

## ПРОГРАММА

спецкурса “Молекулярные механизмы токсических процессов”

Лектор - д.б.н., доц. Л.Ф. Гуляева.

**1.1** Ест.-научная дисциплина, вузовская.

**1.2.** Основной целью освоения курса является изучение молекулярных механизмов действия токсических соединений на живые системы. Для достижения поставленной цели решаются следующие задачи:

1. Изучение метаболизма экзогенных и эндогенных соединений ферментами 1-й и 2-й фаз метаболизма ксенобиотиков

2. Рассмотрение механизмов взаимодействия высокоактивных метаболитов этих соединений с макромолекулами клетки

3. Изучение механизмов повреждения генов-мишеней для канцерогенов и мутагенов, приводящих к нарушению таких фундаментальных процессов, как клеточное деление, апоптоз, межклеточные взаимодействия.

**1.3.** По окончании дисциплины студенты будут иметь представления об основных механизмах действия токсических соединений на живые организмы и способах защиты от их действия. У них будут сформированы современные представления о химически индуцированном мутагенезе, канцерогенезе, тератогенезе и апоптозе.

**1.4** Итоговый контроль – экзамен.

**2.1.** Новизна настоящего курса состоит в том, что в нем представлены современные данные о механизмах действия химических канцерогенов и мутагенов, а также новые результаты о генах-мишенях, регулирующих фундаментальные клеточные события (пролиферация, дифференцировка, апоптоз). Актуальность курса диктуется необходимостью изучать биологические эффекты токсических соединений, влияние которых на организм человека постоянно растет.

**2.2** Тематический план курса (распределение часов).

| Наименование разделов и тем                                          | Лекции | Самост. Работа | Всего часов |
|----------------------------------------------------------------------|--------|----------------|-------------|
| Общие принципы токсикологии                                          | 2      | 2              | 4           |
| Современные представления о механизмах биотрансформации              | 2      | 1              | 3           |
| Структура и функция микросомной монооксигеназной системы (ММС)       | 2      | 1              | 3           |
| Ферменты 2-ой фазы метаболизма ксенобиотиков                         | 2      | 1              | 3           |
| Механизмы химического канцерогенеза                                  | 4      | 1              | 5           |
| Аддукты метаболитов с биологическими макромолекулами.                | 2      | 1              | 3           |
| Механизмы мутагенеза                                                 | 2      | 1              | 3           |
| Свободные радикалы кислорода в механизмах канцерогенеза              | 2      | 1              | 3           |
| Механизмы регуляции клеточного деления                               | 2      | 1              | 3           |
| Клеточные и вирусные онкогены                                        | 2      | 1              | 3           |
| Раковые супрессорные гены (РСГ)                                      | 2      | 1              | 3           |
| Протоонкогены в передаче клеточных сигналов                          | 2      | 1              | 3           |
| Молекулярные механизмы программированной клеточной гибели (апоптоза) | 2      | 1              | 3           |

|                                                 |    |    |    |
|-------------------------------------------------|----|----|----|
| Механизмы действия негенотоксичных канцерогенов | 2  | 1  | 3  |
| Механизмы тератогенеза                          | 2  | 1  | 3  |
| Итого по курсу:                                 | 32 | 16 | 48 |

## 2.3 Содержание отдельных разделов и тем:

### I. Общие принципы токсикологии

1. Молекулярная токсикология как наука о механизмах детоксификации чужеродных соединений, метаболических путях их превращений и биологических последствиях.
2. Распределение, экскреция и абсорбция токсикантов.
3. Биотрансформация токсикантов и химических канцерогенов.
4. Депонирование ксенобиотиков, роль печени и почек

### II. Современные представления о механизмах биотрансформации чужеродных соединений

1. Окружающая среда как источник многочисленных веществ, чужеродных для человека.
2. Определение I-й и II-й фаз метаболизма.
3. Детоксификация как функция защиты от химических соединений.
4. Усиление токсичности (токсификация) как негативное проявление действия ксенобиотиков.
5. Характеристика ферментных систем, осуществляющих реакции окисления ксенобиотиков. Оксидазы и оксигеназы со смешанными функциями

