

*И.В. Завгородний, д.м.н., Е.Р.Грабовецкая,
Г. Ю.Пышнов, к. м. н.*

ТОКСИКОГЕНОМИКА КАК ОДНО ИЗ ПРИОРИТЕТНЫХ НАПРАВЛЕНИЙ В СОВРЕМЕННОЙ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ТОКСИКОЛОГИИ *

*Государственный медицинский университет МЗ Украины,
г.Харьков*

Институт медицины труда АМН Украины, г.Киев

У становление структуры двойной спирали ДНК послужило толчком для проведения важнейших фундаментальных исследований по изучению процессов репликации, транскрипции, синтеза белка, природы генетического кода, а также процесса и причин, вызывающих мутации. Вместе с тем, изучение факторов, приводящих к наследственным изменениям, проводилось еще задолго до открытия структуры ДНК. Так, Мюллер в 1927 г. продемонстрировал индукцию наследуемых мутаций у *Drosophila melanogaster* под воздействием рентгеновского излучения, за что был награжден в 1946 г. Нобелевской премией в области физиологии и медицины [31]. Значительно позже, в 1952 г., Херши и Чейз окончательно убедили научный мир в том, что гены находятся именно в ДНК [24], а Уотсон и Крик [43] предложили модель структуры ДНК. Эти, без преувеличения, революционные открытия, позволившие описать молекулярные механизмы взаимодействий токсических агентов и ДНК, объяснить возникновение мутаций и цитотоксических эффектов, послужили научной основой изучения мутагенеза и становления нового раздела современной токсикологии — генетической токсикологии.

Постепенно стало очевидно, что все организмы обладают генами, которые продуцируют специальные белки, чья основная функция — предотвратить либо исправить химические или физические повреждения ДНК. Такая активность, приз-

ванная защитить клетку от мутаций и смерти, вызванных химическими агентами, повреждающими ДНК, и стала основным предметом изучения генетической токсикологии, развитие которой пошло в двух направлениях. Первое — изучение молекулярных процессов, приводящих к индукции повреждения ДНК и проявлений токсических эффектов, второе — решение более общих вопросов о структуре и функции генов, влияющих на клеточную восприимчивость по отношению к токсическим агентам. Разница в указанных двух направлениях заключается в том, что первое изучает токсичность как результат генетического повреждения, а второе — участие генов в реализации клеточного ответа на воздействие вредных факторов окружающей среды. Оба эти направления, в свою очередь, развились в новую область, получившую наименование токсикогеномики. Ее появление в современных медико-биологических исследованиях можно считать одним из достижений в области геномной биотехнологии XX века.

Надо полагать, что токсикогеномика, являясь сегодня одной из приоритетных областей этих исследований, в скором времени будет играть важную роль в решении вопросов охраны окружающей среды и здоровья людей, поскольку главное ее направление — изучение взаимодействия генетического аппарата живых организмов и окружающей среды, анализ ответа со стороны генома на внешние воздействия и влияния токсикантов [16,17,19,21,

23, 32, 33, 38, 39, 41].

Экспериментальное изучение генотоксических эффектов воздействия химических соединений на организм человека является обязательным элементом токсикологической оценки новых веществ. Оно необходимо также для уже известных соединений, если существуют подозрения о возможном развитии специфических эффектов в отдаленные сроки, или если с ними контактируют большие контингенты, а надежные данные о безопасности в указанном отношении уровней содержания их во внешней среде отсутствуют [14]. На сегодняшний день накоплен большой опыт по выявлению и оценке генотоксических свойств ксенобиотиков [1-5, 7, 8, 10, 13, 15], в том числе применительно к вопросам гигиенического нормирования [9, 6] и биологического мониторинга [11].

Профилактические мероприятия для веществ, попадающих в среду обитания человека, разрабатываются на основе опытов на лабораторных животных. Однако выбор универсального вида животных для прогнозирования отдаленных эффектов для человека является проблемой [14]. Токсикогеномика позволяет проводить изучение генома и глобальной экспрессии генов в токсикологическом аспекте *in vitro* вместо использования животных в эксперименте [28].

