

Министерство образования Республики Беларусь

**Учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»**

Л.В. ШЕВЦОВА

ОСНОВЫ КСЕНОБИОЛОГИИ

КУРС ЛЕКЦИЙ

**для студентов специальности 1 – 31 01 01 02 «Биология
(научно-педагогическая деятельность)»**

Гомель 2010

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
<i>Лекция 1</i> Предмет, объекты ксенобиологии и методы исследований	5
<i>Лекция 2</i> Биологическая активность ксенобиотиков	18
<i>Лекция 3</i> Ионизация, ее связь с биологической активностью ксенобиотиков	31
<i>Лекция 4</i> Мембранотропное действие ксенобиотиков	42
<i>Лекция 5</i> Кинетика и равновесие мембранотропного действия ксенобиотиков	50
<i>Лекция 6</i> Основные реакции биотрансформации ксенобиотиков	59
<i>Лекция 7</i> Особенности метаболизма ксенобиотиков у различных организмов	70
<i>Лекция 8</i> Хелатообразование и снижение токсических эффектов в организме	74
<i>Лекция 9</i> Биоаккумуляция ксенобиотиков	81
<i>Лекция 10</i> Механизмы избирательного действия ксенобиотиков	88
<i>Лекция 11</i> Поведение ксенобиотиков в экосистемах, их экологическая опасность	94
<i>Лекция 12</i> Система скрининга ксенобиотиков	104
Литература	110

Введение

Курс «Основы ксенобиологии» относится к числу фундаментальных биологических дисциплин. В настоящее время возник разрыв между высокой способностью современной цивилизации создавать новый химический потенциал планеты и ограниченными возможностями человека и биосферы в целом воспринимать действия этого потенциала с достаточной эффективностью и без серьезных отрицательных последствий. Современные масштабы воздействия на организм чужеродных для живого организма веществ (ксенобиотиков) огромен. Этот факт находит свое отражение в бурном развитии новой отрасли биологии – ксенобиологии.

В курсе лекций «Основы ксенобиологии» представлен учебный материал по современным представлениям о закономерностях и путях поступления, выведения, распространения, превращения чужеродных химических соединений в живых организмах и механизмах вызываемых ими биологических реакций, рассмотрены закономерности взаимодействия чужеродных соединений с клеточными структурами, механизмы биотрансформации и биоаккумуляции, виды биологической активности ксенобиотиков и методы ее определения, поведение ксенобиотиков в экосистемах. В предлагаемом учебном материале уделяется внимание мониторингу антропогенного загрязнения биосферы.

В тексте всем новым терминам даны определения. Учебный материал сопровождается схемами, графиками и формулами зависимостей, что помогает восприятию и усвоению этого материала.

Лекция 1

Предмет, объекты ксенобиологии и методы исследований

1.1 Предмет ксенобиологии, проблемы и задачи, связь с другими науками

1.2 Масштабы, причины и экологические аспекты химического загрязнения биосферы

1.3 Виды ксенобиотиков, их классификация по степени опасности и токсичности

1.1 Предмет ксенобиологии, проблемы и задачи, связь с другими науками

*Ксенобиотиками (от греческих слов *xenos* – чужой, *biotos* – жизнь) называют чужеродные, ранее не встречавшиеся в организме органические и неорганические соединения. К таким веществам относятся, например, лекарственные препараты, пестициды, промышленные яды, отходы производств, пищевые добавки, косметические средства и пр. Так как в тканях обычно в следовых количествах присутствуют многие неорганические элементы, биологическая функция которых неизвестна, поэтому неорганические вещества можно относить к ксенобиотикам только в том случае, если они не являются необходимыми для метаболических процессов.*

Термин «ксенобиотик» довольно условный, поскольку для одних организмов то или иное вещество может быть естественным (алкалоиды для растений), а для других – чужеродным (алкалоиды для животных), некоторые соединения, например этиловый спирт, могут быть одновременно чужеродными и естественными для одного и того же организма. В связи с этим термин «ксенобиотики» используется в широком смысле, если рассматриваемое вещество является чужеродным по отношению к конкретному виду организмов, и в узком смысле, если вещество чужеродно по отношению ко всей биосфере. В курсе дисциплины «Основы ксенобиологии» термин «ксенобиотик» используется в широком смысле.

Живой организм – это открытая система. Среди веществ, поступающих из окружающей среды в организм, различают естественный поток (питательные вещества) и поток веществ природного и синтетического происхождения, которые не входят в состав данного организма. Эти потоки взаимодействуют на всех уровнях организма (молекулярном, клеточном, органном). Избыток токсических чужеродных соединений (ксенобиотиков) вызывает замедление или остановку процессов роста, развития, размножения. Для поддержания гомеостаза в организме существуют регуляторные механизмы.

Ксенобиология изучает закономерности и пути поступления, выведения, распространения, превращения чужеродных химических соединений в живом организме и механизмы вызываемых ими биологических реакций.

Ксенобиология подразделяется на более узкие области – ксенобиофизику, ксенобиохимию, ксенофизиологию и др. Это означает, что ксенобиология неразрывно связана с такими дисциплинами, как биохимия, биофизика, физиология и т. д. Действие различных веществ на организм или отдельные структуры изучается фармакологией и токсикологией.

Задачами *ксенобиофизики* являются изучение процессов взаимодействия экзогенных ксенобиотиков с транспортными системами организма, с различными клеточными структурами, в первую очередь с плазмолеммой, и механизмов поступления ксенобиотиков.

Предметом изучения *ксенобиохимии* является метаболизм ксенобиотиков в организме. Это направление ксенобиологии включает ряд разделов биологической, органической и аналитической химии, фармакологии, токсикологии и других наук. В задачу статической ксенобиохимии входит установление структуры молекул метаболитов ксенобиотиков, образующихся в организме, изучение их распространения, локализации в организмах и тканях. Динамическая ксенобиохимия исследует механизмы превращения ксенобиотиков в организме, структуру и каталитические свойства ферментов, участвующих в этих превращениях.

Ксенофизиология изучает процессы жизнедеятельности, и функции живых организмов на всем протяжении их развития в условиях действия ксенобиотиков. *Ксенофитофизиология* изучает особенности поступления и выделения, специфику процессов биотрансформации и аккумуляции ксенобиотиков в растительном организме.

Задачи в ксенобиологии определяются прежде всего общими задачами биологии, химии и медицины. Особое значение имеют данные по метаболизму микроорганизмов, растений и животных, которые играют существенную роль в обезвреживании веществ антропогенного происхождения. Результаты изучения процессов аккумуляции ксенобиотиков и механизмов адаптации организмов к повышенному содержанию чужеродных веществ в окружающей среде и внутри самого организма учитывают при рассмотрении экологических проблем, например, при проведении мероприятий по охране окружающей среды.

Ксенобиология связана с *биотехнологией*, которая использует принципы метаболизма ксенобиотиков, в частности ферментный катализ, в синтезе органических веществ. Связь ксенобиологии с *медициной* обеспечивает безопасность лечения в результате изучения механизма действия и метаболизма новых лекарственных препаратов.

Возрастание актуальности проблем, рассматриваемых в ксенобиологии, обусловлено быстрым увеличением количества синтетических соединений, вовлекаемых в круговорот веществ в природе. Среди ксенобиотиков

существует ряд полезных веществ, необходимых медицине, растениеводству, животноводству и т. д. Поэтому одной из задач ксенобиологии является разработка приемов и подходов для создания системы определения биологической активности ксенобиотиков.

Ксенобиология стремится с одной стороны, анализировать массив уже существующих чужеродных соединений, а с другой – проектировать вещества, еще не существующие, но необходимые для управления определенными процессами в биосфере.

1.2 Масштабы, причины и экологические аспекты химического загрязнения биосферы

Серьезные экологические проблемы, возникшие перед человечеством, связаны с действием двух основных факторов: демографическим взрывом (с 1 млрд. человек в 1825 г. до 6,0 млрд. в 2000 г.) и ростом промышленного производства. К основным причинам усложнения экологических проблем относятся следующие:

- значительное увеличение объема промышленного производства, связанное с повышением производительности труда;
- появление экологически опасных видов техники и технологий;
- накопление на химических предприятиях больших запасов опасных токсических веществ;
- резкое повышение расходования природных ресурсов (нефть, газ, уголь, сланцы) с выбросом продуктов их хозяйственного использования в биосферу;
- повышение сложности технических систем, которыми оперирует человек, приводящее к увеличению частоты промышленных аварий и катастроф.

Ученые считают, что в настоящее время в биосфере содержится более 6 млн. отдельных химических соединений без учета их комбинаций. Из них 90 % имеют синтетическое происхождение и в подавляющем большинстве чужеродны для организма.

Помните:

- автомобиль, проезжая 1000 километров, сжигает кислорода столько, сколько человек потребляет за всю свою жизнь;
- дымовая шапка над городами ослабляет солнечный свет на 20 %, способствует увеличению туманов и дождей;
- в среднем за жизнь человек делает 500 млн. вдохов и выдохов. Без воздуха жизнь человека длится не больше 3–4-х минут;
- при переплавке одной тонны металлолома объем отходов сокращается на 57 %, загрязнение воздуха уменьшается на 86%, воды – на 76 %;
- при производстве бумаги из макулатуры загрязнение атмосферы уменьшается на 37 %, воды – на 25–30 %;

– время разложения материалов в естественных условиях:

пакеты из-под молока, шерстяные изделия – до 5 лет;

полихлорвиниловые пакеты – до 20 лет;

металлические изделия – 100 лет и более;

стекло – 1 миллион лет;

пластиковая тара – практически не разлагается.

Приведем некоторые данные о состоянии окружающей среды в Беларуси на 2003 г. (по данным Госкомитета природных ресурсов и охраны окружающей среды РБ).

Основными источниками загрязнения атмосферного воздуха на территории Беларуси являются: автотранспорт, объекты энергетики, промышленные предприятия. Жители городов испытывают вредное воздействие бензапирена, сернистого газа, фенола, формальдегида, пыли, сажи и др.

В Республике Беларусь в 2003 г. выброшено в атмосферу 1327,5 тыс. т загрязняющих веществ. Большая часть из них произведена передвижными источниками (прежде всего автотранспортом) – 72 %. На долю стационарных источников пришлось 28 % выбросов. *Выбросы загрязняющих веществ на одного жителя республики составили 134,7 кг.*

В составе выбросов в атмосферу преобладали оксид углерода – 55,2 %, углеводороды – 18,6 % и оксиды азота – 10,6 %. Большая часть выброшенных в атмосферу оксида углерода (87,0 %) и оксидов азота (60,2 %) обусловлена работой автотранспорта. Выбросы свинца автотранспортом практически отсутствуют, поскольку этилированный бензин в Беларуси не производится и не импортируется с 1997 г.

Среди областей республики наибольшее количество загрязняющих веществ выброшено на территории Минской области – 433,0 тыс. т, наименьшее – Могилевской – 130,6 тыс. т. На каждого жителя Минской области приходится 149,3 кг загрязняющих веществ, города Минска – 119,8.

Среди городов Беларуси по объему выбросов загрязняющих веществ в атмосферу от стационарных источников выделяются Новополоцк (52,0 тыс. т) и Минск (35,9 тыс. т). В 12 городах вклад формальдегида в суммарное загрязнение воздуха составлял до 70 %.

Перемещающиеся воздушные массы не знают государственных границ. В 1979 г. была подписана Конвенция о трансграничном загрязнении воздуха на большие расстояния, которая явилась первым международным соглашением в области охраны атмосферного воздуха. Республика Беларусь является Стороной этой Конвенции и трех протоколов к ней. Совместные действия привели к тому, что в период с 1980 г. по 2000 г. произошло сокращение выбросов серы в большинстве регионов Европы примерно на 70 %. В Беларуси выбросы сократились на 80 %. Сокращение выбросов оксидов азота в Европе за период с 1980 по 2000 год составило 25–30 % (в Беларуси – 43 %).

По расчетам Метеорологических синтезирующих центров «Восток» и «Запад» (данные на 2000 г.), ежегодный поток на территорию Беларуси составляет около 150 тыс. т серы. В поступлении на территорию Беларуси окисленных серы и азота, тяжелых металлов, бензапирена основной вклад принадлежит странам-соседям: Польше, Украине, России. Более 60 % серы и восстановленного азота и более 90 % окисленного азота от источников на территории Беларуси выпадает на территории других стран.

Уменьшение в атмосфере загрязняющих веществ явилось следствием спада промышленного и сельскохозяйственного производства в республике, а также применения новых технологий очистки выбросов.

Наиболее характерными загрязняющими веществами для вод Беларуси являются соединения азота, органические вещества, соединения металлов, фенолы, нефтепродукты и радионуклиды. Регулярно наблюдаемые превышения нормативных показателей по железу общему, меди и марганцу обусловлены, в основном, естественными факторами.

Индекс загрязненности вод (ИЗВ) вычисляется как 1/6 суммы отношений средних за год концентраций по шести приоритетным загрязняющим веществам (растворенный кислород, БПК₅, азот аммонийный, азот нитритный, нефтепродукты и цинк) к их предельно допустимым концентрациям в водных объектах для условий хозяйственно-питьевого, коммунального и рыбохозяйственного водопользования.

По индексу загрязнения вод можно судить о степени химического загрязнения воды. Вода считается чистой и относится к первому классу качества воды, если ИЗВ не превышает 0,3. ИЗВ до единицы – вода считается относительно чистой, до 2,5 – умеренно загрязненной. Если более 4, 6 и 10, то вода определяется как грязная, очень грязная и чрезвычайно грязная.

Водные объекты подвергаются постоянному загрязнению атмосферными осадками. К местным источникам загрязнения атмосферы от автотранспорта, предприятий энергетики и промышленности добавляется трансграничное загрязнение.

Сохранение качества подземных вод продолжает оставаться актуальной проблемой. Применение удобрений и ядохимикатов в сельском хозяйстве вызывает в грунтовых водах увеличение хлоридов в 4–6 раз по сравнению с фоновыми концентрациями, сульфатов в 2–4 раза, нитратов в 6–10 раз. Часть загрязнения связана с выпавшими радионуклидами, но концентрация их в подземных водах не превышает принятого в республике контрольного уровня в 10 Бк/дм³.

В среднем на одного городского жителя приходится в год от 200 до 400 кг твердых бытовых отходов. Их приходится вывозить на свалки. Все это отходы потребления. А есть и промышленные отходы. В 2003 г. на предприятиях образовалось около 28 млн. т отходов, примерно 2,8 т таких отходов на одного жителя республики. Общий уровень использования отходов в Беларуси пока низкий – всего 16 %. Остальная часть идет на свалки

или мусоросжигающие заводы. В Японии, например, используется 39 % промышленных отходов, в странах ЕС перерабатывается до 70 % промышленных отходов и 95 % сельскохозяйственных.

Количество отходов по сравнению с 2002 г. увеличилось на 7 %. На объектах их размещения и на территориях предприятий накопилось более 760 млн. т. 738 млн. т. (96,6 %) – это отходы РУП «Беларуськалий».

Около 4,5 млн. т отходов было использовано в 2003 г. На нужды самих предприятий использовались 41,6 % отходов. Остальные переданы другим предприятиям, реализованы физическим лицам, либо поставлены на экспорт для дальнейшего использования. По разным причинам не было использовано более 3 млн. т отходов (40 % из которых приходится на промышленный и строительный мусор).

На предприятиях образовалось свыше 1,5 млн. т токсичных отходов. Из них 7 % приходится на долю чрезвычайно и умеренно опасных. К опасным относятся отходы гальванических производств, нефтесодержащие шламы, отходы лакокрасочных производств, отработанные масла и органические растворители.

Общая площадь земель, занятых под объектами с промышленными отходами, составляет 2250 га, из которых 1500 га приходится на солеотвалы и глинисто-галитовые шламы, 89 га – на отходы фосфогипса.

В республике ежегодно образуется около 2 млн. т твердых коммунальных отходов, которые вывозятся на полигоны. В 2004 г. обустроено более двух тысяч мини-полигонов и около одной тысячи площадок временного складирования отходов.

В структуре заболеваемости наибольший удельный вес составляют заболевания органов дыхания – 70,0 %. Частота заболеваний органов дыхания примерно на 30 % определяется состоянием атмосферного воздуха. Инфекционные и паразитарные заболевания составляют 5,1%, травмы и отравления – 4,9 %, заболевания кожи и подкожной клетчатки – 3,9 %, органов пищеварения – 3,5 %, болезни глаз – 2,8 %.

1.3 Виды ксенобиотиков, их классификация по степени опасности и токсичности

Выделяют следующие типы веществ, вызывающих глобальное химическое загрязнение биосферы:

- газообразные вещества;
- тяжелые металлы;
- удобрения и биогенные элементы;
- органические соединения;
- радиоактивные вещества (радионуклиды) – предмет изучения радиобиологии.

Газообразные вещества. Наибольшее беспокойство вызывает загрязнение атмосферы углекислым газом (CO_2), угарным газом (CO), оксидами азота и серы, фторсодержащими углеводородами, полициклическими ароматическими углеводородами.

Причины роста содержания углекислого газа в атмосфере: сжигание ископаемого топлива, вырубка лесов, окисление органического вещества почвы. После 1957 г. содержание CO_2 увеличивалось на 0,3–0,5 %. Увеличение содержания этого газа уже привело к нестабильности климата, учащению климатических аномалий (засух, снегопадов, наводнений и т.д.) и глобальному потеплению.

Угарный газ образуется при неполном сгорании углерод содержащих веществ. Наибольшие его количества образуются в результате вулканической деятельности и окисления метана в атмосфере. CO образует высокотоксичные соединения – карбонилы, может связываться с гемоглобином крови. Накоплению выделяемого в атмосферу CO препятствуют высшие растения, водоросли и особенно микроорганизмы. У высших растений CO может связываться с аминокислотой серином, а также окисляться до CO_2 . В почве некоторые микроорганизмы либо частично включают CO в органические соединения, либо окисляют до CO_2 . Поэтому почва играет особую роль в удалении CO из атмосферы.

Оксиды азота и серы образуются при сжигании ископаемого топлива. Количество выбросов оксидов азота вместе с аммиаком составляет приблизительно в 200–350 млн. т в год. Часть присутствующих в атмосфере оксидов (NO , SO) и диоксидов (NO_2 , SO_2) азота и серы образуется в ходе вулканических извержений, разрядов атмосферного электричества, жизнедеятельности микроорганизмов. За счет естественных процессов в биосфере ежегодно накапливается 110 млн. т оксидов азота, около 53 млн. т привносится антропогенной деятельностью.

Образование и накопление оксидов азота внутри помещений происходит в результате эксплуатации бытовых газовых приборов и курения. Содержание оксида и диоксида азота в табачном дыме соответственно составляет 98–135 и 150–226 мг/м³. Выкуривание одной сигареты сопровождается выделением в воздух помещения 160–500 мг оксида азота.

Из оксидов азота наиболее токсичен диоксид. Длительное воздействие диоксида азота вызывает целый спектр изменений физиологических систем организма животных (нарушение рефлекторной деятельности, гематологические изменения и т.д.). Острое отравление оксидами азота вызывают отек легких. Биохимический эффект диоксида азота – быстрое снижение содержания глутатиона в тканях легких и печени.

Ежегодно в результате деятельности человека вырабатывается около 150 млн. т серы, преимущественно в результате утилизации ископаемого топлива (до 70 % – при сжигании каменного угля и 16 % – при сгорании

нефтепродуктов). При выплавке меди, свинца и цинка количество образующегося диоксида серы достигает 15 млн. т.