### III. Структура и функция микросомной монооксигеназной системы (ММС)

1. Общие представления о функционировании ферментов монооксигеназной системы животных и человека.
2. Активация кислорода как универсальный механизм действия ферментов МОС. Микросомальная цепь переноса электронов.
3. Основные реакции, катализируемые цитохромом P450.
4. Современные представления о строении P450.
5. Генная классификация цитохрома P450. Основные функции согласно классификации.
6. Индукция ферментов МОС.
7. Молекулярные механизмы активации генов P450 и других ферментов, окисляющих ксенобиотики.
8. Рецепторный механизм активации генов CYP1A.
9. Молекулярная характеристика Ah-рецептора и ARNT белка.
10. Роль факторов транскрипции и белков теплового шока в активации генов некоторых P450.
11. CYP2E1 и метаболизм этанола. Особенности регуляции активности фермента.
12. Орфановые рецепторы в регуляции генов CYP2B и CYP 3A.
13. Цитохром P450 в метаболизме эндогенных соединений. Ароматаза (CYP19) в синтезе эстрогенов. Ткане-специфичная регуляция, концепция локального синтеза эстрогенов, роль в канцерогенезе.

### IV. Ферменты 2-ой фазы метаболизма ксенобиотиков

1. Глюкуронидация как один из основных механизмов конъюгации ксенобиотиков и эндогенных соединений. УДТ1 и УДТ2 семейства генов.
2. Роль сульфотрансфераз в процессах детоксификации. Современная классификация ферментов. Синтез кофактора PAPS. Сульфотрансферазы в метаболизме эндогенных соединений (тиреоидные и стероидные гормоны).
3. Реакции ацетилирования. NAT1 и NAT2 классы ферментов. N-ацетил-трансфераза и рак.
4. Характеристика суперсемейства глутатион-S-трансфераз. Реакции детоксификации.
5. Микросомальная эпоксидгидролаза в катализе особо токсичных соединений.
6. Хинон-редуктаза в метаболизме хинонов.

## **У. Механизмы химического канцерогенеза**

1. Классификация химических канцерогенов. Генотоксичные и негено-токсичные канцерогены.
2. ДНК - критическая мишень для канцерогенов.
3. Полициклы, азосоединения, природные и неорганические канцерогены в этиологии рака.
4. Эпигенетические канцерогены
  - цитотоксины, - пластик
  - гормоны и иммуносупрессоры
  - пероксисомальные пролифераторы.

## **УІ. Аддукты метаболитов с биологическими макромолекулами.**

1. Механизмы связывания реактивных метаболитов с ДНК и белками.
2. Аддукты известных канцерогенов человека и животных.
3. Методы выявления аддуктов с ДНК и белками.
4. Аддукты и канцерогенез.

## **УІІ. Механизмы мутагенеза**

1. Трансзиция и трансверсия нуклеотидов.
2. Современные методы тестирования мутагенных эффектов канцерогенов
  - тест Эймса.
  - шатловые векторы (вирусы SV40, Эпштейна-Барра)
  - Mut S - тест.
3. Механизмы возникновения мутаций под действием ультрафиолетового излучения.
4. Алкилирование ДНК (на примере иприта).
5. Алкилирование ДНК и индукция опухолей у мышей.
6. Аралкилирование ДНК и мутагенез.
7. Роль аддуктов канцерогенов с ДНК в развитии мутаций.
8. "Горячие точки" мутаций (на примере гена HPRT).
9. Регуляция мутационных процессов репарацией и репликацией ДНК. BER и NER репарация. Метилтрансферазы в репарации аддуктов.
10. Rec A, Umu D и Umu C белки в SOS ответе.
11. Метилирование ДНК и канцерогенез. Биохимия метилирования. Эпигенетическая составляющая канцерогенеза.