С полной расшифровкой человеческого генома токсикология, а позднее токсикогеномика, получила уникальный инструмент для установления роли любого гена в реакции организма на вредные воздействия и защите от таковых воздействий агентов окружающей среды. Все болезни человека тем или иным образом зависят от генома. Одна группа заболеваний, собственно наследственные, является результатом проявления дефекта в структуре самого гена, а другая группа — следствием нарушения регуляции экспрессии генов, т.е. нормальный ген без структурных дефектов в результате воздействия на него вредных агентов окружающей среды (токсикантов) начинает функционировать ненормально, нарушается регуляция его экспрессии. Токсикогеномика применяет исследование экспрессии полного набора генов

* в порядке обсуждения

для изучения взаимосвязи между внешним воздействием на организм и болезнью, для понимания взаимодействий ген — окружающая среда и их влияний на здоровье человека.

Воздействие экзогенных химических веществ на человека, как известно, осуществляется на протяжении всей его жизни через воздух, воду, почву, пищу. Загрязнение окружающей среды разнообразными химикатами за последние десятилетия рассматривается как причина ухудшения состояния здоровья населения [34, 37, 40]. Следует отметить, что интенсификация производства, увеличение потоков информации, компьютеризация способствуют развитию так называемого хронического производственного стресса, который может лежать в основе появления "третьих состояний", в частности, хронического утомления, что снижает работоспособность, профессиональное долголетие и является плацдармом для развития различной патологии.

Первичной целью токсикологических исследований — экспериментальных и натуральных — является оценка влияния химических факторов окружающей среды на состояние здоровья животных и человека. При этом специалисты в области клинической токсикологии традиционно определяют как отдельные физические параметры (массу тела, органа, артериальное давление, уровень активности), так и гистологические характеристики образцов тканей (гистопатология), химические показатели крови для установления последствий вредных воздействий. Полученные данные являются важными диагностическими показателями, но они недостаточно информативны для понимания молекулярных механизмов токсичности, патогенеза развития заболевания. Традиционные токсикологические методы также обычно недостаточно чувствительны для установления низкоуровневой токсичности (проблема воздействия факторов малой интенсивности) или ранних доклинических этапов заболевания. Сегодня ученые имеют недостаточный объем информации о том, что происходит на генетическом уровне в промежуток времени между воздействием на организм токсического вещества и последствиями, например развитием забо-

левания. Именно поэтому перед токсикогеномикой стоит множество таких сложных задач, как идентификация общих вариаций ДНК, особенно полиморфизма одиночных нуклеотидов в составе генов, которые влияют на клеточные ответы на токсичные внешние агенты; установление структуры и изменчивости генов, которые связаны с заболеваниями, индуцированными неблагоприятными факторами окружающей среды; предсказание возможного ответа организма на воздействие токсичных веществ. Однако со временем стало очевидным, что просто идентифицировать изменения в генах не достаточно. Необходимо изучать экспрессию генов, изменяющих свою активность в зависимости от внешних воздействий, процессы модификации продуктов экспрессии в клетках, их изменение во времени под воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды. Токсикогеномика потребует накопления и ассимиляции таких объемов токсикологических данных, которые ранее были недостижимы. Необходимо классифицировать огромное число медицинских препаратов, химикатов, других агентов окружающей среды, разнообразных веществ, обладающих определенными биологическими свойствами. Сложнейшие биохимические изменения в организме должны быть описаны как функция времени, дозы, стадии развития. Необходимо определить восприимчивость человека к болезням, детерминированную множественными генетическими особенностями. Все эти факторы имеют критическое значение для понимания последствий токсических воздействий на здоровье человека и окружающую среду.

Токсикогеномика изучает гены и их продукты, которые играют важную роль в адапционном ответе организма на токсические воздействия [27]. За последнее время токсикогеномика стала наукой, которая объединяет генетику, транскриптомику (экспрессия мРНК на геномном уровне), протеомику (экспрессия белков на уровне клеток и тканей), метабомику (детальное описание метаболитов), биоинформатику и токсикологию в попытке понимания роли взаимодействия ген — окружающая среда в развитии заболевания [18, 27, 29, 30, 32, 36, 38].

