. Последние в должном объеме можно освоить только в результате стажировки в лабораториях соответствующего профиля.

Принципы отбора фармакологических средств для испытания на мутагенную активность

Тестированию на мутагенную активность подвергаются новые оригинальные фармакологические средства, созданные химическими, биотехнологическими, генноинженерными и иными способами, включая полученные из сырья природного происхождения. Новые фиксированные комбинации фармакологических средств, планируемые для широкого клинического применения, при структурном сходстве компонентов комбинации с известными канцерогенами, мутагенами или их метаболитами также подвергаются испытанию. Для анализа структурного сходства используется, во-первых, представительная база данных о мутагенных свойствах широкого круга химических соединений, и, во-вторых, специальные компьютерные программы [1,2].

2.2. Пути введения фармакологического средства, выбор доз, объекты исследования

Пути введения исследуемого фармакологического средства должны соответствовать планируемому способу приема лекарства человеком.

Если предполагается возможность энтерального и парентерального введения, можно использовать внутрибрюшинный, подкожный или внутримышечный способы введения. Фарма- кологические средства перорального применения изучают при внутрижелудочном пути введения. Изучение мутагенной активности ингаляционных анестетиков, мазей и т.п. проводят в условиях предполагаемого применения (ингаляционное, накожное) и при парэнтеральном введении.

Исследуемые фармакологические средства растворяют в дистиллированной воде или физиологическом растворе. Водонерастворимые препараты вводят с Твином-80 или используют растворители (этиловый спирт, диметилсульфоксид в конечной концентрации до 5 %); для перорального введения порошкообразных лекарств можно использовать растительное масло или 1% водный раствор крахмала.

Оптимальный объем вводимых растворов фармакологических средств и соответствующих растворителей (для контрольных групп животных) должен составлять при пероральном и внутрибрюшинном способах введения не более 0,5 мл и при внутримышечном - не более 0,2 мл.

Выбор доз для исследований определяется на основе результатов оценки острой токсичности и терапевтической эффективностью,фармакологического средства. Используются две дозы: одна соответствует предполагаемой суточной те- рапевтической дозе для человека, пересчитанной на поверхность тела экспериментального животного [3], а вторая выбирается на основе данных по острой токсичности и составляет 1/10 - 1/5 LDJO для используемого вида млекопитающих.

Проведение экспериментов in vivo диктует необходимость применения генетически однородных животных. При этом использование мышей предпочтительнее, однако не исключено применение других видов животных (половозрелых самцов и самок).