## **УІІІ. Свободные радикалы кислорода в механизмах канцерогенеза**

1. Эндогенные свободные радикалы кислорода
2. Механизмы повреждения клеточной мембраны
3. Роль перекисного окисления липидов в генерации повреждений ДНК
4. ДНК-аддукты свободных радикалов кислорода.
5. Стресс-активированные пути передачи клеточного сигнала.

## **ІХ. Механизмы регуляции клеточного деления**

1. G1/S и G2/M - критические точки регуляции клеточного цикла
2. Роль циклинов и их киназ в делении клетки. Ингибиторы и активаторы Cdc.
3. Киназа M-фазы в регуляции митоза. Белки-мишени для киназы.

## **Х. Клеточные и вирусные онкогены**

1. Иммортизация и трансформация клеток
2. Протоонкогены и раковые супрессорные гены
3. Онкогенные вирусы (полиомы, папилломы, Эпштейна-Барра и ретровирусы)
4. Ретровирусные онкогены и их клеточные аналоги
5. Характеристика RAS онкогенов
6. Активация онкогенов
  - вставки (инфицирование вирусами на примере гена c-myc)
  - транслокации (лимфома Беркитта, Филадельфийская хромосома)

## **ХІ. Раковые супрессорные гены (РСГ)**

1. RB белок в регуляции клеточного цикла

2. p53 в канцерогенезе. Структура и функция белка, механизмы его активации.
3. Другие РСГ

## **XII. Протоонкогены в передаче клеточных сигналов**

1. Характеристика белков сигнальной трансдукции клеток
2. Факторы роста (GF) как инициаторы сигналов. Способы передачи сигнала.
3. Роль G-белков в сигнальной трансдукции
4. Принципиальная схема передачи клеточных сигналов на примере RAS/ RAF/MAPK пути.
  - рецепторы факторов роста (GFR) и цитоплазматические тирозин-киназы.
  - фосфорилирование мембраносвязанных рецепторов факторов роста.
  - механизмы активации RAS и RAF белков.
  - активация MAP-киназного пути. Киназы MAP-киназ.
  - онкобелки в регуляции экспрессии генов.

## **XIII. Онкогены как критические мишени в молекулярной патологии.**

1. Мутации в онкогенах и РСГ.
2. Аллель-специфическая активация и экспрессия K-ras гена в химическом канцерогенезе
3. Мутации c-ras гена и химически индуцируемый рак печени
4. Роль c-тус белка в развитии патологий сердечной мышцы
5. Современные тенденции в генотерапии рака
6. Биохимия метастазов

## **XIV. Молекулярные механизмы программированной клеточной гибели (апоптоза)**

1. Морфологические и биохимические особенности апоптоза и некроза
2. Инициация апоптоза. Основные сигнальные молекулы.
3. Роль клеточных онкогенов Белки p53 и bax как индукторы, bcl-2 как супрессор апоптоза. Каспазы в инициации и реализации апоптоза.
4. Регуляция программированной клеточной гибели.

## **XV. Механизмы действия негенотоксичных канцерогенов**

1. Канцерогены как эффекторы эпигенетических изменений.
  - Прямая инактивация белков-репрессоров.
  - Изменение процесса метилирования.
  - Повреждение ДНК-связывающей активности факторов транскрипции.
  - Усиление репликации ДНК.
2. Активации митотической рекомбинации на примере Афлатоксина В1.
3. Нарушение межклеточных взаимодействий. Роль коннексинов.
4. Кадгерины и катенины - роль в сигнальной трансдукции и прогрессии рака.

## **XVI. Механизмы тератогенеза**

1. Генетическая токсикология. Классификация генетических повреждений.
2. Специфичность генетических повреждений, вызванных физическими или химическими агентами.
3. Дозо-зависимые механизмы действия тератогенов
4. Механизмы действия цитотоксичных тератогенов. Воздействие на клеточную дифференцировку.
5. Полихлорированные ароматические углеводороды (TCDDs, PCBs, PCDFs) и нарушение развития.
6. Распределение и биотрансформация ксенобиотиков при беременности.