Токсикогеномный анализ является мощным инструментом для мониторинга экспрессии тысяч генов одновременно. Изучение транскриптома приведет к идентификации минимального набора генов и белков, которые могут быть биомаркерами специфических токсических эффектов [20, 26, 36].

За последнее время разработаны новые методы и технологии, которые позволяют оценивать токсичность веществ и патогенез заболеваний на молекулярном уровне с целью достижения полнейшего понимания механизмов неблагоприятных воздействий факторов внешней среды на человека и предотвращения таковых.

Одним из важнейших инструментов, используемых в токсикогеномных исследованиях, являются ряды микропроб ДНК (DNA microarrays) [22, 25, 35]. Технология рядов микропроб ДНК позволяет производить одновременную оценку транскрипции тысяч генов, используя микрочипы, содержащие тысячи образцов комплиментарной ДНК, иммобилизованной на специфическом носителе. Развитие этой во многом революционной технологии требует поиска возможностей синтеза и идентификации больших количеств образцов ДНК, которые соответствуют тысячам различных генов. Применение технологии также зависит от доступности информации о последовательностях ДНК в открытых базах данных. Следствием внешнего воздействия на генетический аппарат могут также быть изменения в структуре и функциях протеома (всей совокупности белков организма), который является объектом качественного и количественного изучения науки — протеомики. Возможно, что протеом человека никогда не будет исследован полностью в таком аспекте, в каком был расшифрован геном. Геном достаточно статичен, протеом же динамичен, он постоянно меняется в определенных пределах, и не только в рамках посттрансляционных модификаций, но и в зависимости от условий, состояния организма, со временем. В основе протеомики лежит выделение и идентификация белков. Работа в этой области велась с середины 70-х г.г. XX века и первый большой технологический прорыв произошел в 1975 г. когда в практике исследований стали

применять двумерный гель-электрофорез. Этот метод позволяет разделять сложные смеси белков в полиакриламидном геле по массе и заряду, однако он малоэффективен для идентификации белков. Вторым значительным достижением в области протеомики стало появление в 80-х гг. особых масс-спектрометрических методов для идентификации белков, определения их аминокислотной последовательности.

Процесс экспрессии генов служит своего рода шаблоном для синтеза белковых молекул, которые регулируют функциональную активность клетки. В настоящее время в некоторой степени известны и понятны нормальная генная последовательность, структуры транслированных белков и уровни активности. Результаты протеомных исследований дают чрезвычайно важную информацию о физиологических функциях на субклеточном, клеточном, органном и системном уровнях, что открывает новые горизонты для понимания молекулярных механизмов действия лекарств и развития заболеваний, эффектов воздействий на организм факторов окружающей среды. И хотя полная карта протеома человека, возможно, никогда не будет получена, есть надежда, что все же протеиновые карты отдельных человеческих органов, желез и жидкостей будут исследованы.

Протеомика включает в себя несколько различных субдисциплин, каждая со своим собственным подходом и вкладом в исследование протеома. Экспрессионная (описательная) протеомика ставит своей задачей оценить качественные различия определенных образцов, например белков здорового и больного

организмов, или белков до определенного воздействия и после него. Функциональная протеомика призвана анализировать и характеризовать специфические функции белков, включая различные взаимодействия, роль в механизмах развития заболеваний, выступление в качестве биомаркеров заболеваний или внешнего воздействия. Структурная протеомика концентрирует усилия на картировании структур протеиновых комплексов, присутствующих в определенных клеточных органеллах. Такая информация дает ценнейшие сведения о клеточной архитектуре, которая в большой степени влияет на клеточные функции. Основными методами, используемыми для характеристики этих сложнейших систем, являются рентгеновская кристаллография и структурное компьютерное моделирование. Токсикопротеомика использует весь арсенал доступных методов и технологий для определения клеточных и субклеточных механизмов ответа организма на влияние ксенобиотиков. Особый интерес в этой области представляет распознавание биомаркеров экзогенных воздействий.