Воздействие оксидов серы на дыхательные пути приводит к увеличению числа респираторных заболеваний у населения, ослабляет иммунную защиту у людей и животных и т. д.

Определенное количество оксидов азота и серы удаляется из атмосферы в результате сорбции почвой, растительным покровом, водой и с кислотными дождями. Последние снижают интенсивность фотосинтеза, вызывают гибель наземных растительных сообществ, подкисление водоемов и связанную с ним гибель гидробионтов.

При накоплении фторсодержащих углеводородов в атмосфере уменьшается содержание озона. Общие выбросы углеводородов в атмосферу составляют не менее 200 млн. т в год.

Полициклические ароматические углеводороды (в частности бензапирен) особенно опасны для живых организмов, объединенных общей областью распространения (биота). Образуются при сгорании различных видов топлива и других высокотемпературных процессах и вызывают мутагенные и канцерогенные эффекты.

Тяжелые металлы. Наиболее часто металлы попадают в окружающую среду в результате промышленных сбросов в водоемы со сточными водами, не подвергающимися эффективной очистке, а также при использовании пестицидов, в состав которых они входят. К числу наиболее токсичных металлов следует отнести *кадмий, ртуть, свинец, хром* и некоторые другие: они оказывают повреждающее действие на биообъекты в концентрациях, не превышающих 1 мг/л.

Кадмий накапливается в печени, почках, поджелудочной и щитовидной железах и др, характеризуется выраженной нефротоксичностью при попадании в организм с питьевой водой. Высоко чувствительны водные организмы.

Свинец имеет свойство активно всасываться в пищеварительном тракте человека и животных с последующим накоплением в костной и других тканях. Из костной ткани свинец может поступать в кровь и транспортироваться с ней в различные органы. Главной мишенью воздействия свинца при хронических отравлениях является центральная и периферическая нервная система. Свинцовая интоксикация вызывает нарушение биосинтеза. Свинец влияет на синтез цитохрома P-450.

Хроническое отравление свинцом отмечается при длительном употреблении питьевой воды, содержащей 0,04–1 мг/л этого металла. В организм взрослого человека с водой и продуктами питания за сутки поступает 0,3 мг свинца и столько же его дополнительно получают с табачным дымом заядлые курильщики. В наибольшей степени опасному воздействию свинца подвергаются рабочие, занятые его добычей в шахтах, а также выплавкой.

Ежегодное поступление в биосферу ртути составляет 1,5–2 тыс. т при переработке минералов и руд, 0,1–8 тыс. т – при сжигании топлива.

Ртуть и ее соединения относятся к веществам общетоксического действия. Ртуть характеризуется высокой нефротоксичностью. При отравлениях ртутью, особенно ее органическими соединениями, отчетливо выражены симптомы поражений нервной системы (парезы, параличи, нарушения зрения и слуха). Ртуть и ее соединения вызывают у людей летальный исход в количестве 75–300 мг в сутки. Наиболее токсична двухлористая ртуть (сулема). Начиная с концентрации 0,006–0,01 мг/л ртуть в виде водорастворимых солей оказывает губительное влияние на рыб и другие водные организмы.

Удобрения и биогенные элементы. Общее потребление минеральных удобрений ($N + P_2O_5 + K_2O$) составляет около 100 млн. т в год. Особую тревогу вызывает применение азотных удобрений, т. к. повышенное содержание нитратов и нитритов в питьевой воде, овощах, зеленых кормах представляет токсикологическую опасность для человека и животных.

Вместе с некоторыми удобрениями в почву попадают и побочные загрязняющие элементы (например, фтор, кадмий). Растения используют часть внесенных минеральных удобрений, а избыток их может смываться в водоемы. Загрязнение почвы биогенами (фосфор, азот) происходит и другими путями (фекальные отходы животноводства, коммунально-бытовые загрязнения и т. д.). Только в США ежегодное поступление биогенов в водоемы составляет: азота – около 5 млн. т, фосфора – примерно 250 тыс. т. Все это приводит к эвтрофикации внутренних водоемов, а также прибрежных участков океана.

Ежедневное потребление нитратов на душу населения в США оценивается примерно в 400 мг: 200 мг – с овощами, 115 мг – с мясными продуктами и 85 мг – с водой. Для Англии эти цифры соответственно составляют: 225, 110 и 105 мг (итого 440 мг). У нас эти дозы несколько ниже.

Органические соединения. Наиболее распространенные загрязнители – нефть и нефтепродукты, пестициды, полихлорбифенилы (ПХБ) и поверхностно-активные вещества (ПАВ).

Глобальное загрязнение нефтью и нефтепродуктами складывается из эмиссии в атмосферу (вследствие испарения и сгорания), загрязнений наземных экосистем и морской среды. Нефть очень медленно разлагается в окружающей среде. На поверхности воды 1 т нефти образует пленку на 12 км², что приводит к гибели гидробионтов. Нефть и ряд нефтепродуктов весьма токсичны для живых организмов, многие ее продукты канцерогенны.

Пестициды – это химические средства защиты сельскохозяйственных растений от сорняков, насекомых, грибов. Около 14 % всего мирового урожая ежегодно теряется из-за насекомых, 12 % – из-за болезней растений, вызываемых грибами и червями, 9 % – из-за сорняков и 10 % уничтожается

грызунами. Общие потери урожая в мире оцениваются примерно в 1,8 млрд. т. Человек вынужден использовать огромное количество химических средств защиты. Сформировался «пестицидный парадокс»: человечество, применяя пестициды, само становится мишенью их воздействия.

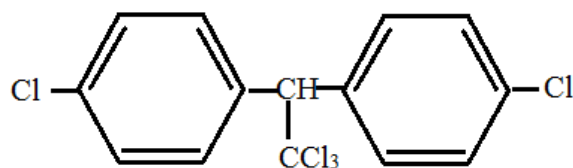
Попадание большого количества пестицидов и других ксенобиотиков в водоемы приводит к деградации водных экосистем и быстрому уменьшению ресурсов чистой воды.

Наиболее широко распространены два класса пестицидов – *фосфорорганические* (ФОП) и *хлорорганические* (ХОП) пестициды.

ФОП – потенциальные источники весьма тяжелых отравлений людей как в условиях сельскохозяйственного производства, так и в быту. Бытовые отравления хлорофосом характеризуются высокой степенью летальности – 20–30 %. ФОП являются синаптическими ядами, подавляющими передачу нервного импульса в холинореактивных системах. Они оказывают повреждающее действие на мембрану (снижают скорость АТФ-зависимого транспорта Ca^{2+}), стимулируют перекисное окисление липидов биологических мембран и т. д.

К положительным моментам следует отнести быструю деградацию ФОП. Однако даже непродолжительное сохранение ФОП в почве ведет к последующему проникновению их в культивируемые на обработанных площадях растения, в грунтовые воды и атмосферу.

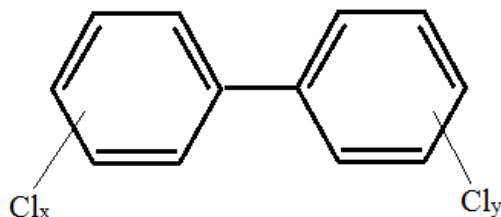
Классическим представителем ХОП является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ):



По некоторым данным, в настоящее время в атмосфере распылено около 3 млн. т ДДТ. Высокая устойчивость, низкая растворимость в воде, выраженная липофильность – все это привело к тому, что и в настоящее время этот ксенобиотик является одним из основных загрязнителей среды. Между тем во многих странах, в том числе и у нас, применение ДДТ было запрещено еще в 60-х годах XX в.

ХОП в высоких дозах повреждают репродуктивную систему. У человека ХОП поражают нервную, пищеварительную, кроветворную и сердечно-сосудистую системы. Они влияют и на активность ряда ферментов. Некоторые исследователи рассматривают изменения активности ферментных систем углеводно-фосфорного обмена в качестве раннего показателя ХОП-интоксикации.

Полихлорбифенилы (ПХБ) – это группа соединений, имеющих следующую структуру:



ПХБ применяют в гидравлических системах, в трансформаторах, в качестве пластификаторов, в составе смазочных масел и пестицидов, что обусловлено такими их свойствами как химическая инертность, негорючестью и высокой диэлектрической постоянной.

Загрязнение окружающей среды ПХБ связано главным образом с утилизацией отходов при их сжигании, а также с утечкой их при транспортировке, при авариях на производстве и при удалении жидких промышленных отходов.

По мере повышения степени хлорирования интенсивность метаболической деградации ПХБ живыми организмами снижается. ПХБ экологически опасны в силу высокой персистентности и способности накапливаться в жировых тканях человека и животных, в молоке и во всех гидрофобных средах. Попадая в организмы животных, ПХБ повышают частоту возникновения спонтанных пневмоний и абсцессов легких. Считают, что ПХБ действуют и на репродуктивную функцию.

Летом 1968 г. в Японии была зарегистрирована значительная группа больных, которые употребляли в пищу рисовое масло, загрязненное ПХБ, попавшим в него из теплообменника в процессе рафинирования. Поражение, носившее характер эпидемической вспышки, получило название болезни Юшо.

Поверхностно-активные вещества (ПАВ). Общемировое производство ПАВ составляет около десятка миллионов тонн в год. Дeterгенты хорошо растворимы в воде и могут переноситься с водными массами на большие расстояния. Экотоксикологическая опасность этих веществ связана с их модифицирующим воздействием на биологические мембраны, и в первую очередь на их транспортно-барьерные свойства. ПАВ оказывают влияние на активность ферментов в мембране, причем при низких концентрациях в ряде случаев наблюдается активация, а при высоких – ингибирование ферментативной активности.

Многие из ксенобиотиков и поллютантов являются сильнодействующими ядовитыми веществами.

В самом широком смысле *яды* – это химические вещества экзогенного происхождения (синтетические и природные), которые после проникновения в организм вызывают структурные и функциональные изменения, сопровождающиеся развитием характерных патологических состояний.

Яды и токсины – это вещества очень высокой биологической активности и селективности, вызывающие отравления. Многие яды в минимальных дозах широко применяются в медицине, например, алкалоиды (стрихнин, тубокурарин, морфин и др.), антибиотики, стероидные глюкозиды, змеиный, пчелиный яды и т. д. Наиболее токсичным веществом является ботулинический токсин – белок из *Clostridium botulinum*.

В зависимости от источника происхождения и практического применения токсические вещества (яды) подразделяют на следующие группы:

– промышленные яды: органические растворители (дихлорэтан, тетрахлорметан, ацетон и др.), вещества, применяемые в качестве топлива (метан, пропан, бутан), красители (анилин и его производные), фреоны, химические реагенты, полупродукты органического синтеза и др.;

– химические удобрения и средства защиты растений, в том числе пестициды;

– лекарственные средства и полупродукты фармацевтической промышленности;

– бытовые химикаты, используемые в качестве инсектицидов, красителей, лаков, парфюмерно-косметических средств, пищевых добавок, антиоксидантов;

– растительные и животные яды;

– боевые отравляющие вещества.

В зависимости от преимущественного поражения соответствующих органов и тканей человека яды подразделяют на следующие категории:

– *сердечные яды*, характеризующиеся кардиотоксическим действием и вызывающие нарушение ритма и проводимости миокарда;

– *нервные яды*, которые обладают нейротоксическим действием, проявляющимся в нарушении психической активности с переходом в токсическую кому, в наступлении параличей и др.;

– *печеночные яды* – соединения, приводящие к токсической патологии печени;

– *почечные яды*, действие которых вызывает нефропатологические проявления;

– *кровяные (гемические) яды* – вещества, обладающие гематоксическим воздействием и вызывающие метгемоглобинемию, гемолиз, анемию;

– *желудочно-кишечные яды*, приводящие к развитию токсического гастроэнтерита;

– *легочные яды*, интоксикация которыми приводит к отеку и (или) последующему фиброзу легких;

– *яды, поражающие иммунную систему* (развитие токсико-аллергических нарушений);

– *яды, поражающие кожу* (химические ожоги, изъязвления, аллергические дерматиты, токсикодермии).

При характеристике негативного действия ксенобиотика различают понятия «токсичность» и «опасность».

Токсичность – мера несовместимости вещества с жизнью, величина, обратная абсолютному значению среднесмертельной дозы ($1/LD_{50}$) или концентрации ($1/LC_{50}$). Величины LC_{50} или LD_{50} – это соответственно концентрация или доза вещества, вызывающая половинное подавление регистрируемой реакции (например, гибель 50 % организмов).

Опасность чужеродного вещества – вероятность появления вредных для здоровья эффектов в реальных условиях их производства и применения.

Вредные вещества, с которыми контактирует человек, по степени опасности (токсичности) подразделяют на четыре класса:

- I – чрезвычайно опасные (чрезвычайно токсичные);
- II – высокоопасные (высокотоксичные);
- III – умеренно опасные (умеренно токсичные);
- IV – низкоопасные (низкотоксичные).

ФОП по степени токсичности предлагают подразделять следующим образом: I – менее 50 мг/кг; II – 50–200 мг/кг; III – 200–1000 мг/кг; IV – более 1000 мг/кг.

Критерии классификации ксенобиотиков по степени их токсичности:

- значение величин LD_{50} или LC_{50} ;
- пути поступления (ингаляционно, через кожу);
- время воздействия;
- свойство разрушаться в окружающей среде или претерпевать превращения в живых организмах (биотрансформация).

Помимо токсичности и опасности всякое влияние ксенобиотика на объект можно охарактеризовать по некоторым особенностям его биологического действия:

- 1) по типу биологического воздействия на мишень (мембранотропные вещества, разобщители дыхания, ингибиторы биосинтеза ДНК, РНК и др.);
- 2) по показателям LD_{50} или LC_{50} ;
- 3) по видам токсичности и опасности (эмбриональная, мутагенная, канцерогенная). Критериями характеристики по видам опасного действия должны служить период действия и срок проявления эффекта (кратковременный, длительный);
- 4) по избирательности действия ксенобиотиков (вещества могут быть токсичными для одних организмов и нетоксичными – для других);
- 5) по концентрационным пределам (пороговым значениям) токсического и/или опасного воздействия;
- 6) по характеру фармакологического действия (снотворные, нейролептики, гормональные и т. д.).

Лекция 2

Биологическая активность ксенобиотиков

2.1 История поиска биологически активных веществ, формирование представлений о биологической активности веществ

2.2 Разнообразие видов биологической активности

2.3 Связь между структурой ксенобиотиков и их биологической активностью

2.1 История поиска биологически активных веществ

В историческом развитии наших знаний о биологической активности веществ можно выделить несколько периодов и этапов.

Первый период – освоение новых природных источников биологически активных веществ предками человека (до завершения формирования второй сигнальной системы). Длительность периода около 600-800 тыс. лет вплоть до появления человека разумного. Биологически активные вещества использовались прежде всего как пища. Накопление и передача знаний осуществлялись в пределах узких групп.

Второй период – первичное накопление знаний о биологически активных веществах человеком разумным (период доминирования мифологического мышления). Это период от первых сообществ человека разумного до античности (40-2,5 тыс. лет до н. э.). Накопление знаний о биологической активности веществ продолжало осуществляться в основном путем случайной выборки, или «проб на зуб». Однако эти сведения уже осознавались и передавались в устной, а затем и в письменной речи. Накопление эмпирических знаний, как правило, было уделом узкой кастовой группы.

Третий период – от античных времен до современности. Для этого периода характерны доминирование логического мышления, стремление к систематизации знаний о биологически активных веществах, развитие экспериментальных и теоретических способов поиска и определения биологической активности, постоянное увеличение числа задач, для решения которых применяются биологически активные вещества. В данном периоде выделяют четыре этапа:

– становление системы знаний о биологически активных веществах. Основной целью поиска новых биологически активных веществ является создание лекарств. Этап завершается в первой половине XVI в.;

– слияние химии и медицины. Начало этапа совпадает с увлечением алхимией в поисках разнообразных панацей и лекарств. На этом этапе возрастает осознанный поиск новых химических веществ с заданными свойствами и проводится их испытание на биологическую активность;

– формирование фармакологии на основе достижений химии, биологии, медицины. Этап связан с прогрессом химии. Создается большое количество

новых химических соединений, в том числе и не существовавших в природе. Постоянно расширяется сфера применения биологически активных веществ: фармакология, сельское хозяйство, пищевая промышленность, парфюмерия и т. д. Создаются системы экспериментальных моделей для испытания веществ на биологическую активность, развивается конструирование молекул с заданным видом биологической активности;

– использование современных биотехнологий и ЭВМ в сфере поиска и создания новых биологически активных веществ. Этап охватывает промежуток с 50-х годов XX в. до настоящего времени. Успехи молекулярной биологии и молекулярной генетики, развитие технологий генной, клеточной и биохимической инженерии способствовали формированию совершенно нового понимания механизма действия биологически активных веществ. Открылись принципиально новые возможности для конструирования молекул с заданной структурой и биологической активностью.

Все ксенобиотики в той или иной степени воздействуют на живую материю, т. е. проявляют биологическую активность. Наши знания о возможных последствиях такого воздействия ограничены. Сегодня окружающая среда насыщена такими биологически активными веществами, с которыми человек никогда не встречался в процессе своей эволюции. Биологическое действие того или иного вещества может быть ограничено каким-то уровнем и не проявляться на функциональном уровне организма в целом.

Многообразие химических соединений в организме предполагает возможность взаимодействия практически с любым попадающим в него ксенобиотиком. Свойство живых систем быть реакционно-способным по отношению к любому ксенобиотику обуславливают тот факт, что все химические соединения обладают биологической активностью.

Биологической активностью ксенобиотика называют его способность изменять функциональные возможности либо компонентов организма (in vitro или in vivo), либо живого организма в целом, либо сообщества организмов.

Чужеродное химическое соединение либо используется для нужд организма, либо выводится из него, либо остается в организме чужеродным, что вызывает более глубокую физиологическую реакцию. При этом попадание в организм даже одной молекулы ксенобиотика вызывает ответную реакцию. Тип и сила реакции определяются свойствами ксенобиотика, его концентрацией и биологической мишенью.

Любое проявление биологической активности ксенобиотика связано с его способностью пройти путь от внешней среды до мишени, связаться с ней и вызвать ее реакцию.

2.2 Разнообразие видов биологической активности

Первый контакт чужеродного соединения с биологическим объектом может быть случайным (например, загрязнение среды) или принудительным (к примеру, введение лекарств), после чего чужеродное соединение и биологический объект взаимодействуют по соответствующей схеме.

Было обнаружено, что даже весьма инертные в химическом отношении вещества могут обладать заметным влиянием. Уже в конце XIX в. было доказано, что высокоинертные в обычных физико-химических условиях благородные газы обладают сильным наркотическим эффектом. Даже нерастворимые инертные вещества при попадании в организм в виде мелких частичек могут оказывать заметное биологическое действие (так, например, минерал класса силикатов асбест обладает канцерогенным эффектом).

Целый ряд порошкообразных веществ, характеризующихся сорбционными свойствами (кремнезем, доломит, каолин, карборунд и др.) и кажущихся на первый взгляд лишенными биологической активности, оказались эффективными инсектицидами. Их влияние обусловлено тем, что они вызывают состояние, подобное стрессу, в результате чего в организме выделяются вещества, оказывающие на него парализующее действие.

Ксенобиотики, попавшие в клетку, могут проявить биологическую активность под влиянием дополнительных физических или химических факторов среды (например, многие красители способны к фотодинамическому эффекту при световом облучении).