## **2.4. Перечень примерных заданий для самостоятельной работы:**

1. В рамках данного курса предлагается проведение теста по метаболизму ксенобиотиков.

Ниже приведены примеры такого теста

1. Какие из перечисленных соединений окисляет P450:
    - стероиды
-

- аминокислоты \_\_\_\_\_
- нуклеотиды \_\_\_\_\_
- 2. К эпигенетическим канцерогенам относятся:
  - нитрилтриуксусная кислота \_\_\_\_\_
  - этанол \_\_\_\_\_
  - бензо(а)пирен \_\_\_\_\_
  - аминофлюорен \_\_\_\_\_
- 3. Какой из ферментов не относится ко 2-й фазе метаболизма ксенобиотиков:
  - ацетилтрансфераза \_\_\_\_\_
  - хинон-редуктаза \_\_\_\_\_
  - каталаза \_\_\_\_\_

### 3.1 Учебно-методическое обеспечение дисциплины.

### 3.3. Образцы вопросов для экзаменов

Экзаменационный билет состоит из двух вопросов:

1. Структура и функция цитохрома P450
2. Основные пути передачи клеточного сигнала. Роль белков RAS/RAF/MAP или
1. Механизмы образования аддуктов канцерогенов с ДНК и белками
2. Эпигенетические механизмы канцерогенеза. Роль метилирования ДНК.

### 3.4 СПИСОК РЕКОМЕНДОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Гуляева Л.Ф., Гришанова А.Ю. и др. Микросомная монооксигеназная система живых организмов в биомониторинге окружающей среды. Аналитический обзор. ГПНТБ, Новосибирск, 1994 - 98 с.
2. Гуляева Л.Ф., Вавилин В.А., Ляхович В.В. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков в химическом канцерогенезе. Аналитический обзор. ГПНТБ, Новосибирск, 2000 - 90 с.
3. Claassen C.D. " Toxicology . The basic Science of poisons". 1 - New York, Chicago, Toronto, London. Sixth Edition, 2001 - 1236p.
4. McKinnell R.G., Parchment R.E., Perantoni A.O., Pierce G.B. "The Biological Basis of Cancer", Cambridge University Press, 1998 - 378p.
5. David P. Josephy. "Molecular Toxicology", Oxford University Press, 1997- 367 p.
6. Lewin "Gene", Oxford University Press, 2000 - 990p.
7. В.Д. Самуилов, А.В. Алескин, Е.М., Лагунова. Программированная клеточная гибель. Обзор. Биохимия, 2000, т. 65, вып. 8, с. 1029-1046.
8. Обзорные статьи по биохимии рака. Биохимия, 2000, т. 65, вып. 1, с. 3 -139
9. Райс Р.Х. и Гуляева Л.Ф. Биологические эффекты токсических соединений. Курс лекций. Из-во НГУ, 2004, - 210 с.

Программу составила д.б.н. Л.Ф. Гуляева **I. Общие принципы токсикологии**

1. Молекулярная токсикология как наука о механизмах детоксификации чужеродных соединений, метаболических путях их превращений и биологических последствиях.
2. Распределение, экскреция и абсорбция токсикантов.
3. Биотрансформация токсикантов и химических канцерогенов.
4. Депонирование ксенобиотиков, роль печени и почек

### **II. Современные представления о механизмах биотрансформации чужеродных соединений**

1. Окружающая среда как источник многочисленных веществ,

- чужеродных для человека.
2. Определение I-й и II-й фаз метаболизма.
  3. Детоксификация как функция защиты от химических соединений.
  4. Усиление токсичности (токсификация) как негативное проявление действия ксенобиотиков.
  5. Характеристика ферментных систем, осуществляющих реакции окисления ксенобиотиков. Оксидазы и оксигеназы со смешанными функциями