Описанная выше технология рядов микропроб ДНК и технология протеомных исследований сделали возможным изучение биологических эффектов токсикантов, наблюдение множества биологических последствий внешних воздействий.

На основе приемов токсикогеномики построен известный метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Этот метод позволяет получить микропрограммы ДНК-копии сегментов ДНК или РНК, даже когда они присутствуют в виде единственной мо-

лекулы, как альтернативный способ амплификации специфических сегментов ДНК или РНК, присутствующих в больших популяциях молекул. Метод ПЦР широко используется в диагностике инфекционных заболеваний, также он может применяться для токсикометрической оценки безопасности генетически модифицированных микроорганизмов, продуктов питания [12].

Новые молекулярные технологии, такие, как анализ на основе рядов микропроб ДНК и протеиновые чипы, могут оценивать экспрессию сотен и тысяч генов и белков, давая возможность установить пути превращения токсикантов и мишени специфических химических веществ и лекарственных препаратов. Возможности и потенциал этих новых методов токсикогеномики в состоянии революционизировать область токсикологии.

В заключение необходимо подчеркнуть, что развитие и дальнейшее совершенствование токсикогеномных исследований обеспечит упрощение применения технологий экспрессии генов и белков, будет способствовать более глубокому пониманию взаимосвязи между воздействием химических факторов окружающей среды и восприимчивостью человека к болезни, обеспечит идентификацию биомаркеров заболеваний и воздействия токсических веществ, улучшит вычислительные методы оценки воздействия и ответов на них. Можно ожидать создание базы данных эффектов токсических веществ окружающей среды в биологических системах [42], что, в конечном итоге, обеспечит высокую точность прогноза восприимчивости организма к

ЛИТЕРАТУРА

1. *Барияк И. Р., Бышовец Т. Ф.* Исследование генотоксической активности бифенила и его хлорпроизводных. Медицинская генетика : Респ. межвед. сб. — Киев. — МЗ УССР, 1990. — Вып. 1. — С. 119-122.
2. *Васильева С. В., Махова Е. В., Ефременкова О. В., Бартошевич Ю. Э.* Генотоксическая и мутагенная активность противоопухолевых антрациклинов и их агликонов: изучение в двух тест-системах. // Генетика. — 1996. — 32, №2. — С. 233-239.
3. *Воскресенский О. Н., Левицкий А. П., Багирова Е. А., Ткаченко Е. К., Протункевич О. О.* Антимутагенные эффекты биотрита-С при воздействии генотоксикантов. // Вісн. стоматол. — 2001. — № 1. — С. 2-4.
4. *Дуган О. М., Мацяк А. В., Боднар Л. С., Барияк І. Р.* Деякі аспекти мутагенного забруднення водних об'єктів. // Environ. and Health. — 2000. — № 2. — С. 58-64.
5. *Дурнев А. Д., Усольцев М. В., Середенін С. Б.* Оценка генотоксичности диоксида флюорометрическим методом исследования целостности ДНК in vivo. 1-ый Съезд токсикологов России. (Тез. докл.) — М., 1999. — С. 324.
6. *Иванченко О. Б., Карамова Н. С., Шмидт М. А., Ильинская О. Н.* Токсикогенетические аспекты в регламентировании применения осадков сточных вод. // Токсикол. вестн. — 2001. — № 3. — С. 22-26.
7. *Карамова Н. С., Иванченко О. Б., Ильинская О. Н., Зобов В. В., Резник В. С., Шмидт М. А.* Токсические и генотоксические эффекты новоготетраакиламмониевого производного 6-метилурацила (соединение N 547). // Токсикол. вестн. — 2000. — № 3. — С. 12-15.
8. *Кривошеина Е. Л., Ермакова И. Н., Латышева Л. Н., Шибеев А. Н.* Изучение генотоксичности среды с использованием метода аномалий ядер лимфоцитов. IV Международ-