Разнообразие видов биологической активности ксенобиотиков определяется следующими факторами:

- множеством биологических объектов, их состояний и протекающих в них реакций. Можно обоснованно говорить об индивидуальной реакции на данный ксенобиотик;
- способом попадания ксенобиотика в организм (доза, физическая форма вещества, временной режим введения, место введения и т. д.);
- наличием или отсутствием дополнительных воздействий, предшествующих попаданию в организм химического соединения, сопутствующих ему или следующих за ним (действие других веществ, электромагнитных, гравитационных полей, температуры, давления, других организмов и т. д.);
- способом, временем наблюдения, принципом подбора биообъекта, анализа информации и т. д.

Биологическая активность ксенобиотиков весьма разнообразна. Негативное действие ксенобиотиков на организм человека может быть раздражающее, дерматоксическое, пульмотоксическое, нейротоксическое, гематоксическое, гепатоксическое, нефротоксическое, иммунотоксическое, тератогенное, мутагенное, канцерогенное действие.

Раздражающим называется избирательное действие химических веществ на нервные окончания, разветвляющиеся в покровных тканях,

сопровождается рядом местных и общих рефлекторных реакций и субъективно воспринимаемое, как неприятное чувство покалывания, жжения, рези, боли и т. д. (рисунок 1).

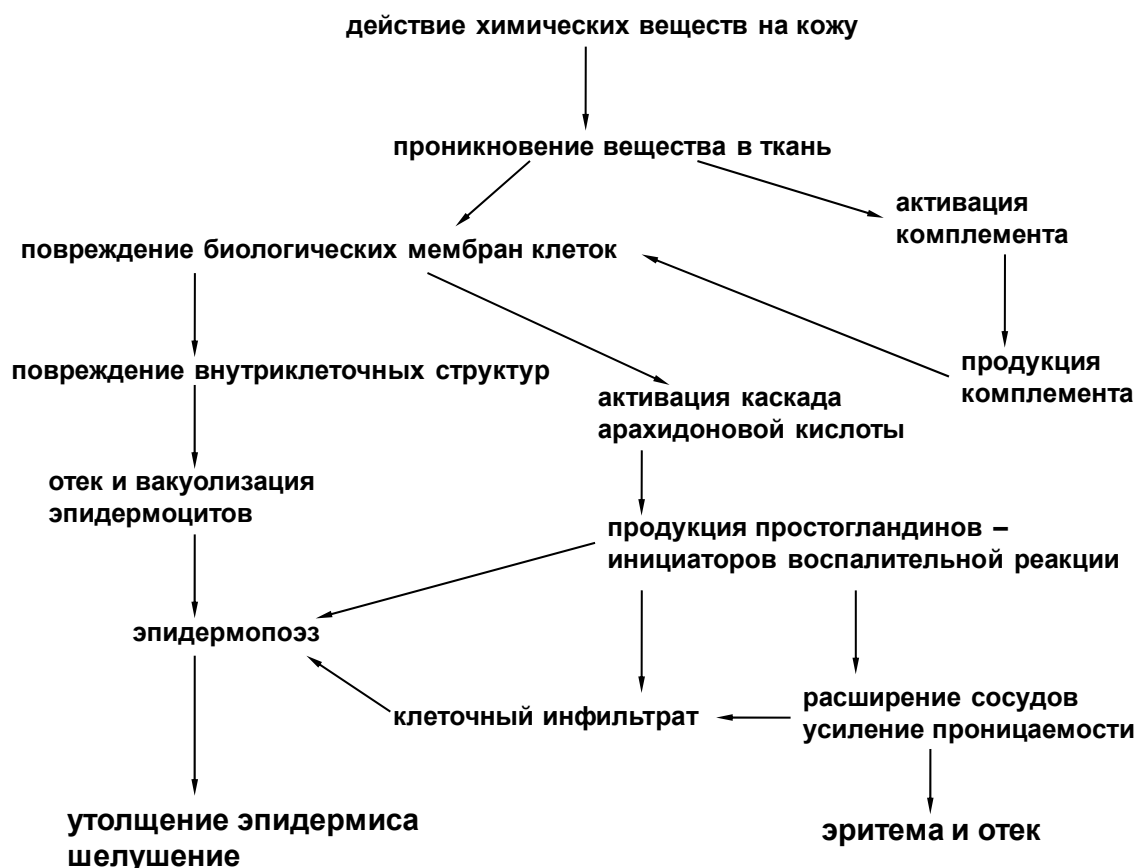


Рисунок 1 – Схема развития токсического процесса в коже

Наиболее чувствительными к раздражению являются покровные ткани, в которых плотность нервных окончаний выше, где они более доступны действию химических веществ. Это, прежде всего, конъюнктива глаз, слизистая дыхательных путей.

Раздражающее действие присуще огромному количеству веществ. К числу наиболее известных относятся галогены, альдегиды, кетоны, пары кислот, ангидриды кислот и др. Выраженность эффекта в каждом конкретном случае определяется строением токсиканта, его концентрацией и местом аппликации.

Вещества, обладающие раздражающим действием, как правило, плохо растворимы в воде, но хорошо в органических растворителях. Они могут быть газообразными, жидкими и твердыми. Боевые отравляющие вещества при обычной температуре окружающего воздуха, по большей части, находятся в твердом состоянии. Их применение сопряжено с необходимостью использования специальных устройств для создания аэрозолей.

Дерматотоксичность – это свойство химических веществ, действуя на организм немеханическим путем, вызывать повреждение кожных покровов. Воздействие ксенобиотиков осуществляется двумя способами: путем прямого контакта кожных покровов с парообразными, жидкими, твердыми веществами (формальдегид, фенолы, амины, кислоты, щелочи, кантаридин, этиленоксид, металлы и т. д.) и резорбтивного действия, вследствие проникновения веществ во внутренние среды организма с развитием системных эффектов (полигалогенированные диоксины, дибензофураны, никель, бериллий и т. д.).

Токсический процесс может носить характер острого и хронического воспаления, функциональных нарушений кожи и её придатков (волосяных фолликулов, потовых и сальных желез), неопластических изменений. Токсический процесс, развивающийся в результате местного действия токсикантов, и сопровождающийся воспалительной реакцией, называется химическим дерматитом. Патологические процессы в коже, формирующиеся вследствие резорбтивного действия токсикантов называются токсидермиями.

Пульмонотоксичность – это свойство химических веществ, действуя на организм немеханическим путем вызывать структурно-функциональные нарушения со стороны органов дыхания.

Обладая огромной площадью поверхности, лёгкие находятся в состоянии постоянного воздействия ксенобиотиков, содержащихся во вдыхаемом воздухе. В подавляющем большинстве случаев, когда концентрации веществ малы, такие воздействия никак не проявляют себя. Если же уровень воздействия достаточно высок, формируется токсический процесс, тяжесть которого колеблется в широких пределах от незначительных явлений раздражения (транзиторная токсическая реакция) до тяжелейших расстройств со стороны многих органов и систем (интоксикация). Пульмонотоксичность может проявляться как при местном, так и при резорбтивном действии токсикантов. Более того, не все вещества, действующие ингаляционно, обладают пульмонотоксичностью. Для многих токсикантов легкие лишь входные ворота, которые они проходят, не вызывая повреждений (монооксид углерода, мышьяковистый водород, стибин и т. д.). Вместе с тем к некоторым соединениям, проникающим в организм и другими путями (например, через желудочно-кишечный тракт) ткань легких чрезвычайно чувствительна.

По большей части пульмонотоксичность проявляется при ингаляционном способе воздействия ксенобиотиков в форме газов, паров и аэрозолей. Перечень веществ, действующих на организм ингаляционно, очень велик и включает загрязнители атмосферного воздуха и воздуха рабочей зоны, гербициды, пестициды, сильнодействующие и ядовитые вещества, боевые отравляющие вещества и т. д.

Некоторые вещества вызывают поражение уже вследствие однократного воздействия, другие провоцируют патологию только при длительной экспозиции или повторных воздействиях.

Схема действия ксенобиотика на ткани легких приведена на рисунке 2.

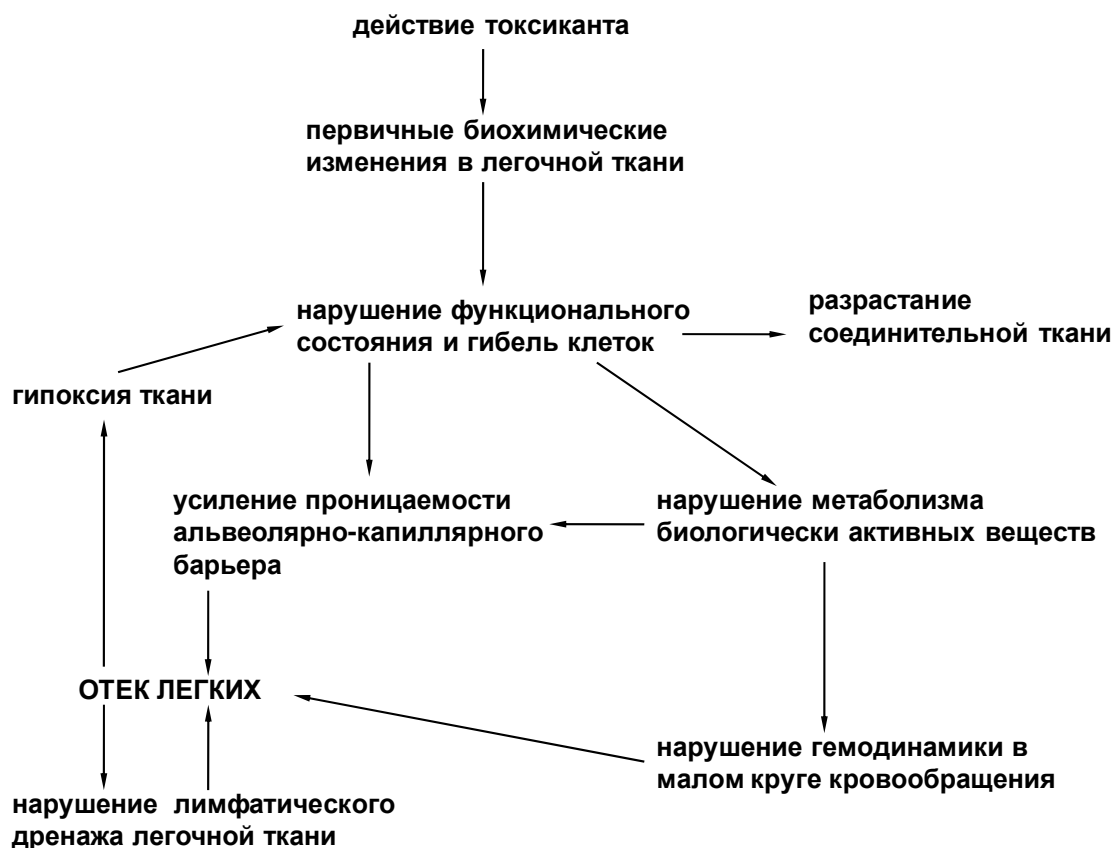


Рисунок 2 – Схема патогенеза токсического отека легких

Гематотоксичность это свойство химических веществ, действуя на организм немеханическим путём, избирательно нарушать функции клеток крови или её клеточный состав (как в сторону уменьшения, так и увеличения числа форменных элементов). Нарушение числа форменных элементов может явиться следствием прямого разрушения клеток в кровяном русле, повреждения процессов клеточного деления и созревания в кроветворных органах, поступления зрелых элементов в кровь.

Частыми проявлениями гематотоксичности являются: нарушение свойств гемоглобина (метгемоглобинемия, карбоксигемоглобинемия), анемии (в том числе гемолитические), тромбоцитопении, лейкопении, лейкемии. По большей части клеточные дискразии (пороки), вызванные токсикантами, обратимы и исчезают после прекращения действия вещества. Однако встречаются и персистирующие формы, заканчивающиеся летальным исходом в случае тяжелого повреждения костного мозга.

Нейротоксичность – это свойство химических веществ, действуя на организм немеханическим путем, вызывать нарушение структуры и/или функций нервной системы. В основе развивающегося токсического процесса может лежать повреждение любого структурного элемента нервной системы путем модификации пластического, энергетического обменов, нарушения генерации, проведения нервного импульса по возбудимым мембранам, передачи сигнала в синапсах. Нейротоксичность может быть проявлением прямого, и опосредованного повреждением других органов и систем, действия токсикантов на нервную систему. Нейротоксичность присуща большинству известных веществ. Поэтому практически любая острая интоксикация в той или иной степени сопровождается нарушениями функций нервной системы.

Вещества, для которых порог чувствительности собственно нервной системы (отдельных её гистологических и анатомических образований) существенно ниже, чем других органов и систем, и в основе интоксикации которыми лежат нарушения моторных, сенсорных функции нервной системы, памяти, мышления, эмоций, поведения, условно относят к *нейротоксикантам*, даже если не известны механизмы их токсического действия. Например, интоксикация свинцом у детей приводит к замедлению умственного развития, ухудшает способности к обучению.

Гепатотоксичность – это свойство химических веществ, действуя на организм немеханическим путем, вызывать структурно-функциональные нарушения печени. Известен широкий круг веществ, обладающих гепатотоксичностью. К их числу относятся природные соединения, продуцируемые растениями, грибами, микроорганизмами, минералы, продукты химической и фармацевтической промышленности, отходы этих видов производственной деятельности.

Нефротоксичность – это свойство химических веществ, действуя на организм немеханическим путем вызывать структурно-функциональные нарушения почек. Нефротоксичность может проявляться, как вследствие прямого взаимодействия химических веществ (или их метаболитов) с паренхимой почек, так и опосредованного действия, главным образом через изменения гемодинамики, кислотно-основного равновесия внутренней среды, массивное образование в организме продуктов токсического разрушения клеточных элементов, подлежащих выведению через почки (гемолиз, рабдомиолиз).

В строгом смысле *нефротоксикантами* могут быть названы лишь те, непосредственно действующие на почки вещества, к которым порог чувствительности органа существенно ниже, чем у других органов и систем. Однако на практике часто нефротоксикантами называют любое вещество, обладающее нефротоксичностью.

По некоторым данным в мире более 10 млн. человек имеют постоянный контакт с веществами, обладающими выраженной нефротоксичностью.

Частота регистрируемых случаев острой почечной недостаточности около 2 на 1000. По мнению некоторых исследователей примерно 20 % – следствие химических воздействий, главным образом, лекарственных средств. Лекарства являются и основной, среди прочих химических факторов, причиной хронических нефропатий. Патология почек возникает вследствие хронических воздействий экополлютантов, производственных вредностей (тяжелых металлов, органических растворителей и др.). Так, среди лиц, постоянно подвергающихся воздействию тяжелых металлов (свинца, кадмия) частота смертей от почечной недостаточности достоверно выше средне-статистической.

Иммунотоксичность следует рассматривать в двух аспектах: как собственно повреждающее действие веществ на иммунную систему и как участие иммунной системы в реализации механизмов токсического действия ксенобиотиков. В основе нарушений могут лежать разнообразные эффекты, от грубого повреждения стволовых клеток костного мозга, до изменения продукции цитокинов и модуляции плотности рецепторов для молекул-регуляторов на мембранах иммунокомпетентных клеток (как в сторону уменьшения, так и увеличения). Нарушения могут быть количественными (уменьшение числа клеток вследствие селективной цитотоксичности ксенобиотика) и качественными (функциональные трансформации клеток или клеточных рецепторов).

Мутации – это наследуемые изменения генетической информации, хранящейся в ДНК клеток. Различные факторы химической и физической природы способны вызывать мутации. Химические вещества, способные вызывать мутации называются *мутагенами*.

Неблагоприятные эффекты мутагенеза определяются тем, в клетках какого типа он реализуется: половых или соматических, стволовых и делящихся или созревающих и зрелых. Результатом грубых мутаций половых клеток и делящихся клеток развивающегося плода являются: стерильность особи, врожденная патология у потомства, тератогенез, гибель плода. Мутации стволовых и делящихся соматических клеток сопровождаются структурно-функциональными нарушениями тканей с непрерывной физиологической регенерацией (система крови, иммунная система, эпителиальные ткани) и канцерогенезом.

Основными видами мутаций, вызываемых химическими веществами, являются: 1) точечная мутация, связанная с модификацией одного нуклеотида в структуре ДНК, (замещение нуклеотида, выпадение нуклеотида из цепи, включение дополнительного нуклеотида в цепь); 2) хромосомные aberrации, т. е. изменение структуры хромосом (разрывы молекул ДНК, транслокации фрагментов ДНК) или числа хромосом в клетке.

Канцерогенами называются химические вещества, воздействие которых достоверно увеличивает частоту возникновения опухолей или сокращает период их развития у человека или животных.

Судьба этих веществ в организме, как и других ксенобиотиков, подчиняется общим законам токсикокинетики. Однако в действии на организм им присущ ряд особенностей. Так, развивающиеся под их влиянием эффекты носят отсроченный характер и являются следствием, как правило, длительного кумулятивного действия в малых дозах. Активность рассматриваемой группы веществ в отношении молекул-носителей наследственности в известной степени уникальна.

Следует различать понятия «канцерогенная активность» («канцерогенность») и «канцерогенная опасность» вещества. Канцерогенная активность свидетельствует о способности вещества индуцировать развитие злокачественных новообразований, позволяет осуществлять сравнение веществ по этому признаку при непосредственном воздействии их на биологический объект. Канцерогенная опасность включает в себя дополнительные условия: распространенность вещества, возможность контакта с ним, его стабильность в окружающей среде или в местах потенциальных контактов и др. *Коканцерогенами* называются вещества, которые существенно увеличивают вероятность формирования новообразований, действуя на организм или совместно с канцерогенами, или до него.

Дословный перевод термина «тератогенез» означает «рождение монстров», от греческого *teras*, означающего «монстр».

Репродуктивная функция осуществляется как сложноорганизованная последовательность физиологических процессов, протекающих в организме отца, матери, плода. Токсиканты могут оказывать неблагоприятное воздействие на любом этапе реализации функции. Сложность феномена репродукции делает его весьма уязвимым для ксенобиотиков.

Тератогенным называется действие химического вещества на организм матери, отца или плода, сопровождающееся существенным увеличением вероятности появления структурно-функциональных нарушений у потомства. Вещества, обладающие тератогенной активностью, называются *тератогенами*. Существует представление, согласно которому практически любое химическое вещество, введенное в организм отца или матери, в тот или иной период беременности, в достаточно большой дозе, может вызывать тератогенез. Поэтому тератогенами в узком смысле слова следует называть лишь токсиканты, вызывающие эффект в концентрациях, не оказывающих заметного действия на организм родителей. В ходе лабораторных и эпидемиологических исследований установлено, что многие ксенобиотики имеют достаточно высокий потенциал репродуктивной токсичности. Из обследованных примерно трех тысяч ксенобиотиков около 40% обладают свойствами тератогенов.

Цели определения биологической активности ксенобиотиков:

– выявление соединений, обладающих полезными для человеческого организма свойствами, например средств профилактики и лечения болезней, расширения физиологических и интеллектуальных возможностей

человека и т. д.;

– обнаружение вредных для человеческого организма биологических активностей у испытуемых ксенобиотиков, особенно таких видов активности, как мутагенная, канцерогенная, эмбриотоксическая и т. п.;

– поиск ксенобиотиков, влияющих на продуктивность и биологическое равновесие естественных и искусственных экосистем (сельское, лесное, рыбное хозяйства, микробиологическая промышленность);

– установление чужеродных соединений, которые могут вызвать неконтролируемое опасное или недостаточно прогнозируемое нарушение биологического равновесия природных экосистем, например, резко увеличить вероятность гибридизации вирусов гриппа;

– нахождение чужеродных соединений, которые могут служить реактивами для исследовательских работ в биологии, медицине, нацеленных на развитие принципиально новых методов исследования;

– накопление знаний, позволяющих предсказывать биологическую активность вещества по его химической структуре.