### **III. Структура и функция микросомной монооксигеназной системы (ММС)**

1. Общие представления о функционировании ферментов монооксигеназной системы животных и человека.
2. Активация кислорода как универсальный механизм действия ферментов МОС. Микросомальная цепь переноса электронов.
3. Основные реакции, катализируемые цитохромом P450.
4. Современные представления о строении P450.
5. Генная классификация цитохрома P450.  
Основные функции согласно классификации.
6. Индукция ферментов МОС.
7. Молекулярные механизмы активации генов P450 и других ферментов, окисляющих ксенобиотики.
8. Рецепторный механизм активации генов CYP1A.
9. Молекулярная характеристика Ah-рецептора и ARNT белка.
10. Роль факторов транскрипции и белков теплового шока в активации генов некоторых P450.
11. CYP2E1 и метаболизм этанола. Особенности регуляции активности фермента.
12. Орфановые рецепторы в регуляции генов CYP2B и CYP 3A.
13. Цитохром P450 в метаболизме эндогенных соединений. Ароматаза (CYP19) в синтезе эстрогенов. Ткане-специфичная регуляция, концепция локального синтеза эстрогенов, роль в канцерогенезе.

### **IV. Ферменты 2-ой фазы метаболизма ксенобиотиков**

1. Глюкуронидация как один из основных механизмов конъюгации ксенобиотиков и эндогенных соединений. УДТ1 и УДТ2 семейства генов.
2. Роль сульфотрансфераз в процессах детоксификации. Современная классификация ферментов. Синтез кофактора PAPS. Сульфотрансферазы в метаболизме эндогенных соединений (тиреоидные и стероидные гормоны).
3. Реакции ацетилирования. NAT1 и NAT2 классы ферментов. N-ацетил-трансфераза и рак.
4. Характеристика суперсемейства глутатион-S-трансфераз. Реакции детоксификации.
5. Микросомальная эпоксидгидролаза в катализе особо токсичных соединений.
6. Хинон-редуктаза в метаболизме хинонов.

### **V. Механизмы химического канцерогенеза**

1. Классификация химических канцерогенов. Генотоксичные и негено-токсичные канцерогены.
2. ДНК - критическая мишень для канцерогенов.
3. Полициклы, азосоединения, природные и неорганические канцерогены в этиологии рака.
4. Эпигенетические канцерогены
  - цитотоксины, - пластик
  - гормоны и иммуносупрессоры
  - пероксисомальные пролифераторы.

### **VI. Аддукты метаболитов с биологическими макромолекулами.**

1. Механизмы связывания реактивных метаболитов с ДНК и белками.
2. Аддукты известных канцерогенов человека и животных.
3. Методы выявления аддуктов с ДНК и белками.
4. Аддукты и канцерогенез.

### **VII. Механизмы мутагенеза**

1. Трансзиция и трансверсия нуклеотидов.
2. Современные методы тестирования мутагенных эффектов канцерогенов
  - тест Эймса.
  - шатловые векторы (вирусы SV40, Эпштейна-Барра)
  - Mut S - тест.
3. Механизмы возникновения мутаций под действием ультрафиолетового излучения.
4. Алкилирование ДНК (на примере иприта).
5. Алкилирование ДНК и индукция опухолей у мышей.
6. Аралкилирование ДНК и мутагенез.
7. Роль аддуктов канцерогенов с ДНК в развитии мутаций.
8. "Горячие точки" мутаций (на примере гена HPRT).
9. Регуляция мутационных процессов репарацией и репликацией ДНК. BER и NER репарация. Метилтрансферазы в репарации аддуктов.
10. Rec A, Umu D и Umu C белки в SOS ответе.
11. Метилирование ДНК и канцерогенез. Биохимия метилирования. Эпигенетическая составляющая канцерогенеза.