- ний конгресс "Эколого-социальные вопросы защиты и охраны здоровья молодого поколения на пути в XXI век" (Сб. материалов). — СПб, 1998. — С. 448-449.
9. Палагина И. А., Девейкис Д. Н., Ващук Н. А., Калюжный Г. Л. Выявление генотоксической и мутагенной активности дисперсных азокрасителей с целью их гигиенического нормирования. // Медицина труда и промышл. экология. — 1995. — № 5. — С. 12-15.
 10. Перминова И.Н., Синельщикова Т.А., Алехина Н.И., Перминова Е.В., Засухина Г.Д. Индивидуальная чувствительность к генотоксическому действию никеля и антимутагенной активности аскорбиновой кислоты. // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 2001. — 131, №4. — С. 437-441.
 11. Польский О.Г., Оситов А.Н., Сытин В.Д. ДНК-белковые шивки как критерий генотоксичности окружающей среды при проведении радиобиологического мониторинга пунктов захоронения радиоактивных отходов. 2-я Всерос. науч. конф. "Физ. пробл. экол.". — М., 1999. — С. 113-114.
 12. Проданчук Г.Н., Малышева Е.Е. Методы токсикогеномики в токсикометрии пищевых продуктов. Тези доповідей II з'їзду токсикологів України. — Київ, 2004. — С. 69.
 13. Тиктин Л. А., Главин А. А., Осинковская Н. Д., Михайленко В. М., Фурман М.А., Глушков П. В., Юхименко М. Д. Цито- и генотоксическая активность воды при включении в модельную аквасистему нитратов и канцерогенных нитрозаминов. Обращение канцерогенных N-нитрозосоединений в экосистемах. Тез. докл. II Всесоюз. симп. по экол. онкологии. — Киев, 1990. — С. 60.
 14. Токсикометрия химических веществ, загрязняющих окружающую среду. — М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1986. — 426 с.
 15. Харчевникова Н. В., Жолдакова З.И., Журков В. С. Химическая структура и генотоксичность в ряду галогензамещенных производных пропана и метана. // Гигиена и санитария. — 1997. — № 1. — С. 33-35.
 16. Aardema M., MacGregor J. Toxicology and genetic toxicology in the new era of "toxicogenomics": impact of "-omics" technologies. // Mutat. Res. — 2002. — 499, №1. — P.13 — 25.
 17. Afshari C. Perspective: microarray technology, seeing more than spots. // Endocrinology. — 2002. — 143, №6. — P.1983 — 1989.
 18. Bartosiewicz M., Troustine M., et al. Development of a toxicological gene array and quantitative assessment if this technology. // Arch. Biochem. Biophys. — 2000. — 376, № 66. — P.73.
 19. Burchiel S, Knall C., et al. Analysis of genetic and epigenetic mechanisms of toxicity: potential roles of toxicogenomics and proteomics in toxicology. // Toxicol. Sci. — 2001. — 59, №2. — P. 193 — 195.
 20. Duggan D., Bittner M., et al. Expression profiling using cDNA microarrays. // Nat. Genet. — 1999. — 21, № 10. — P 14.
 21. Fielden M, Zacharewsky T. Challenges and limitations of gene expression profiling in mechanistic and predictive toxicology. // Toxicol. Sci. — 2001. — 60, №1. — P. 6 — 10.
 22. Gerhold D., Rushmore T, Caskey CT. DNA chips: promising toys have become powerful tools. // Trends Biochem. — 1999. — 24, № 168. — P.173.
 23. Hamadeh H., Amin R., et al. An overview of toxicogenomics. // Curr. Issues Mol. Biol. — 2002. — 4, №2. — P. 45-56.
 24. Hershey AD., Chase M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. // J. Gen. Physiol. — 1952. — 36. — P.39- 56.
 25. Holden PR., James NH., Brooks AN., et al. Identification of a possible association between carbon tetrachloride — induced hepatotoxicity and interleukin — 8 expression. // J. Biochem. Mol. Toxicol. — 2000. — 14. — P.283- 290.
 26. Hossain M., Bouton C., et al. Induction of vascular endothelial growth factor in human astrocytes by lead. // J. Biol. Chem. — 2000. — 275. — P. 27847 — 27882.