2.3 Связь между структурой ксенобиотиков и их биологической активностью

Выявление связи между химической структурой соединения и его физико-химическими свойствами, с одной стороны, и характеристиками биологической активности – с другой, позволяет предсказывать и прогнозировать последствия его попадания в организм, в биосферу и способствует целенаправленному синтезу веществ с заданными свойствами (за рубежом исследования этого направления в фармакологии получили название *драгдизайна* – проектирования лекарств).

Говоря о связи *структура-активность*, следует иметь в виду, что структура означает строение вещества, определяющее все его физические и химические свойства; активность – это взаимодействие вещества с центрами-мишенями (места связывания) с наблюдаемым физиологическим эффектом.

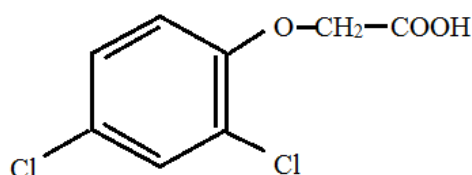
Для анализа связи между структурой вещества и его биологической активностью используются различные физические и химические характеристики вещества. Параметры, изучаемые при установлении соотношения *структура-активность*: молекулярная масса вещества, плотность, молекулярный объем, критическое давление, коэффициент теплопроводности, теплоемкость, поверхностное натяжение, вязкость и др.

Как правило, биологическая активность ксенобиотика коррелирует с его способностью определенным образом распределяться между липидной и водной фазами.

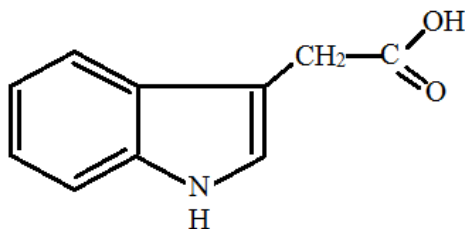
Для оценки биологической активности ксенобиотика по его физико-химическим свойствам широко применяются методы, основанные на поиске

корреляционных связей между этими показателями и биологической активностью. Для предсказания биологического эффекта неизвестного соединения следовало бы сравнивать структуру его молекулы и строение молекул всех важнейших веществ, обладающих заданной активностью (или токсичностью), но на практике к анализу привлекаются лишь некоторые основные вещества, обладающие характерным проявлением биологической активности.

Известно, что наиболее эффективные яды – это соединения, являющиеся аналогами природных биорегуляторов. Например, распространенный гербицид 2,4-Д (дихлорфеноксиуксусная кислота)



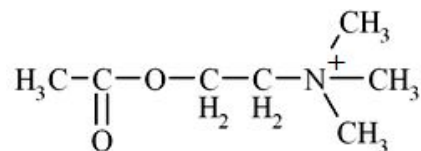
близок в структурном отношении – по расположению карбоксильной группы относительно ароматического кольца – гормону индолилуксусной кислоте (ИУК), регулирующей ростовые процессы у растений:



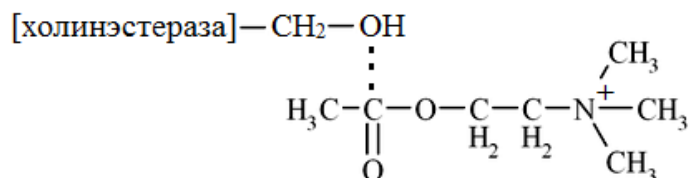
Попадая на листья, 2,4-Д легко поглощается и вызывает регуляторные расстройства, приводящие при высокой концентрации гербицида к гибели растения. Поскольку злаковые (вообще однодольные) оказались устойчивее к действию 2,4-Д, чем двудольные, его и стали применять для борьбы с сорняками.

В приведенной паре соединений структурное сходство очевидно: оба вещества – производные уксусной кислоты, содержащие ароматический заместитель. Не всегда, однако, способность соединения имитировать какой-то «естественный» метаболит обусловлена столь выраженным подобием молекулярного строения.

Другой пример – фосфорорганические инсектициды. Соединения этой группы «работают» под ацетилхолин

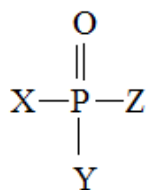


осуществляющий передачу импульса между нервными клетками или нервной и мышечной клетками. Молекулы ацетилхолина (отработавшие) расщепляются ферментом холинэстеразой. Молекула холинэстеразы очень велика, она состоит из тысяч атомов, но в катаболическом акте наиболее важную роль играет определенная гидроксильная группа, к которой на мгновение присоединяется эфирная группа ацетилхолина:

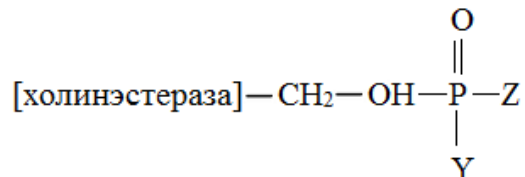


После завершения расщепления молекулы ацетилхолина продукты реакции отделяются от фермента.

Многие фосфорорганические соединения вида

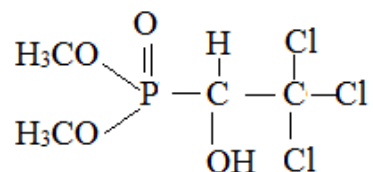


также способны взаимодействовать с гидроксилом, но они образуют с ним прочную, не поддающуюся расщеплению связь:

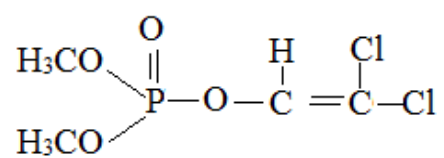


Модифицированный таким образом фермент уже не может выполнять свою функцию – гидролиз ацетилхолина, что вызывает в конечном счете блокирование передачи нервных импульсов – паралич.

Зная, что хлорофос



является сильным нервно-паралитическим ядом по отношению к насекомым, можно со значительной долей уверенности предположить, что таким действием будет обладать и дихлофос



При исследовании закономерностей изменения биологической активности в ряду аналогов некоторого вещества модификации, вызывающие сдвиг биологической активности, обычно разделяют на две группы: модификации, связанные с изменением сродства молекулы к мембранактивным структурам (рецептору), и модификации, нарушающие развитие реакции системы на образование комплекса вещество-рецептор.

Сродство молекулы любого вещества к рецептору (активному центру) связано с определенными элементами ее пространственной структуры, обеспечивающими взаимную комплементарность рецептора и агониста. С другой стороны, внутренняя активность определяется преимущественно природой функциональных групп (присутствием в некоторых положениях ароматического радикала, кислотной группы, гидрофобной группы и т. п.).

Молекулы многих веществ имеют в растворе несколько стабильных конформаций, причем для осуществления акта взаимодействия с активным центром необходима лишь одна или немногие из них. Поэтому наряду с определением стабильных конформаций молекулы ксенобиотика возникает необходимость выявления биологически активной конформаций.

Под конформацией молекул следует понимать различные пространственные формы молекулы, возникающие при изменении относительной ориентации отдельных ее частей в результате внутреннего вращения атомов или групп атомов вокруг простых связей, изгиба связи и т. д.

Отметим некоторые показатели связи между структурой веществ и их биологической активностью:

- *гидрофобность (липофильность)*, определяемая соотношением в структуре молекулы гидрофобных и гидрофильных групп. Для организмов существенное значение имеет не столько сама гидрофобность, сколько сочетание двух свойств: гидрофобности и стабильности молекул в воде;

- *ионизация* (или другой показатель распределения электронов);

- *содержание галогенов в молекуле ксенобиотика*. Замена атомов водорода в молекуле вещества на атомы галогенов увеличивает устойчивость данного соединения;

- *конформация молекул*. Например, структура изадрина и его эпокси-производного эндрина легче атакуется ферментами, чем конформационно несколько иначе «вывернутая» структура альдрина и его эпоксидопроизводного – дильдрина. Этим, вероятно, можно объяснить то, что у млекопитающих эндрин метаболизируется быстрее, чем альдрин;

- *замена двойной связи в молекуле на эпокси-группу*. Она приводит к увеличению биологической активности вещества и в ряде случаев повышает его персистентность.

Лекция 3

Ионизация, ее связь с биологической активностью ксенобиотиков

- 3.1 Типы химических связей
- 3.2 Природа ионизации, константа и степень ионизации
- 3.3 Различия в ионизации, обеспечивающие избирательность

3.1 Типы химических связей

Длительность и избирательность взаимодействия молекула вещества – рецептор определяется особенностями их химической природы, типом связей между ними, наиболее важными из которых являются ковалентные, ионные (электростатические), водородные и ван-дер-ваальсовы связи.

Ковалентная связь образуется за счет обобществления двумя атомами пары электронов, принадлежащих этим атомам. Эта связь наиболее прочная. Прочность ковалентной связи составляет 230–1000 КДж/моль (поделив на 4,18, получим количество килокалорий на моль). Энергия одинарной связи С–С составляет в среднем 350 КДж/моль, двойной связи С=С – 600 КДж/моль, одинарной связи С–О – 350 КДж/моль, двойной связи С=О – 750 КДж/моль, одинарной связи С–N – 300 КДж/моль, двойной связи С=N – 620 КДж/моль. При этом энергия самой прочной связи, способной расщепляться неферментативно при «биологических» температурах 20–40°C, не превышает 40 КДж/моль.

Высокая стабильность связи этого типа означает практически необратимый характер присоединения токсиканта к структуре-мишени. Примерами веществ, образующих с биомолекулами подобную связь, являются ФОС (взаимодействуют с серином, входящим в структуру активного центра ацетилхолинэстеразы), иприты (взаимодействуют с пуриновыми основаниями нуклеиновых кислот), а также целый ряд других распространенных токсикантов (метилбромид, метилхлорид, этиленоксид и др.). Вследствие прочности образовавшейся связи, разрушение комплекса токсикант-биомишень возможно только с помощью специальных. Восполнение содержания поврежденной токсикантом биологической структуры возможно также за счет синтеза ее de novo.

Координационная связь – это ковалентная связь, в которой обобществленную пару электронов предоставляет только один из участвующих в связи атомов. Один из атомов является донором, а другой акцептором электронной пары, поэтому эту связь называют также донорно-акцепторной. Акцепторами часто являются катионы металлов, или атомы переходных металлов (Zn, Cu, Fe), входящих в состав молекулы. Таким образом, в частности, оксид углерода взаимодействует с железом гемоглобина, с образованием карбоксигемоглобина.

Электростатические взаимодействия. Наиболее часто электростатические связи возникают между ионами. Кроме того, они могут существовать и между ионом и диполем или между двумя диполями. Все они образуются за счет чисто электростатических сил. Связи, образованные электростатическими силами, играют важную роль при взаимодействии веществ с мембранными структурами, при реакции субстратов с ферментами, т. к. в данном случае участвуют силы с большим радиусом действия (притяжение атомов происходит на большом расстоянии).

Ионная связь. Энергия ионной связи составляет ~ 20 КДж/моль. Ее прочность уменьшается обратно пропорционально квадрату расстояния между разноименными зарядами. Ионная связь не имеет строгой направленности в пространстве – в водном растворе ион может двигаться почти свободно в поле действия своего противоиона. Важной особенностью электростатического взаимодействия является легкость обмена ионов. В биологических средах вследствие ионного обмена продолжительность существования таких связей может составлять 10^{-5} с. Однако электростатическая связь между веществом и рецептором может существовать длительное время, особенно если расстояние между ними способствует образованию водородных и ван-дер-ваальсовых связей.

Ион-дипольная связь. Многие неионизированные вещества имеют очень большие дипольные моменты. Такие молекулы могут притягиваться ионами и образовывать с ними связь (гидратирование ионов в водном растворе). Ион-дипольные связи слабее ионной связи.

Существуют также относительно слабые *диполь-дипольные связи*, энергия которых обратно пропорциональна третьей степени расстояния между взаимодействующими частицами.

Ван-дер-ваальсовы связи (силы) могут возникать только в тех случаях, когда геометрия двух молекул дает возможность двум атомам, способным к образованию связи (возникновение временных, осциллирующих диполей за счет колебательных движений атомов в молекуле), подойти друг к другу на достаточно близкое расстояние. Примером таких связей может служить взаимодействие между антигеном и антителом, которое происходит за счет сил с малым радиусом действия, т.е. ван-дер-ваальсовых и водородных связей.

Прочность ван-дер-ваальсовых связей может составлять 20 КДж/моль. Энергия образующейся связи мала, однако она существенно возрастает при увеличении числа участков контакта между взаимодействующими молекулами. Со стороны токсиканта это могут быть ароматические, гетероциклические, алкильные радикалы; со стороны рецептора – неполярные участки молекул аминокислот (лейцин, валин, аланин, пролин и др.). Вклад каждой $-CH_2-$ группы алкильной цепи во взаимодействие оценивается в 2–4 Кдж/моль. При тесном контакте больших неполярных молекул энергия связи может достичь очень больших величин. Поэтому при

образовании комплекса токсикант-биомшень силы Ван-дер-Ваальса могут обеспечивать очень прочную фиксацию ксенобиотика. Действующая сила, ответственная за формирование связи, обратно пропорциональна седьмой степени расстояния между взаимодействующими молекулами. Поэтому она не может обеспечить притяжение молекул токсиканта, свободно циркулирующих в биосредах, к рецептору. В этом процессе перво-степенную роль играют силы электростатического взаимодействия. Однако после того как контакт между токсикантом и рецептором осуществился силы Ван-дер-Ваальса обеспечивают его ориентацию и плотную фиксацию.

Водородная связь – это связь, образованная между атомом водорода и электроотрицательным атомом другого элемента (в основном между O, N и F) частично за счет электростатического притяжения, частично – по донорно-акцепторному механизму. Такая связь образуется лишь при незначительной удаленности друг от друга взаимодействующих атомов и строго ориентирована в пространстве. Водородная связь обладает высокой избирательностью и направленностью, что важно при связывании вещества с рецептором. Водородные связи играют основную роль в стабилизации конформаций молекул белков и нуклеиновых кислот.

Водородные связи могут образовываться внутри молекулы (внутримолекулярные) или между молекулами (межмолекулярные). Энергия водородной связи составляет 12–20 КДж/моль (в 15–20 раз слабее ковалентной) и зависит от электроотрицательности и размера атома-партнера: чем больше электроотрицательность и меньше размеры этого атома, тем прочнее водородная связь. Эти связи легко разрываются при нагревании.

В состав молекул ксенобиотиков также входят группы, способные участвовать в образовании водородных связей. Если эти группы (X–H) являются структурными элементами «активного» радикала токсиканта, то они участвуют в образовании сложной связи вещества с молекулой-мишенью. Поскольку водородные связи являются по сути электростатическими, их сила ослабевает в присутствии веществ, обладающих свойствами диэлектриков.

Гидрофобное взаимодействие. Гидрофобные связи формируются в водной среде, когда молекулы взаимодействующих веществ контактируют друг с другом неполярными (гидрофобными) участками. В отличие от взаимодействия ван-дер-ваальса и донорно-акцепторного взаимодействия, которые также формируются при взаимодействии неполярных групп, образование гидрофобных связей обусловлено свойствами воды, без участия которой взаимодействие происходить не может. В соответствии с теорией, молекулы воды связаны друг с другом водородными связями, образуя трехмерную структуру (кластер), напоминающую структуру льда. На границе поверхности, разделяющей неполярную молекулу и молекулы воды, образование такой структуры затрудняется. При контакте двух неполярных

молекул, растворенных в воде, общая площадь поверхности, разделяющей воду и эти молекулы уменьшается. Вследствие этого, мобилизуется часть молекул воды, организованных в кластер. В противоположность всем другим химическим связям и взаимодействиям гидрофобная связь, таким образом, обусловлена преобразованием растворителя (воды), а не растворенных взаимодействующих веществ.

Гидрофобные связи имеют большое значение при взаимодействии неполярных молекул ксенобиотиков с клеточными и внутриклеточными мембранами, для образования их комплексов с белками, при этом возможно нарушение конформации макромолекул.

В процессе взаимодействия низкомолекулярного вещества с биомишенью практически всегда формируется несколько типов связей, поскольку молекула токсиканта, как правило, включает полярный (иногда даже ионизированный), и неполярный фрагменты.

Ионные связи, за счет которых осуществляется притяжение молекулы к биомишени, мало специфичны (аналогично ион-дипольному и диполь-дипольному взаимодействию). Взаимодействие между неполярными группами также неспецифично. Однако, если в структуре мишени (например, рецепторе для эндогенных биорегуляторов) полярные и неполярные группы пространственно организованы, между этими участками и особыми участками молекулы токсиканта образуются специфичные связи, обусловленные пространственной организацией молекулы токсиканта. Такое взаимодействие можно сравнить с ориентацией намагниченных стрелок в магнитном поле. После ориентации молекулы с помощью ионного (диполь-дипольного) взаимодействия между ней и рецептором формируется тесный контакт, и образуются связи за счет водородных сил и сил ван-дер-Ваальса. Образующийся комплекс тем более прочен, чем более комплементарна молекула токсиканта рецептору.

3.2 Природа ионизации, константа и степень ионизации

Процессы ионизации веществ в значительной степени определяют биологическую активность чужеродных соединений. Ионы и незаряженные молекулы различаются по своим физико-химическим свойствам: вступают в разные химические реакции, по-разному проникают через мембраны и по-разному адсорбируются на различных поверхностях и т. д.

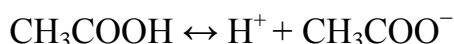
Большинство биологически активных веществ представляют собой кислоты, основания и соли и, следовательно, являются электролитами. Все электролиты понижают температуру замерзания воды в значительно большей степени, чем можно было бы ожидать исходя из их молярной концентрации. Это послужило основанием для создания Аррениусом теории ионизации электролитов. В водном растворе сульфата натрия понижение температуры замерзания воды оказалось в три раза больше

ожидаемого. Это объясняется тем, что при растворении Na_2SO_4 одна молекула дает три иона: два катиона натрия и один анион сульфата.

Как правило, соли в разбавленных растворах полностью ионизированы. Наиболее известные исключения: галогениды ртути, кадмия, свинца. Вследствие полной ионизации солей их биологические свойства целиком определяются свойствами составляющих их ионов. Так, физиологическое действие хлорида кальция определяется действием, свойственным ионам кальция и ионам хлора. Вообще *физиологическое действие полностью ионизирующейся соли не может быть меньше или больше суммы действия ее ионов*. Однако, если соль образована слабой кислотой или слабым основанием, то в результате гидролиза происходит высвобождение некоторого количества незаряженных частиц (образование молекул слабых электролитов), биологическое действие которых суммируется с эффектами, вызванными ионами. Сильные кислоты (например, соляная) и сильные основания (например, гидроксид натрия) полностью ионизированы при значениях pH от 0 до 14. Слабые кислоты и основания в этих пределах pH имеют разную степень ионизации.