### **YIII. Свободные радикалы кислорода в механизмах канцерогенеза**

1. Эндогенные свободные радикалы кислорода
2. Механизмы повреждения клеточной мембраны
3. Роль перекисного окисления липидов в генерации повреждений ДНК
4. ДНК-аддукты свободных радикалов кислорода.
5. Стресс-активированные пути передачи клеточного сигнала.

### **IX. Механизмы регуляции клеточного деления**

1. G1/S и G2/M - критические точки регуляции клеточного цикла
2. Роль циклинов и их киназ в делении клетки. Ингибиторы и активаторы Cdc.
3. Киназа M-фазы в регуляции митоза. Белки-мишени для киназы.

### **X. Клеточные и вирусные онкогены**

1. Иммортализация и трансформация клеток
2. Протоонкогены и раковые супрессорные гены
3. Онкогенные вирусы (полиомы, папилломы, Эпштейна-Барра и ретровирусы)
4. Ретровирусные онкогены и их клеточные аналоги
5. Характеристика RAS онкогенов
6. Активация онкогенов
  - вставки (инфицирование вирусами на примере гена c-myc)
  - транслокации (лимфома Беркитта, Филадельфийская хромосома)

### **XI. Раковые супрессорные гены (РСГ)**

1. RB белок в регуляции клеточного цикла
2. p53 в канцерогенезе. Структура и функция белка, механизмы его активации.
3. Другие РСГ

### **XII. Протоонкогены в передаче клеточных сигналов**

4. Характеристика белков сигнальной трансдукции клеток
5. Факторы роста (GF) как инициаторы сигналов. Способы передачи сигнала.
6. Роль G-белков в сигнальной трансдукции
4. Принципиальная схема передачи клеточных сигналов на примере RAS/ RAF/MAPK пути.
  - рецепторы факторов роста (GFR) и цитоплазматические тирозин-киназы.
  - фосфорилирование мембраносвязанных рецепторов факторов роста.
  - механизмы активации RAS и RAF белков.
  - активация MAP-киназного пути. Киназы MAP-киназ.
  - онкобелки в регуляции экспрессии генов.

### **XIII. Онкогены как критические мишени в молекулярной патологии.**

1. Мутации в онкогенах и РСГ.
2. Аллель-специфическая активация и экспрессия K-ras гена в химическом канцерогенезе
3. Мутации c-rat гена и химически индуцируемый рак печени
4. Роль c-тус белка в развитии патологий сердечной мышцы
5. Современные тенденции в генотерапии рака
6. Биохимия метастазов

#### **XIV. Молекулярные механизмы программированной клеточной гибели (апоптоза)**

4. Морфологические и биохимические особенности апоптоза и некроза
5. Инициация апоптоза. Основные сигнальные молекулы.
6. Роль клеточных онкогенов Белки p53 и bax как индукторы, bcl-2 как супрессор апоптоза. Каспазы в инициации и реализации апоптоза.
4. Регуляция программированной клеточной гибели.

#### **XV. Механизмы действия негенотоксичных канцерогенов**

5. Канцерогены как эффекторы эпигенетических изменений.
  - Прямая инактивация белков-репрессоров.
  - Изменение процесса метилирования.
  - Повреждение ДНК-связывающей активности факторов транскрипции.
  - Усиление репликации ДНК.
6. Активации митотической рекомбинации на примере Афлатоксина В1.
7. Нарушение межклеточных взаимодействий. Роль коннексинов.
8. Кадгерины и катенины - роль в сигнальной трансдукции и прогрессии рака.

#### **XVI. Механизмы тератогенеза**

7. Генетическая токсикология. Классификация генетических повреждений.
8. Специфичность генетических повреждений, вызванных физическими или химическими агентами.
9. Дозо-зависимые механизмы действия тератогенов
10. Механизмы действия цитотоксичных тератогенов. Воздействие на клеточную дифференцировку.
11. Полихлорированные ароматические углеводороды (TCDDs, PCBs, PCDFs) и нарушение развития.
12. Распределение и биотрансформация ксенобиотиков при беременности.