 27. Iannaccone P. Toxicogenomics: "The Call of the Wild Chip." Environ. // Health Perspect. — 2001. — 109. — P. A8 — A11.
 28. Kind Clive N. Gene expression, genomics and their uses in vitro toxicology: 6 International ISSX Meeting, Munich, Oct. 7-11, 2001. // Drug Metab. Rev. — 2001. — 33, Suppl.1. — P. 35.
 29. Lobenhofer E., Bushel P., et al. Progress in the application of DNA microarrays. // Environ. Health Perspect. — 2001. — 109. — P. 881 — 891.
 30. Medlin J. Timely toxicology [Innovations]. // Environ. Health Perspect. — 1999. — 107. — P. A256 — A258.
 31. Muller HJ. Artificial transmutation of the gene. // Science. — 1927. — 46. — P. 84 — 87.
 32. Nuwaysir E., Bittner M., et al. Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. // Mol. Carcinog. — 1999. — 24. — P. 153 — 159.
 33. Olden K. New opportunities in toxicology in the post-genomic era. // Drug Discov. Today. — 2002. — 7, №5. — P. 273 — 276.
 34. Perera F., Illman S., et al. The challenge of preventing environmentally related disease in young children: community-based research in New York City. // Environ. Health Perspect. — 2002. — 110. — P. 197 — 204.
 35. Reilly TP., Bourdy M., Brady JN., et al. Expression profiling of acetaminophen liver toxicity in mice using microarray technology. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2001. — 282. — P. 321 — 328.
 36. Rocket J., Dix D. Application of DNA arrays to toxicology. // Environ. Health Perspect. — 1999. — 107. — P. 681 — 685.
 37. Safe S. Endocrine disruptors and human health — is there a problem? // Environ. Health Perspect. — 2000. — 108. — P. 487 — 493.
 38. Tennant R. The National Center for Toxicogenomics: using new technologies to inform mechanistic toxicology. // Environ. Health Perspect. — 2002. — 110. — P. A8 — A10.
 39. Thomas R., Rank D., et al. Identification of toxicologically predictive gene sets using cDNA microarrays. // Mol. Pharmacol. — 2001. — 60, №6. — P. 1189 — 1194.
 40. Toppari J, Larsen J., et al. Male reproductive health and environmental xenosystems. // Environ. Health Perspect. — 1996. — 104. — P. 741 — 776.
 41. Ulrich R., Friend S. Toxicogenomics and drug discovery: will new technologies help us produce better drugs? // Nat. Rev. Drug Discov. — 2002. — 1, №1. — P.84 — 88.
 42. Waters M., Boorman G., et al. Systems toxicology and the Chemical Effects in Biological Systems (CEBS) knowledge base. // Environ. Health Perspect. — 2003. — 111. — P.811 — 824.
 43. Watson JD., Crick FHC. The structure for deoxyribose nucleic acid. // Nature. — 1953. — 171. — P. 737 — 738.

І.В. Завгородній, Є.Р. Грабовецька, Г.Ю. Пишинов

ТОКСИКОГЕНОМІКА ЯК НОВИЙ НАПРЯМОК В СУЧАСНІЙ ПРОФІЛАКТИЧНІЙ ТОКСИКОЛОГІЇ

Токсикогеноміка - наукова галузь, яка об'єднує генетику, транскриптоміку, протиоміку, метаболоміку, біоінформатику, і має за мету ідентифікувати та характеризувати механізми токсичності різноманітних речовин, які діють на людину, та відповідь організму на зовнішній вплив.

І.В. Zavgorodniy, E.R Grabovetskaya, G.U. Pyshnov

TOXICOGENOMICS - THE NEW SCIENTIFIC FIELD IN MODERN PROPHYLACTIC TOXICOLOGY

The article is devoted to the new field in prophylactic toxicology - toxicogenomics. Toxicogenomics is the new science which unite genetics, transcriptomics, proteomics, metabonomics, bioinformatics in an effort to identify mechanisms of toxicity of different substances influencing the human organism, and to characterize the response of the organism on the external factors.