Реально степень ионизации в растворе определяется только двумя факторами: pH раствора и pK_a кислоты или основания. pK_a (константа кислотности, или константа ионизации) является постоянной величиной для каждой кислоты или основания. Поэтому при определенной величине pH степень ионизации зависит только от природы кислоты (или основания), при этом не важно, были они нейтрализованы или нет.

Для описания состояния ионного равновесия Аррениус применил закон действующих масс. Так, уксусная кислота (CH_3COOH) – это слабая кислота, ионизирующаяся в воде с образованием некоторого количества ионов водорода (H^+) и ацетат-ионов (CH_3COO^-):



Соотношение произведения этих ионов $[\text{H}^+][\text{CH}_3\text{COO}^-]$ к концентрации неионизированных молекул $[\text{CH}_3\text{COOH}]$ всегда является постоянной величиной и определяет константу кислотности K_a или просто константу ионизации данной кислоты:

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]} .$$

Величина K_a уксусной кислоты при температуре 25°C составляет $1,7 \cdot 10^{-5}$.

Состояние ионизации слабых оснований также может быть охарактеризовано константами кислотности. Например, аммиак – слабое основание, которое может присоединить ионы водорода с образованием ионов аммония. В таком случае ион NH_4^+ можно рассматривать как слабую кислоту, ионизированную в воде на ионы водорода (H^+) и молекулы аммиака (NH_3): $\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{NH}_3$.

Тогда константа ионизации может быть записана в таком виде:

$$K_a = \frac{[H^+] [NH_3]}{[NH_4^+]}$$

Значение константы ионизации в этом случае равно $5,5 \cdot 10^{-10}$ (при температуре 25°C). Уравнения показывают, что кислота отщепляет ионы водорода, а основание можно характеризовать количественно сродством к иону водорода. Это позволяет применить константы кислотности для описания процесса ионизации как для кислот, так и для оснований.

Так как, величины констант ионизации слишком малы, при расчетах используют их отрицательные логарифмы:

$$pK_a = -\lg K_a \quad (pH = -\lg H)$$

Тогда при температуре 25°C величина pK_a уксусной кислоты будет равна 4,76, а аммиака – 9,26. Чем сильнее кислота, тем ниже ее pK_a (чем сильнее основание, тем выше его pK_a).

В настоящее время значения pK_a установлены для многих соединений. Например, величина pK_a , близкая к 5, типична для большинства монокарбоновых кислот как алифатических, так и ароматических. Кислоты, pK_a которых выше 7, практически не изменяют цвета нейтральной индикаторной бумаги, а выше 10 – не имеют даже кислого вкуса.

Для оснований характерны следующие закономерности. Величина pK_a 11 (как, например, у этиламина) типична для алифатических оснований, а pK_a 5 – для ароматических, которые слабее первых. Многие алкалоиды и другие биологически активные основания имеют значения pK_a около 8. Основания, pK_a которых ниже 7, практически не изменяют цвета нейтральной индикаторной бумаги.

Введение в молекулу электрондонорных групп (например, $-\text{CH}_3$) увеличивает ее основность и уменьшает кислотность, а появление в ее составе электронакцепторных групп (например, $-\text{NH}_2$) ослабляет основность и усиливает кислотность.

Степень ионизации любого вещества можно рассчитать при известных величинах pH раствора и pK_a с помощью выражений:

$$\text{степень ионизации кислот (\%)} = \frac{100}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} ;$$

$$\text{степень ионизации оснований (\%)} = \frac{100}{1 + 10^{(pH - pK_a)}} .$$

Из данных уравнений следует, что зависимость степени ионизации от рН не является линейной, а выражается сигмоидной кривой (рисунок 3).

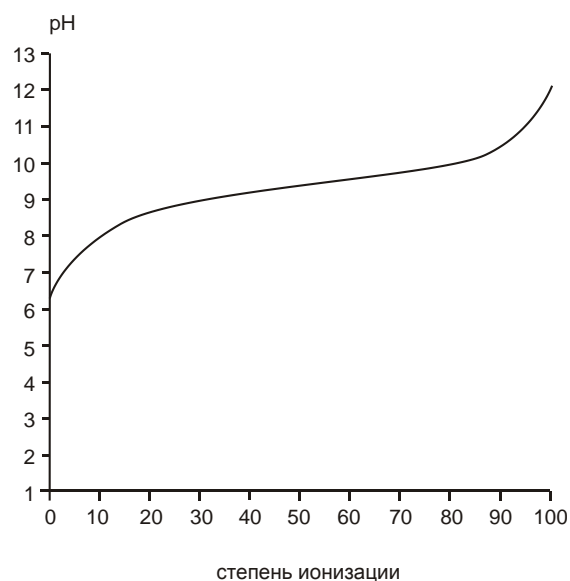


Рисунок 3 – Зависимость степени ионизации молекулы ксенобиотика от рН среды

Анализ этой кривой показывает, что небольшое изменение рН в определенной области может вызывать сильные изменения ионизации, особенно если значение рН раствора близко к величине pK_a исследуемого вещества.

Значение рН, при котором кислота или основание ионизированы наполовину, эквивалентно их pK_a . Если рН на одну единицу ниже, чем pK_a , то кислота ионизирована на 9 %, а основание – на 91 %.

3.3 Различия в ионизации, обеспечивающие избирательность

В зависимости от степени ионизации ксенобиотики обладают различной биологической активностью и их можно разделить на три большие группы:

- 1) ксенобиотики, обладающие большей биологической активностью в ионизированном состоянии;
- 2) ксенобиотики, более активные в неионизированном состоянии;
- 3) ксенобиотики, проявляющие биологическое действие в виде ионов и неионизированных молекул.

Вещества, обладающие большей биологической активностью в ионизированном состоянии. В начале XX в. было обнаружено, что многие органические катионы обладают антибактериальной активностью. Так алифатические амины, существующие при рН 7 главным образом в виде

катионов, проявляют бактерицидное действие в отличие от ароматических аминов, которые существуют при рН 7 в основном в виде неионизированных молекул и таким действием не обладают.

Тогда антибактериальная активность подобных антисептиков объяснялась щелочностью их водных растворов. Однако при этом не учитывалось то обстоятельство, что те же основания, находящиеся в забуференном растворе, также обладают бактерицидными свойствами. В 30-х годах XX в. было высказано предположение о том, что антибактериальная активность трифенилметановых красителей объясняется взаимодействием катиона красителей с определенными анионными группами на поверхностях бактерий. Было доказано, что при повышении рН среды антибактериальное действие усиливается за счет повышения степени ионизации (анионной) рецепторов бактерий.

Позднее выяснилось, что один из аминоакридинов (антибактериальные средства) – профлавин, или 3,6-диаминоакридин токсичен по отношению к широкому ряду грамположительных и грамотрицательных бактерий, но безвреден для тканей человека. Исследования серии аминоакридинов, проведенные Альбертом с сотрудниками в 1941 г., показали, что существует количественная связь между их антибактериальным действием и степенью ионизации по катионному типу. Позднее эта корреляция была подтверждена на примере многих других соединений.

Ксенобиотики, более активные в неионизированном состоянии. Неионизированные вещества могут обладать очень сильным физиологическим действием (эфир, хлороформ и др.). Пример: ингибирования деления клеток яиц иглокожих салициловой кислотой (рисунок 4).

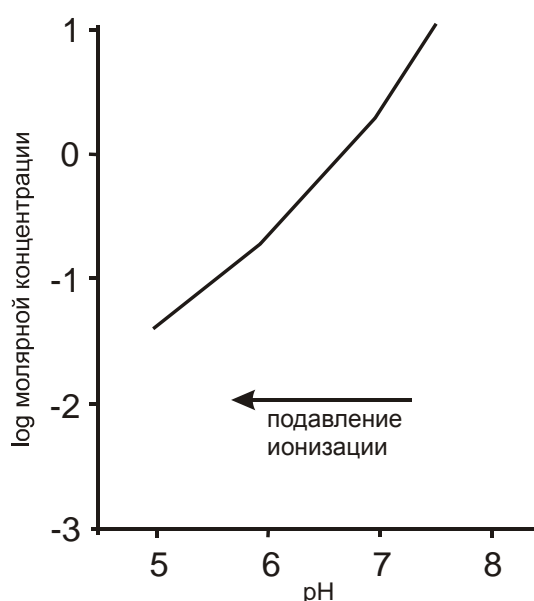


Рисунок 4 – Влияние рН на концентрацию салициловой кислоты ($pK_a = 3,0$), необходимую для подавления деления клеток яиц морского ежа

В 1921 г. Вермст обнаружил, что многие слабые кислоты наиболее полно проявляют физиологическую активность в наименее ионизированном состоянии. Исследования проводились в интервале рН от 5 до 8. Степень (количество) ионизированных молекул растет в направлении увеличения рН. Оказалось, что кислота наиболее активна при рН 5. В этом случае количество неионизированной салициловой кислоты (pK_a 3,0) составляет 0,99 %, что значительно больше, чем при остальных исследуемых значениях рН. Самое простое объяснение заключается в том, что нейтральные молекулы, а не анионы, салициловой кислоты ингибируют деление клеток.

При изучении действия слабых кислот на биологические объекты доказано, что количество вещества, необходимое для достижения эффекта, остается постоянным независимо от рН среды при условии, что рН по меньшей мере на одну единицу ниже, чем pK_a ; в этом случае не происходит ионизации токсического агента (рисунок 5).

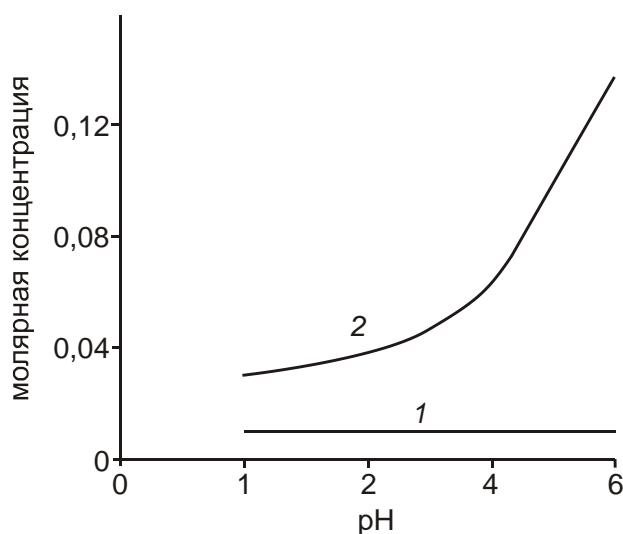


Рисунок 5 – Влияние рН на концентрации фенола (pK_a 9,9) (1) и уксусной кислоты (pK_a 4,8) (2), необходимые для ингибирования роста плесневых грибов

В других опытах было также доказано, что эффективность слабых оснований возрастает с повышением рН, т. е. пропорционально снижению их ионизации, эффективность слабых кислот повышается при уменьшении рН, что также связано с уменьшением ионизации.

Ксенобиотики, проявляющие биологическое действие в виде ионов и неионизированных молекул. Многие вещества, особенно со значениями pK_a в пределах от 6 до 8, проникнув в клетки в виде неионизированных молекул, проявляют свое биологическое действие как ионы. Например,

доказано, что поступление бензойной кислоты в клетки дрожжей обратно пропорционально степени ионизации.

Ряд азотсодержащих гетероциклов, ионизирующихся с образованием аниона, сильно ингибируют реакцию Хилла при фотосинтезе. Однако было обнаружено, что при слишком высокой степени ионизации активность этих соединений теряется полностью. Это явление объясняется проникновением ингибиторов через мембрану в виде неионизированных молекул, а затем действием их как анионов. Такой механизм характерен для некоторых гербицидов.

Подобные результаты были получены и для оснований. Так, триметиламин (хлоридин), имеющий pK_a 7,2, лучше поглощается клетками из достаточно щелочных растворов, где он находится в виде неионизированных молекул. Однако ингибирование ключевого фермента (дигидрофолатредуктазы), находящегося внутри клетки, осуществляют только катионы.

Степень ионизации (образование анионов) многих противовоспалительных средств положительно коррелирует с их биологическим действием, если ионизации подвергаются не все молекулы и их липофильности достаточно для достижения места действия.

Большинство алкалоидов имеют pK_a около 8, поэтому при pH 7,3 примерно 16 % этих соединений остаются неионизированными. Они проникают в клетки в виде неионизированных молекул, а биологическое действие осуществляют в виде катионов.

Известно много ксенобиотиков, биологическая активность которых определяется действием неионизированных молекул и ионизированной части вещества.

Обнаружено, что у большинства веществ, наиболее активных в неионизированном состоянии, ионы, тем не менее, обладают некоторой активностью. Примером может служить фунгицидное действие 2,4-динитрофенола (pK_a 4,0) на грибы *Trichoderma viride* при различных значениях pH.

При изучении биологической активности слабой кислоты обычно оказывается, что для получения стандартной реакции необходимо одинаковое количество ксенобиотика при любых значениях pH, которые на единицу и более ниже значения pK_a . В этих условиях кислота слабо ионизирована и ее биологическая активность определяется прежде всего ионизированными молекулами (рисунок 6).

Таким образом, среди последней группы ксенобиотиков следует различать вещества, проявляющие биологическую активность в виде ионов и неионизированных молекул, и вещества, проходящие через мембрану в неионизированном состоянии и вызывающие биологический эффект внутри клеточного компартмента в виде ионов.

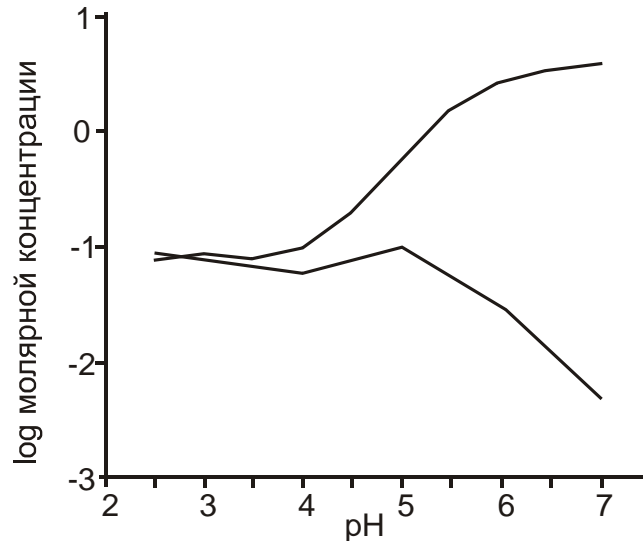


Рисунок 6 – Влияние pH на концентрацию бензойной кислоты, необходимую для ингибирования роста гриба *Mucor*. Верхняя кривая относится ко всему препарату в целом (ионы + неионизированные молекулы), нижняя – к неионизированным молекулам

На взаимодействие ксенобиотиков с мембраной оказывает влияние и ионизация мест связывания. Катионные препараты связываются с анионными центрами, которые могут иметь значения pK_a от 2 до 7 (при наличии фосфатных групп), от 2 до 6 (при наличии карбоксильных групп) или 10 (в присутствии остатков тирозина, пиримидина, цистеина). Катионные центры должны иметь значения pK_a 4 (аденин), 7 (гистидин), 10 (лизин), 13 (аргинин).

Лекция 4

Мембранотропное действие ксенобиотиков

- 4.1 Типы мембранотропности ксенобиотиков
- 4.2 Концепция рецепторов, принцип Эрлиха
- 4.3 Влияние ксенобиотиков на физико-химические свойства цитоплазмы и транспортные функции мембраны

4.1 Типы мембранотропности ксенобиотиков

Все процессы, происходящие в клетке, обусловлены свойствами ее специфических мембранных структур (компарментов), которые играют первостепенную роль в обмене веществ как между клеткой и средой, так и внутри самой клетки. Через внешние плазматические мембраны осуществляется вывод всех продуктов распада, а также воздействие различных экзо- и эндогенных факторов, в том числе ксенобиотиков.

Первичной мишенью взаимодействия химического агента с клеткой является плазматическая мембрана, поэтому для характеристики этого взаимодействия введено понятие *мембранотропности* (мембранотропного эффекта). Говоря о *мембранотропном действии* (мембранотропном эффекте) какого-либо вещества, имеют в виду прямую или косвенную (опосредованную) модификацию мембранных структур, вызываемую соответствующими соединениями, и наступающие в результате этого изменения свойств биологической мембраны, прежде всего ее транспортных характеристик.

Кроме этого необходимо отметить следующее:

- часто при обсуждении биологической активности химических соединений используется термин «специфическое» или «неспецифическое» действие;

- соединения, вызывающие изменение каких-либо характеристик биологических мембран, можно разделить на *вещества прямого мембранотропного действия* и *агенты, действующие опосредованно* через вмешательство в цитоплазматический метаболизм или иным косвенным путем. Однако очень часто регистрируемый мембранотропный эффект оказывается результатом и прямого, и косвенного действия химического агента на мембрану;

- только немногие соединения действуют строго избирательно лишь на один «чувствительный» центр связывания; но даже если это и имеет место, то наступающая за этим реакция мембраны почти всегда носит сложный характер;

- влияние агента на мембрану редко ограничивается изменением какого-то одного структурного элемента, функции или одной регистрируемой характеристики. Например, степень деструкции мембраны под действием

детергента может быть охарактеризована количеством молекул детергента, связанных единицей поверхности мембраны, сдвигом осмотических отношений в системе клетка – наружная среда, изменениями электрических параметров мембраны и т. д.

Выделяют следующие типы мембранотропности ксенобиотиков:

1) *мембранная рецепция* (прямой мембранотропность). Она считается доказанной, если установлено, что:

а) вещество не проникает внутрь клетки, а избирательно накапливается в мембранах или специфически связывается;

б) эффекты отсутствуют в бесклеточных системах, которые не содержат мембранной фракции;

2) *стимуляция или угнетение биосинтетических процессов, протекающих в мембранах*. Под этим подразумевается изменение (первичное или опосредованное) активности мембранных ферментов, скорости синтеза мембранных белков, липидов и т. д.;

3) *изменения барьерно-транспортных свойств мембраны*. Мембранотропность может быть прямой и опосредованной;

4) *функциональное взаимодействие с веществами, действие которых на уровне мембран можно считать установленным*.

При рассмотрении всякого экзогенного влияния ксенобиотика на биологический объект предполагается, что молекулы эффектора сначала связываются с некими центрами сродства на мембране, инициируя тем самым определенную реакцию клетки (организма). Анализ этого процесса можно разделить на три части:

1) установление характера и локализация центров связывания;

2) оценка сродства к ним эффектора;

3) исследование развития реакции объекта на образование комплексов центров связывания с молекулами эффектора.

4.2 Концепция рецепторов, принцип Эрлиха

Биологически активные соединения обычно подразделяют на *агонисты – вещества, связывающиеся с рецепторами и индуцирующие биологический ответ*, и *антагонисты – соединения, препятствующие взаимодействию агониста и не вызывающие биологической реакции (ослабляющие ее)*. Ксенобиотик как чужеродное организму вещество чаще всего просто взаимодействует с местами связывания на мембране или выполняет роль антагониста.

Эрлих на рубеже XIX–XX вв. сформулировал знаменитый принцип: *вещества не действуют, не будучи связанными*.

Дальнейшее развитие теория рецепторов получила при изучении действия различных гормонов. Было выдвинута гипотеза, что гормоны связываются с расположенными на поверхности специальными структурами –

рецепторами, т. е. молекулами, способными «узнавать» гормон, взаимодействовать с ним и передавать информацию о его присутствии.

Дать точно определить понятия «рецептор» трудно. Для строгого доказательства наличия рецепторов на мембране целесообразно выделить этот компонент, очистить, затем встроить в искусственную бислою lipidную мембрану или липосому и показать, что он сохраняет биологическую активность. Выделенные рецепторы оказались гликопротеинами или гликолипидами.

Молекула любого рецептора состоит не меньше, чем из двух частей. Одна из них, наружная, служит для связывания вещества (гормона). Основную роль в этом играют полисахаридные цепи молекулы рецептора. Вторая, менее полярная часть молекулы рецептора служит для ее закрепления в липидном бислое и передачи принятого сигнала внутрь клетки. Взаимодействие между связывающими и передающими участками осуществляется благодаря конформационным перестройкам, происходящим в результате «посадки» эффектора (агониста) на связывающий участок рецептора.

В основе передачи информации о происшедших изменениях в конформации рецептора в ряде случаев лежат активация и инактивация фермента аденилатциклазы (АЦ), расположенного в мембране и отвечающей за синтез нуклеотида циклоаденозинмонофосфата (цАМФ) (рисунок 7).

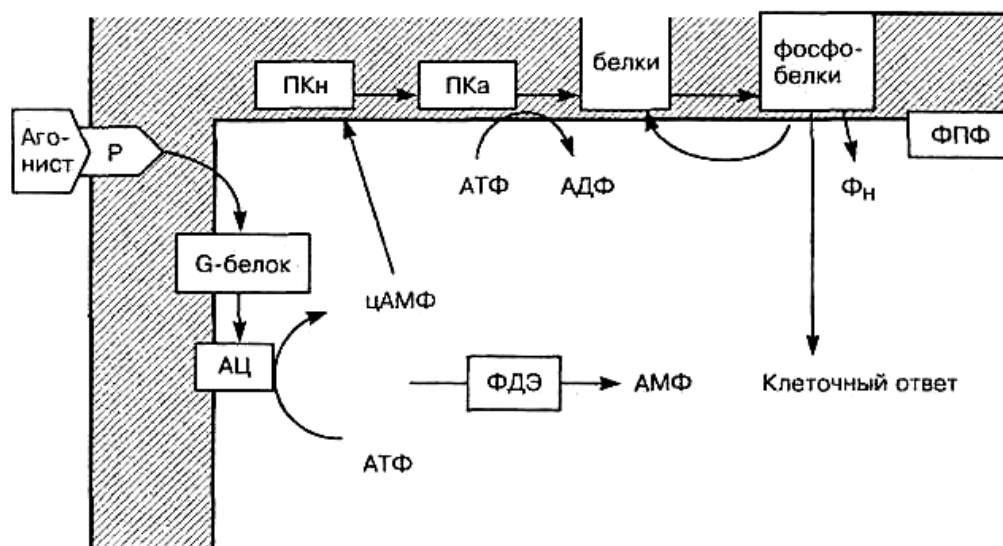


Рисунок 7 – Аденилатный путь регуляции внутриклеточных процессов

В нормальном состоянии активность аденилатциклазы подавлена. При взаимодействии агониста с рецептором Р на поверхности мембраны аденилатциклаза активируется, усиливается синтез и увеличивается концентрация цАМФ внутри клетки, активируются один или несколько внутриклеточных ферментов.

В данном случае первичным посыльным является эффектор (гормон, медиатор), вторичные посредники (G-белок, аденилатциклаза) не только способствуют переводу внешнего сигнала во внутриклеточный, но и обеспечивают его значительное усиление в 10^7 – 10^8 раз. Таким образом, несколько сигнальных молекул гормона или медиатора могут изменять функциональную или метаболическую активность всей клетки.

Однако постоянная активация АЦ не только не нужна, но и небезопасна для клетки. Течение такого тяжелого инфекционного заболевания, как холера, связано с необратимой активацией АЦ.

Циклический АМФ регулирует внутриклеточные реакции всех изученных прокариотических и эукариотических клеток. Действие его основано на активации специфических ферментов цАМФ-зависимых протеинкиназ, которые формируют многие белки, в частности белки рибосом, ряд ферментов, транспортные мембранные белки и др. Фосфорилирование белков – это их активация. В неактивированное состояние они возвращаются путем дефосфорилирования с помощью фосфопроteinфосфатазы (ФПФ).

Гормоны и медиаторы могут проявлять свое действие не только через синтез цАМФ, но и с участием других внутриклеточных посредников, например цГМФ. Признанными вторичными мессенджерами являются ионы кальция в комбинации с двумя другими вторичными посредниками – инозитолтрифосфатом (ИФ₃) и диацилглицеролом (ДАГ).

На поверхности плазматических мембран разных клеток число рецепторов варьируется. Так, на поверхности одной клетки печени имеется 250000 рецепторов инсулина, тогда как на поверхности клеток щитовидной железы их число не превышает 500. Часть рецепторов может «плавать» в плоскости мембраны, но основное их количество фиксируется системой микрофиламентов и микротрубочек.

К основным критериям, по которым можно судить о наличии рецепторов, относят следующие:

1) высокое сродство, характеризующееся тем, что агент действует при низкой концентрации (10^{-9} М и ниже);

2) выход на плато кривой, описывающей зависимость процесса взаимодействия эффектора с местами связывания на мембране от концентрации, поскольку количество рецепторов (мест связывания) ограничено;

3) различная биологическая активность пар оптических изомеров (стереоспецифичность) (так, например, право- и левовращающиеся формы атропина, морфина и адреналина сильно отличаются друг от друга по биологической активности);

4) тканевая специфичность биологического действия веществ (например, адреналин оказывает мощное воздействие на сердечную мышцу, но очень слабо влияет на поперечнополосатые мышцы).

Взаимодействие эффектор-рецептор возможно только при строгом соответствии пространственных и зарядовых геометрий, связывание эффектора

с рецептором должно быть обратимым. Одна и та же химическая группа в зависимости от своего химического окружения может обуславливать действие как агониста, так и антагониста. В качестве примера можно привести ацетилхолин и тубокурарин. Эти соединения воздействуют на один и тот же рецептор, но меньшая по размеру молекула ацетилхолина точно соответствует участку связывания и активирует рецептор, а большая молекула тубокурарина перекрывает рецептор и оказывает блокирующее действие.

В дальнейшем термин «рецептор» в отношении мембранных структур будет применяться условно, во всех случаях речь будет идти о тех центрах связывания, взаимодействие которых с молекулами ксенобиотика инициирует определенную реакцию клеточной мембраны.

4.3 Влияние ксенобиотиков на физико-химические свойства цитоплазмы и транспортные функции мембраны

Физико-химические изменения в цитоплазме являются ведущими в процессах жизнедеятельности клетки.

Вязкость. Вязкость – свойство, присущее жидкостям, обладающим внутренней структурой. В физике вязкость жидкости определяют как сопротивление передвижению одного ее слоя относительно другого. Поэтому вязкость часто называют внутренним трением.

Основное вещество цитоплазмы – цитозоль содержит систему микрофиламентов. Крупные молекулы – белки и РНК – образуют коллоидный раствор, который может быть золем (невязким) или гелем (вязким).

Взаимодействие гидратированных ионов ксенобиотиков с заряженными белковыми молекулами цитоплазмы может вызывать переходы золя в гель и обратно. Катионы, имеющие поливалентный заряд, сильнее притягиваются к заряженной коллоидной частице по сравнению с одновалентными. Поэтому в первом случае молекула коллоидной частицы теряет часть гидратной воды и цитоплазма превращается в вязкую гелеобразную массу. Во втором случае из-за слабого притяжения гидратные оболочки белка и иона сливаются и цитоплазма оводняется, превращаясь в жидкий раствор – золь.

Количественно вязкость выражают силой (на единицу поверхности двух слоев), которая достаточна для поддержания определенной скорости перемещения одного слоя относительно другого. Вязкость воды при 25 °С равна $8,9 \cdot 10^{-4}$ Па·с. Использование закона Стокса позволяет рассчитать абсолютную вязкость:

$$V = \frac{2g(D-d)r^2}{9\eta},$$

где r – радиус падающего тела; D – плотность падающего тела; η – вязкость; d – плотность жидкости; V – скорость падения; g – ускорение силы тяжести.

Поскольку свободное падение гранул в клетке наблюдается только при низкой вязкости цитоплазмы, то заменим g центробежной силой (центрифугирование):

$$V = \frac{2 r^2 (D - d) \mu g}{9 \eta} ,$$

где μ – величина ускорения, сообщаемая центрифугой.

Величина этого ускорения зависит от числа оборотов центрифуги и расстояния от оси вращения и определяется выражением:

$$\mu = \frac{(2\pi n)^2 \chi}{g} ,$$

где n – число оборотов центрифуги в секундах; χ – расстояние от центрифугируемого объекта до оси центрифуги.

Существуют другие методы определения вязкости протоплазмы, например метод регистрации пути частицы при броуновском молекулярном движении, плазмолитический метод определения вязкости и т. д.

Экспериментальные данные свидетельствуют о широком диапазоне величин структурной вязкости. Она служит хорошим показателем физиологического состояния клеток, уровня их жизнедеятельности. В структурной вязкости находит отражение реакция живых организмов на изменение внешних условий (температура, освещение и др.) и, конечно, на химические агенты.

Движение цитоплазмы. Скорость движения цитоплазмы (СДЦ) варьируется от нескольких микрометров в секунду до десятков и зависит от условий окружающей среды (свет, температур, рН) и от присутствия ксенобиотиков.

Индукцируемое химическими агентами движение цитоплазмы получило название *хемотинеза*. Заметное влияние на СДЦ оказывают ксенобиотики, подавляющие обмен веществ у живых организмов.

Изоэлектрическая точка цитоплазмы (ИЭТ). Все амфолиты способны проявлять свойства и кислот и оснований, т. е. способны образовывать и положительные и отрицательные ионы. В живых организмах важнейшими амфолитами являются аминокислоты, полипептиды, белки, т. к. они имеют группы $-\text{NH}_2$ и $-\text{COOH}$. Кислые группы в щелочной среде теряя протон, становятся отрицательно заряженными ($-\text{COO}^- + \text{H}^+$), а основная группа, в кислой среде присоединяя протон, становится положительно заряженной ($\text{NH}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_3^+$).

Ионные группы определяют электрические свойства белковых молекул. Заряд белковой молекулы равен сумме зарядов ионных групп. При определенном значении рН, когда образуется одинаковое количество положительных и отрицательных зарядов, т. е. сумма их равна 0, белок становится нейтральным. Значение рН, при котором белок имеет

минимальный электрический заряд, принято называть ИЭТ. В растворе с рН, равном ИЭТ, белок не движется ни к одному из полюсов, тогда как в кислой среде он перемещается к катоду, а в щелочной – к аноду. Этот прием, называемый электрофорезом, широко используется для разделения белков.

Каждый белок имеет строго определенную величину ИЭТ в зависимости от преобладания диамино- или моноаминокарбоновых кислот. Так, величина рН изоэлектрической точки сывороточного альбумина составляет 4,6–4,7, сывороточного глобулина – 5,4, протамина – 10–12.

В ИЭТ белок имеет минимальное значение вязкости, растворимости, степени гидратации, осмотического давления и электропроводности.

Различные ксенобиотики, имеющие кислотные или щелочные свойства, способны сдвигать величину рН в ту или иную сторону и тем самым изменять ИЭТ цитоплазмы.

Плазматические мембраны. Содержимое клетки отграничено от окружающей среды плазматической мембраной. Благодаря этому поддерживаются условия, позволяющие структурным элементам клетки выполнять присущие им функции. С другой стороны через плазматическую мембрану осуществляется непрерывный транспорт различных молекул, чем и обеспечивается обмен веществом между средой и клеткой. Например плазматическая мембрана печеночной клетки имеет площадь около 8000 мкм². Такая большая площадь контакта с окружающей средой полностью обеспечивает обмен веществ клетки. Толщина плазматической мембраны составляет около 10 нм. Наконец в мембране локализуются белковые структуры, формирующие ионные каналы, рецепторы для физиологически активных веществ, обеспечивающие восприятие сигналов, регулирующих биологическую активность клетки.

В мембрану встроены белковые молекулы, которые часто пронизывают всю ее толщину, либо погружаются на различную глубину, локализуясь на внешней или внутренней стороне. Углеводный компонент клеточной мембраны представлен главным образом гликопротеинами. Они располагаются на внешней поверхности мембраны. Мембраны различных клеток существенно различаются по своему строению и функциям. В клеточной мембране печени обнаруживается около 20 энзимов. Изменение свойств плазматических мембран в ответ на стимул являются важнейшим звеном цепи биологических процессов, лежащих в основе формирования реакции организма на внешние и внутренние раздражители.

Плазматические мембраны, несмотря на преимущественно липидный состав, способны пропускать низкомолекулярные водорастворимые вещества, так как содержат поры со средним диаметром 0,7 – 1,0 нм. Полагают, что поры, заполненные водой, сформированы белковыми молекулами. Объем воды, содержащейся в мембранах, составляет от 30 до 50% от общего их объема. Максимальная молекулярная масса водорастворимого

вещества, способного проникать через плазматические мембраны, – около 200 дальтон.

Клеточные мембраны чрезвычайно динамичный элемент. Их строение изменяется в соответствии с условиями окружающей среды и потребностями клетки. Увеличение площади поверхности растущей клетки осуществляется за счет слияния клеточной мембраны с синтезируемыми в цитоплазме (аппарат Гольджи) микровезикулами.

Известен и противоположный процесс – поступления необходимых веществ из окружающей среды в клетку, путем захвата фрагментом клеточной мембраны субстрата, погружением его в цитоплазму и отшнуровывания от остальной мембраны. Слияние мембраны с везикулами и их отшнуровывание обеспечивают динамичность её состава.

Важными свойствами клеточной мембраны является ее электрический заряд и электрическая проводимость. Наружная сторона мембраны клеток в состоянии покоя заряжена положительно. Полярность мембраны определяется отчасти асимметричностью липидных слоев, отчасти наличием в ее составе белковых молекул и гликопротеинов. Особое значение имеет градиент концентрации ионов по обе стороны мембраны, поддерживаемый благодаря энергозатратным процессам. Таким образом свойства мембраны и обмен веществ в клетке тесно связаны. Вещества, вмещающиеся в обмен липидов, существенно влияют на свойства биологических мембран.

Цитоплазматические мембраны. Внутри клеток имеются многочисленные мембранные структуры, образующие эндоплазматический ретикулум, мембрану ядра клетки, митохондрии, аппарат Гольджи, лизосомы. Эти структуры образованы двумя слоями биологической мембраны.

Цитоплазматические мембраны служат организующим субстратом для объединения в единый комплекс ряда энзиматических систем. Например, мембраны митохондрий представляют собой сложную мозаику взаимодействующих энзиматических групп. В качестве матрикса для энзимов выступают и другие мембранные структуры: гладкий и шероховатый эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи. Эти структуры участвуют в обмене веществ. Так, на рибосомах, локализующихся на мембранах шероховатого ретикулума, осуществляется синтез белка; энзимы гладкого эндоплазматического ретикулума – важнейший элемент метаболизма ксенобиотиков; аппарат Гольджи – основная секреторная структура клетки.

Токсическое действие многих веществ сопряжено с их влиянием на состояние мембранных структур. Оно может быть прямым и опосредованным. Наиболее вероятными механизмами опосредованного повреждения биологических мембран при интоксикациях являются: 1) активация перекисного окисления липидов; 2) активация фосфолипазной активности.

Лекция 5

Кинетика и равновесие мембранотропного действия ксенобиотиков

- 5.1 Адсорбция
- 5.2 Зависимость доза – эффект
- 5.3 Процессы связывания молекул ксенобиотика с мембранными центрами
- 5.4 Развитие биологического ответа

5.1 Адсорбция

Спектр проявлений токсического процесса, определяются строением ксенобиотика. Однако выраженность развивающегося эффекта является функцией количества действующего агента. Для обозначения количества вещества, действующего на биологический объект, используют понятие «доза». Например, введение в желудок крысе весом 250 г и кролику весом 2000 г токсиканта в количестве 500 мг, означает, что животным введены дозы равные соответственно 2 и 0,25 мг/кг.

Зависимость «доза-эффект» может быть прослежена на всех уровнях организации живой материи: от молекулярного до популяционного. При этом в подавляющем большинстве случаев будет регистрироваться общая закономерность: с увеличением дозы – увеличивается степень повреждения системы; в процесс вовлекается все большее число составляющих её элементов. Самым простым объектом, необходимым для регистрации биологического действия ксенобиотика, является клетка.

Многие ксенобиотики действуют непосредственно, адсорбируясь на клеточной поверхности (мембране). Адсорбирующая поверхность в клетке может на несколько порядков превышать объем. Белки и крупные молекулы в растворе находятся в коллоидном состоянии и обеспечивают огромную поверхность для адсорбции. Например, площадь поверхности белков, содержащихся в 1 см³ сыворотки крови человека, составляет 100 м².

Рассматривая явление адсорбции, следует учитывать:

- 1) что физико-химические характеристики веществ после их адсорбции отличаются от их свойств в растворе;
- 2) вещество может обратимо адсорбироваться на поверхности клетки;
- 3) адсорбция определяется суммой всех химических связей, образующихся между молекулами или молекулами и поверхностью;
- 4) процесс адсорбции обусловлен теми же типами связей (в особенности ван-дер-ваальсовыми, водородными и ионными), что и химические реакции, происходящие во всем объеме вещества;
- 5) особенности, определяющие количественные различия между реакциями, протекающими на поверхности и в растворе:

а) на поверхности создается стопроцентная концентрация вещества. Поскольку адсорбируемое вещество обладает ничтожной растворимостью, то при такой его концентрации вероятность химического взаимодействия значительно возрастает;

б) поверхность характеризуется наличием ненасыщенных валентностей, которые в твердом веществе затрачиваются на связывание друг с другом составляющих его атомов. Чем мельче истолчен кусочек угля, тем больше в нем остаточных валентностей и тем более активным адсорбентом он окажется;

б) на молекулу, которая адсорбируется из раствора на поверхности, действуют силы, стремящиеся возвратить ее в раствор. *Мерой способности вещества возвращаться в среду, т. е. деадсорбироваться, является его растворимость.*

Адсорбцию подразделяют на неспецифическую и специфическую.

Неспецифическая адсорбция характерна для веществ амфифильной природы, имеющих концевую гидрофильную группу, связанную с относительно большим гидрофобным остатком. Такие вещества занимают любую доступную им поверхность независимо от химической природы и физических свойств. В сосуде, содержащем мыльный раствор, мыло накапливается на поверхностях раздела воздух – вода и стекло – вода, а так же оно адсорбируется на любых предметах, погруженных в мыльный раствор.

Специфическая адсорбция свойственна гидрофобным веществам, которые стремятся разместиться на поверхности, имеющей химически комплементарный характер.

5.2 Зависимость доза – эффект

Если при адсорбции на поверхности клетки не происходит образования ковалентных связей, то процесс является обратимым и положение равновесия адсорбции устанавливается в соответствии с законом действующих масс. В 1918 г. Ленгмюр вывел из этого закона уравнение, позволяющее получить количественные характеристики адсорбции.

Ленгмюром были сделаны следующие предположения:

– энергия адсорбции постоянна и не зависит от степени заполнения поверхности;

– адсорбция происходит на локальных центрах, и адсорбированные молекулы между собой не взаимодействуют;

– максимальная возможная адсорбция соответствует полному заполнению монослоя.

Число молей вещества Γ , адсорбированного на поверхности, выражается в виде функции равновесной концентрации вещества C в растворе:

$$\Gamma = \Gamma_{max} \frac{C}{K_{сд} + C} .$$

где $K_{сд}$ – константа сорбции–десорбции; Γ_{max} – число молей растворенного вещества; адсорбированного на поверхности адсорбента с образованием полностью заполненного монослоя; C – концентрация ксенобиотика в растворе.

Изотерму Лэнгмюра можно представить в линейном виде:

$$\frac{1}{\Gamma} = \frac{1}{\Gamma_{max}} + \frac{K_{сд}}{\Gamma_{max} C} .$$

Изотерма адсорбции графически представляет собой гиперболу. Известно несколько типов кривых, характеризующих процесс адсорбции. Три из них представлены на рисунке 8.

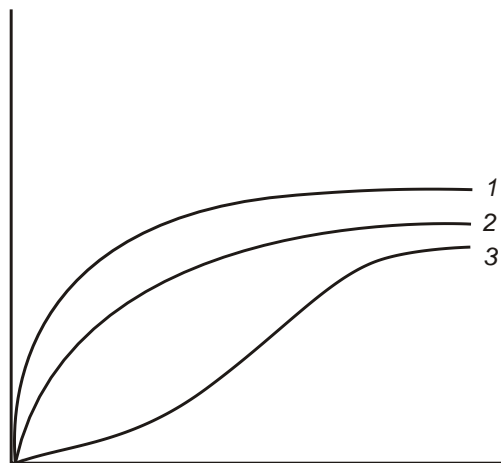


Рисунок 8 – Изотерма адсорбции Лэнгмюра

1) *H-кривые (1)*, Начальные значения концентраций адсорбированного вещества очень велики (адсорбция мицелл, ионов, имеющих высокую степень сродства и способных обмениваться с ионами, обладающими малой степенью сродства);

2) *L-кривые (2)*, нормальные изотермы Лэнгмюра (адсорбция молекул, ориентированных на поверхности горизонтально). Чем больше вещества адсорбировано, тем более затруднена его дальнейшая адсорбция;

3) *S-кривые (3)*, кооперативный эффект (адсорбция молекул вертикальной ориентации относительно поверхности). На начальном этапе, чем больше вещества уже адсорбировано, тем легче происходит дальнейшая адсорбция – кооперативный эффект.

Выделяют *S*-кривые для случаев, когда *вещество проникает в адсорбент легче, чем растворитель*.

Изотермы Ленгмюра показывают, что адсорбент насыщается при высоких значениях *S*, т. е. при образовании монослоя. *При этом часто наблюдается явление, когда биологический эффект от каждого последующего удвоения становится все менее ощутимым*.

5.3 Процессы связывания молекул ксенобиотика с мембранными центрами

Рецепторная концепция действия ксенобиотиков на клетку или орган предполагает, что в его основе лежит реакция вещества с рецептором. Принято выделять две токсикометрические характеристики ксенобиотика: *аффинность* и *эффективность*. *Аффинность* отражает степень сродства токсиканта к рецептору данного типа. *Эффективность* характеризует способность веществ вызывать определенный эффект после взаимодействия с рецептором.

Развитие реакции биологического ответа на химический раздражитель обычно рассматривается как некоторая функция количества образованных комплексов.

При рассмотрении взаимодействия ксенобиотика с биологическими мембранами важным фактором является доступность мембраноактивных центров для эффектора (рисунок 9). Обычно для анализа кинетических зависимостей используются соотношения, соответствующие случаю отсутствия диффузионных ограничений, т. е. процессы диффузии осуществляются быстрее в сравнении с развитием реакции.

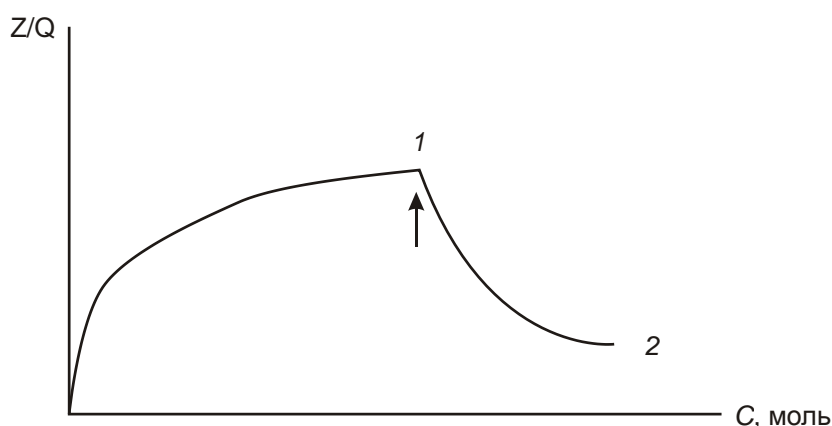
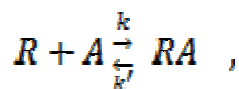


Рисунок 9 – Концентрационная зависимость связывания эффектора с мембраноактивным центром (1) и диссоциация комплекса при удалении эффектора (2). Стрелкой указан момент удаления лиганда

1) **Рецепторы локализованы прямо на поверхности мембраны** (простейший случай). Предполагается, что образование комплекса лиганд (ксенобиотик) – мембраноактивный центр происходит при отсутствии диффузионных ограничений со стехиометрией 1:1 и независимости мест связывания друг от друга. Реакция связывания лиганда А с местом связывания (рецептором) R запишется в виде



где k , k' – константы скоростей прямой и обратной реакций соответственно.

Отношение констант $k' / k = K$ называется *константой равновесия комплекса*. Она равна концентрации эффектора, вызывающей половинное насыщение мест связывания:

$$Z = \frac{QK}{K + Q} = \frac{Q}{2} ,$$

где Q – общая концентрация мест связывания; Z – скорость изменения концентрации комплексов лиганд – рецептор.

Скорость образования комплексов во времени будет тем большей, чем выше концентрация эффектора. Скорость же распада от нее не зависит.

2) **Рецепторы располагаются внутри мембраны**. Кривая развития процесса образования комплекса эффектор – рецептор имеет S-образную форму (рисунок 10).

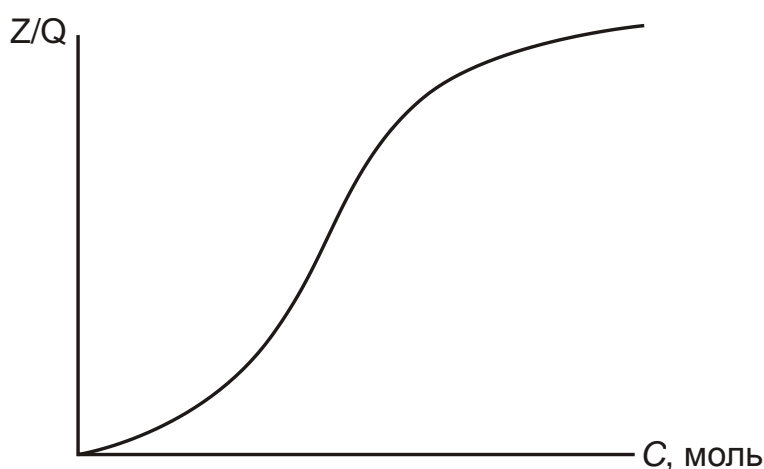


Рисунок 10 – Концентрационная зависимость связывания эффектора с мембраноактивными центрами

Для интерпретации рассматриваемых зависимостей используется ряд подходов. Один из них – это описание на базе балансовых уравнений (так, как это принято в фармакологии и токсикологии). Вводится понятие *биофазы* – компартмента, содержащего рецепторы и находящегося в контакте со средой.

В простейшем случае, рассмотренном Р. Е. Фурхготтом, биофаза находится в непосредственном контакте с компартментом, являющимся источником эффектора (рисунок 11).

Решения ряда уравнений с различными приближениями приводят к описаниям кривых, характеризующихся наличием лаг-фазы.

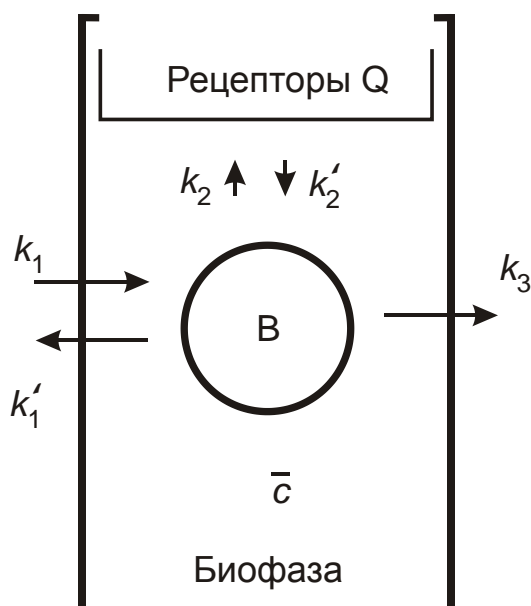


Рисунок 11 – Схема процесса взаимодействия эффектора с рецепторными структурами (модель биофазы)

Допускается существование комплексов лиганд – рецептор с любыми стехиометрическими коэффициентами. Могут, например, существовать многовалентные места связывания (рецепторы), образующие комплексы RA_n путем последовательного присоединения лигандов.

Если присоединение каждой последующей молекулы лиганда зависит от количества ранее связанных с активным центром (рецептором) молекул, то имеют место кооперативные эффекты (например, связывание каждым рецептором двух молекул). Кооперативность бывает:

- отрицательной, если присоединение каждой последующей молекулы затрудняется вследствие «посадки» предыдущей (рисунок 12);
- положительной, если присоединение каждой последующей молекулы облегчается вследствие «посадки» предыдущей.

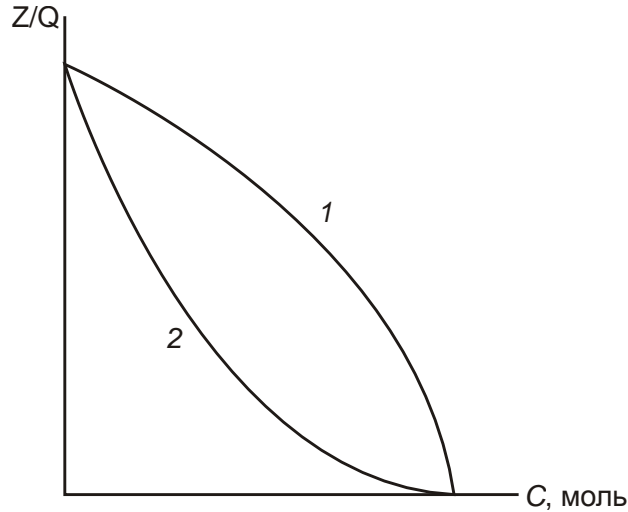


Рисунок 12 – Скэтчардовские графики связывания эффектора с мембранактивными центрами: положительная (1) и отрицательная (2) кооперативность

Пример положительной кооперативности: каждая из субъединиц молекулы гемоглобина (состоит из четырех субъединиц: двух α - и двух β -цепей) может связывать одну молекулу кислорода, при этом сродство к кислороду отдельного центра связывания (гема) тем выше, чем больше других центров связывания уже занято молекулами кислорода.

5.4 Развитие биологического ответа

Самая первая из предложенных теорий принадлежала Кларку (1926), который предположил, что выраженность наблюдаемого эффекта связана с количеством рецепторов, оккупированных токсикантом:

$$\rho = f(Z).$$

Чаще всего эта зависимость считается линейной, т. е. реакция пропорциональна количеству занятых рецепторов (справедливо в случае малых концентраций эффектора). Для большинства процессов зависимость $\rho(Z)$ представляется выпуклой кривой, все менее возрастающей с увеличением Z и выходящей в конце концов на плато.

Представление кинетики биологической реакции в виде

$$\rho = f[Z(c,t)]$$

предполагает, что биологическая реакция является функцией числа образовавшихся комплексов и верна только в тех случаях, когда время протекания процессов, развивающихся после образования комплексов

рецептор – эффектор, существенно меньше времени достижения равновесного значения Z .

Поэтому, представление реакции как зависимости $f(Z)$ может быть оправдано во многих случаях при очень малых величинах действующих концентраций.

В соответствии с рассматриваемой теорией токсикант может быть либо агонистом, либо антагонистом. Однако результаты многочисленных исследований указывают на то, что подобная классификация веществ оказывается недостаточной для описания наблюдаемых эффектов. Так установлено, что максимальный эффект, вызываемый различными агонистами, действующими на одну и ту же рецепторную систему, не одинаков. Для преодоления этого противоречия Стефенсоном (1956) были предложены три допущения:

- максимальный эффект может быть вызван агонистом даже в том случае, если оккупирована лишь незначительная часть рецепторов;
- развивающийся эффект не линейно связан с количеством оккупированных рецепторов;
- токсиканты обладают неодинаковой эффективностью (относительной возбуждающей активностью), т.е. способностью вызывать эффект, взаимодействуя с рецептором.

В приведенных моделях предполагается существование неветвящейся последовательности реакций, первая из которых индуцируется образованием комплекса рецептор – эффектор.

В действительности же каждое звено развития индуцированного процесса может служить источником стимула для нескольких элементов. В результате, наблюдая за развитием реакции, мы регистрируем при малых концентрациях лишь сигнал, распространяющийся через наиболее чувствительный канал, связывающий элементы C и ρ (рисунок 13). По мере увеличения примененной концентрации проявляются эффекты иных каналов связи, сигналы которых, очевидно, могут отличаться по знаку (вклад отдельных сигналов может быть как положительным (стимулирующим реакцию), так и отрицательным (угнетающим)).

Здесь можно рассмотреть два случая: 1) лиганд взаимодействует с мембраноактивными центрами одного типа, а дифференциация характера действия происходит на каких-то следующих стадиях; 2) лиганд взаимодействует с центрами разных типов, каждый из которых инициирует процесс, различающийся по конечному эффекту в отношении регистрируемой реакции.

В первом случае справедливо представить реакцию в виде $\rho = f(Z)$.

Второй случай – взаимодействие вещества с несколькими типами рецепторов (взаимодействие может происходить не только со специфическими рецепторами, но и с другими центрами связывания). Известно, например, что некоторые биологически активные пептиды уже в довольно низких концентрациях способны действовать неспецифически, т. е.

помимо рецепторов модифицировать свойства клеточных мембран. Это несомненно должно отразиться и на развитии регистрируемой реакции.

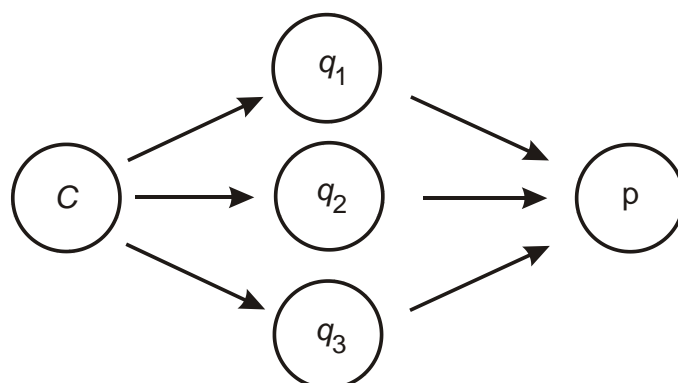


Рисунок 13 – Схема формирования реакции p под влиянием эф- фектора C , распространяющегося по нескольким путям. Каналы q_i могут характеризоваться существенно различающимися константами сродства к эффектору

Лекция 6

Основные реакции биотрансформации ксенобиотиков

6.1 Характеристика ферментов, катализирующих метаболизм ксенобиотиков

6.2 Основные реакции метаболизма ксенобиотиков

6.3 Факторы, влияющие на метаболизм ксенобиотиков

6.1 Характеристика ферментов, катализирующих метаболизм ксенобиотиков

Метаболизм ксенобиотиков в организме иногда называют *детоксикацией*. Однако, превращения некоторых ксенобиотиков сопровождаются образованием еще более токсичных веществ. Поэтому в отношении таких превращений более правилен термин «биотрансформация».

Реакции биотрансформации ксенобиотиков напоминают процессы, происходящие с эндогенными соединениями, и катализируются соответствующими ферментами. Общие свойства ферментов:

- все ферменты имеют белковую макромолекулярную природу;
- на поверхности молекул белков-ферментов располагаются активные и регуляторные центры;
- благодаря особенностям структурной и пространственной организации молекул ферменты обладают высокой специфичностью к превращаемым веществам-субстратам;
- реакция начинается после того, как образуется фермент-субстратный комплекс, для чего необходимо строгое геометрическое соответствие их форм (пространственных и зарядовых геометрий).

Высокая специфичность ферментов – одно из главных условий строгой упорядоченности химических превращений.

При взаимодействии веществ главный ограничитель скорости химического процесса – энергетический барьер. Действие фермента сводится к снижению энергетического барьера за счет образования фермент-субстратного комплекса. При образовании такого комплекса на активных центрах фермента может:

- растянуться и ослабиться химическая связь между атомами субстрата;
- возникнуть такая пространственная конфигурация субстрата, которая облегчит переход к новому веществу;
- произойти сближения реагирующих молекул субстрата и принятие ими нужной ориентации.

В регуляторных центрах ферментов не происходят каталитические превращения. Эти центры замедляют или ускоряют ход процесса. В самом простом случае продукт при избытке присоединяется к активным центрам и предотвращает синтез новых продуктов. Когда продукта мало,

регуляторные центры высвобождаются и перестают тормозить работу активных центров.

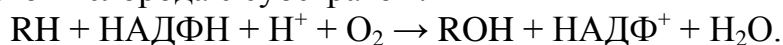
Особую группу ксенобиотиков представляют самораспадающиеся соединения (основное место здесь занимают лекарственные препараты), спонтанно разрушающиеся в организме с образованием продуктов, не обладающих биологической активностью в данных концентрациях. Распад таких соединений не зависит от наличия ферментов, что важно в тех случаях, когда наблюдаются нарушения функций отдельных органов (печени, почек), т. е. когда в организме отмечается нехватка ферментов метаболизма.

В клетках высших организмов наиболее активной системой в метаболических превращениях посторонних соединений являются микросомные фракции. Ферменты соединяются в мембранную систему, называемую гладким эндоплазматическим ретикулумом (ЭР). При разрушении клеток эта особая мембранная система распадается на более мелкие пузырьки, называемые микросомами. *Микросомы* – это не истинно клеточный компонент, а артефакт препаративной процедуры.

Наиболее широко в живых организмах представлены ферменты и ферментативные системы, катализирующие процессы окисления, восстановления, гидролиза ксенобиотиков и синтеза метаболитов, содержащих эндогенные соединения.

Среди ферментов, катализирующих окисление ксенобиотиков, особое место принадлежит микросомным монооксигеназам. Оксигеназы катализируют наибольшее число биохимических превращений ксенобиотиков, связанных с внедрением в их молекулу активированного кислорода.

Оксигеназа (монооксигеназа) – это фермент, катализирующий реакцию элементарного кислорода с субстратом:



НАДФ-Н (никотинамидадениндинуклеотидфосфат, восстановленная форма) действует как донор водорода.

В качестве основного компонента монооксигеназные системы (активный центр) содержат терминальную оксидазу – цитохром Р-450, относящийся к гемопротеидам. Основная функция цитохрома Р-450 в организме – обезвреживание эндогенных субстратов в результате монооксигеназной реакции. Различают микросомальную, митохондриальную и бактериальную монооксигеназные системы цитохрома Р-450.

Процесс восстановления ароматических нитросоединений до соответствующих аминов, катализируется нитроредуктазами, локализованными в микросомальной и растворимой фракциях клетки. Нитроредуктазы мало специфичны к субстратам и восстанавливают нитрогруппы практически всех ароматических нитросоединений. Ароматические нитросоединения восстанавливаются также ферментами слизистой оболочки кишечника и его микрофлорой.

Сложные чужеродные вещества могут гидролизироваться рядом гидролитических ферментов (гидролаз), находящихся в печени и плазме крови. В зависимости от субстратной специфичности ферменты, катализирующие данные процессы, относятся к различным группам.

Среди гидролитических ферментов, участвующих в метаболизме ксенобиотиков, особое место занимают Р-глюкуронидаза и сульфатаза. Первая катализирует расщепление эфирных и сложноэфирных связей глюкуронидов и в незначительной степени – эфирных связей серной кислоты. Фермент обнаружен в микросомах и лизосомах печени, почках, селезенке, пищеварительном тракте и половых железах животных. Сульфатаза, гидролизующая эфирсульфат, находится в микросомах печени человека и животных.

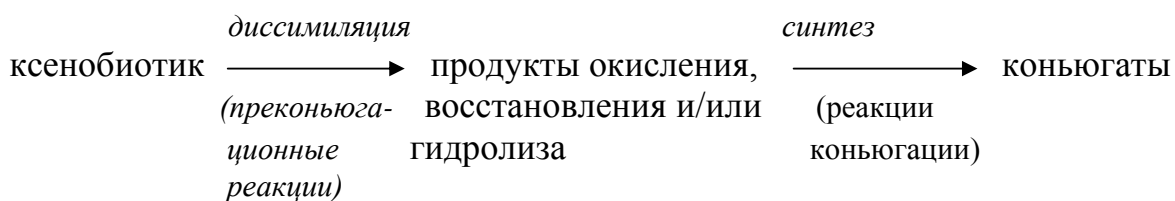
Реакции конъюгации катализируются ферментами трансферазами, переносящими заместитель в другое соединение.

6.2. Основные реакции метаболизма ксенобиотиков

Ряд гидрофильных ксенобиотиков выводится из организма человека в неизменном виде, но большая их часть выделяется только после метаболических превращений. Основные тенденции метаболических процессов в организмах высших животных:

- снижение сложности молекулы;
- введение в молекулу при необходимости полярных заместителей;
- повышение растворимости ксенобиотика и/или его метаболита в воде посредством сопряжения (конъюгирования) еще до вывода из организма с последующей секрецией.

Общая картина превращения ксенобиотиков в высших организмах представляется следующей:



Окислительные, восстановительные и гидролитические процессы называют функциональными или *преконъюгационными реакциями*, а процессы синтеза – *конъюгационными*.

Общей тенденцией является превращение экзогенного вещества в более полярную форму и последующее связывание образовавшегося производного с высокополярным фрагментом, который облегчает выделение ненужных организму веществ посредством имеющихся у него соответствующих функций.

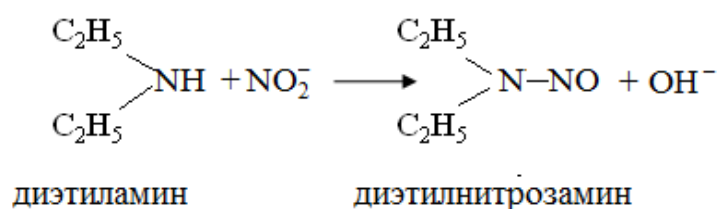
Растения не имеют системы выделения, сравнимой с системой выделения животных, но их защитный механизм может включать связывание посторонних веществ некоторыми молекулами углеводов и накопление их в местах, лишенных метаболической активности, например, в вакуолях. Микроорганизмы способны разлагать многие сложные органические соединения на диоксид углерода и воду.

Реакции, участвующие в биотрансформации чужеродных веществ, как правило, разделяют на 4 класса: реакции окисления, восстановления, гидролиза и конъюгации.

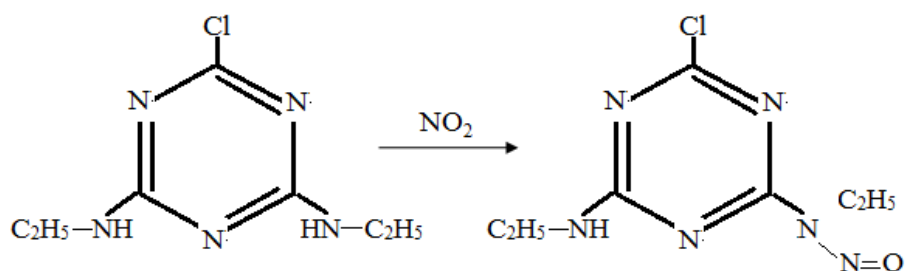
Реакции окисления:

1) окисление спиртов и альдегидов;

2) окисление аминов. Например, реакция диэтиламина с нитритом в кислой среде желудка, в результате которой образуется канцероген – диэтилнитрозамин:

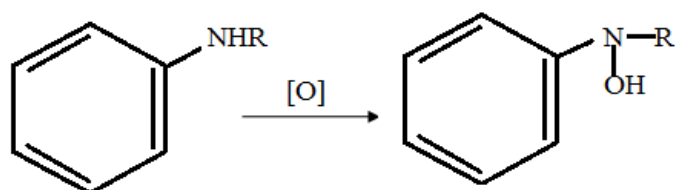


Другой пример – реакция окисления симазина с образованием канцерогенного продукта:

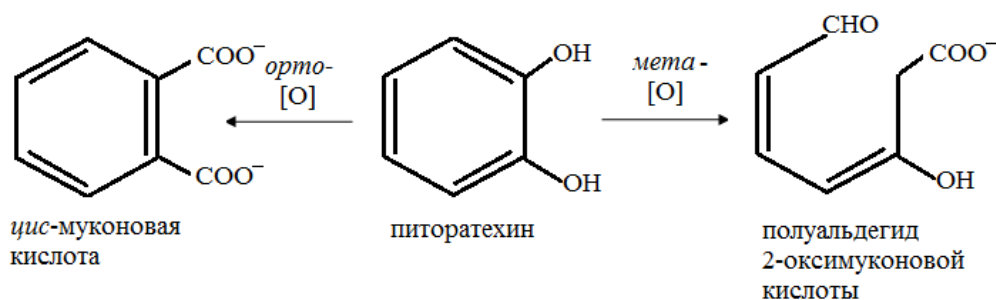


Нитрит натрия ранее широко использовался в качестве консервирующей добавки к пищевым продуктам;

3) окисление ароматических аминов. Эти вещества подвергаются N-гидроксилированию, что может приводить к появлению канцерогенных продуктов:



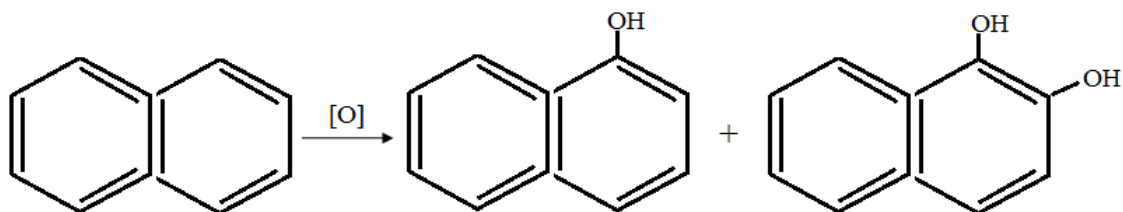
4) окисление ароматических алкилзамещенных соединений. Они обычно расщепляются между атомами C1 и C2 боковой цепи с образованием соответствующей ароматической кислоты:



Эти реакции происходят с участием микроорганизмов, а также в растениях. У различных видов микроорганизмов удалось установить многочисленные реакции разрыва бензольного кольца. Обычно такие процессы весьма избирательны, поэтому универсальность почвенной экосистемы в превращениях различных классов соединений определяется разнообразием популяций микроорганизмов в почве;

5) *гидроксилирование кольцевых систем.* Алициклические кольцевые структуры гидроксилируются легче, чем ароматические. Это одна из причин высокой токсичности бензола, поскольку он тяжело окисляется до фенола. Большое значение имеет положение в ароматическом кольце неуглеродного заместителя.

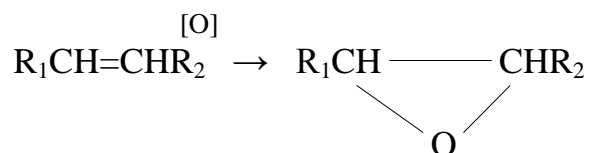
Ароматическое гидроксилирование:



Алифатическое гидроксилирование: $RCH_3 \rightarrow RCH_2OH$;

6) *ароматизация алициклических соединений* происходит в случае окисления циклогексанкарбоновых кислот с четным числом CH_2 -групп в боковой цепи) с участием митохондрий. Конечный продукт – бензойная кислота.

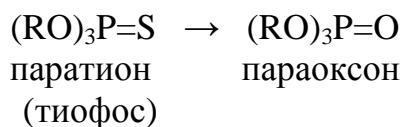
7) *реакция эпексидации.* При реакциях окисления с участием фермента эпексидазы образуется эпексидное кольцо:



Например, в результате окисления (эпексидации) пестицида альдрина получается токсический эпексид дильдрин. Эпексиды высокотоксичны и обладают мутагенными и канцерогенными свойствами. Эпексидации подвергаются многие ароматические соединения;

8) *окисление или окислительное замещение органической серы.* Гетероциклическая сера обычно окисляется в сульфоксиды или дисульфоны.

Сера в алифатических комбинациях или ароматических боковых цепях иногда замещается кислородом. Например, инсектицид паратион (тиофос) метаболизируется микросомальными ферментами (а также в почве) в параоксон, который также обладает инсектицидными свойствами и почти вдвое более токсичен для млекопитающих, чем паратион:



Превращение связи P=S в связь P=O приводит к повышению токсичности продуктов;

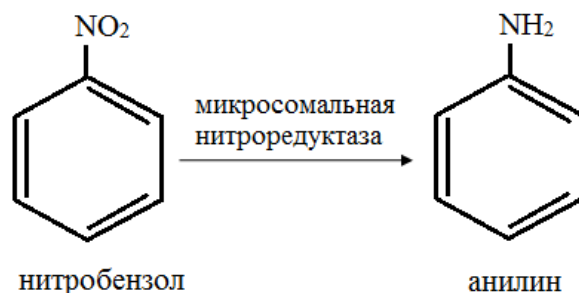
9) *окислительное дезалкилирование O- и N-атомов.* Наиболее часто дезалкилированию подвергаются ксенобиотики следующих классов: динитроанилины (гербициды трифлурамин, динитрамин и др.), фенилмочевины (гербициды хлороксурон, диурон, монурон, флуометурон, линурон и др.), симметричные триазины, фосфорорганические соединения, алкиламины и др. Эти реакции осуществляются оксигеназами микроорганизмов, а также клетками печени.

При окислительной биотрансформации ксенобиотиков нередко образуются более токсичные или канцерогенные соединения. Кроме отмеченных выше случаев, это может иметь место при окислении дибензантрацена в организме грызунов (образуются канцерогены) или при деградации некоторых азотсодержащих пестицидов, которые легко превращаются в высокомутагенные и канцерогенные соединения. Так, гербицид симазин окисляется в опасный канцероген.

Реакции восстановления:

1) *восстановление некоторых альдегидов и кетонов в спирты* под действием алкогольдегидрогеназ. Однако ацетон может прямо входить в цикл аэробного метаболизма через ацетоацетат и ацетил-КоА;

2) *восстановление нитро- и азогрупп.* Целый ряд ароматических нитросоединений, например нитробензол, паранитробензойная кислота и хлорамфеникол, восстанавливаются в соответствующие амины нитроредуктазой (нитроредуктазами):



Возможно образование продуктов, содержащих гидроксиамино- или нитрозогруппы. Образование нитрозосоединений представляет большую опасность для биосферы, так как при этом может образовываться вещество, обладающее сильным мутагенным и/или канцерогенным действием. Например, при биотрансформации гербицида трифлуралина происходит образование нитрозосоединения, обладающего канцерогенным действием;

3) *восстановление N-оксидов*. Процесс катализируется N-оксидоредуктазами, которые обнаружены в микросомальной и растворимой фракциях клеток, а также в митохондриях;

4) *восстановление дисульфидов* ($R-S-S-R_1$). Они расщепляются с образованием тиолов.

5) *восстановление двойных связей*. Двойные связи некоторых алифатических или алициклических соединений могут становиться насыщенными (например, у циклогексана). Простейшие алкены и алкины часто экскретируются без изменений их структуры;

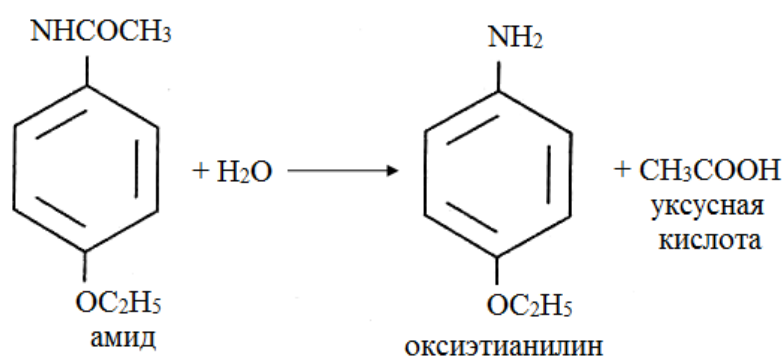
6) *дегидроксилирование*;

7) *восстановление ароматических циклов* анаэробными микроорганизмами.

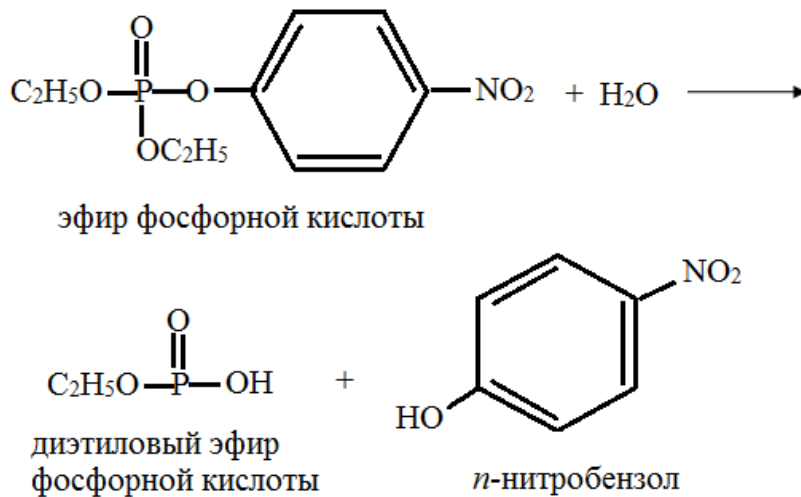
Реакции гидролиза:

1) *гидролиз эфиров карбоновых кислот* катализируют эстеразы. Эфиры карбоновых кислот гидролизуются в организме как животных, так и человека. Гидролиз эфирной связи – начальный этап микробиологической деградации многих пестицидов;

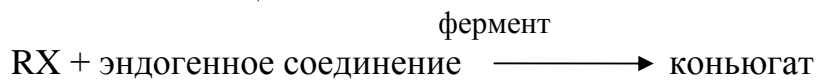
2) *гидролиз амидов, гидразидов и нитрилов*. Эти реакции происходят в дополнение к другим реакциям биотрансформации. Гидролиз амидной связи описан при изучении микробиологической деградации фениламидных пестицидов и происходит с участием амидаз:



3) *гидролиз фосфорорганических веществ*. В этом процессе участвуют ферменты, атакующие эфирные связи или действующие на ангидриды кислот. Реакция гидролиза эфира фосфорной кислоты проходит по следующей схеме:



Реакции конъюгации. К конъюгационным относятся процессы биосинтеза, в результате которых из ксенобиотиков или их метаболитов и эндогенных продуктов (глюкуроновой кислоты, ацетилсульфата, глицина и др.) образуются сложные вещества.



Образование конъюгатов – это энергозависимые процессы, подразделяющиеся на две группы в зависимости от природы активных промежуточных продуктов реакций:

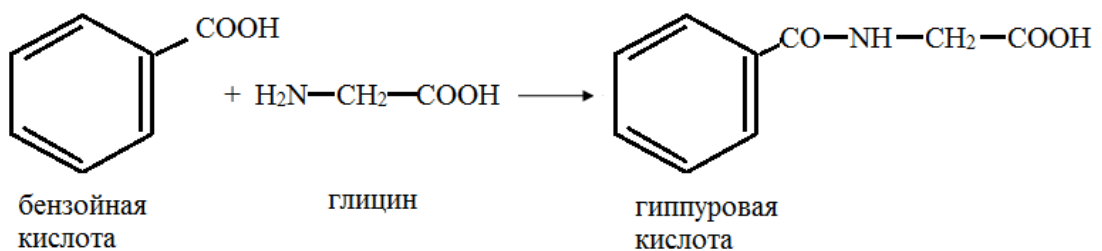
– процессы, в результате которых образуются активированные конъюгирующие агенты: реакции метилирования, ацетилирования, образования глюкуронидов, гликозидов и сульфатов;

– процессы, для которых характерно образование активированного субстрата, например, аминокислотная конъюгация.

В определенных ситуациях реакции конъюгации считаются высокоэффективными путями снижения токсичности некоторых ксенобиотиков. Наиболее изучены следующие реакции конъюгации:

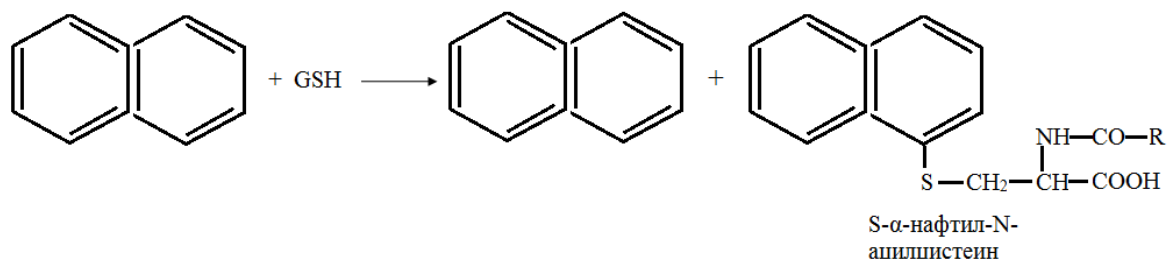
1) *конъюгация ацетата* при участии ацетил-КоА с некоторыми ароматическими аминами и сульфонидами;

2) *конъюгация глицина* с бензойной кислотой, описанная Келлером в 1842 г., – одна из первых изученных реакций биотрансформации:



3) *конъюгация трипептида глутатиона*. Глутатион – эффективный конъюгирующий агент для конденсирования кольцевых систем — нафталина, антрацена, фенантрена.

Глутатион принимает участие в реакциях биотрансформации таких устойчивых ксенобиотиков, как нафталин:



Многие ксенобиотики выделяются в мочу в виде меркаптуровых кислот. Такие конъюгаты образуются в результате взаимодействия ксенобиотиков с глутатионом;

4) *метионин и этионин* участвуют в реакциях алкилирования. Таким образом метилируется пиридин, пирогаллол; сульфиты, селениты, теллуриты подвергаются биологическому метилированию и превращаются в летучие диметильные производные;

5) *орнитин* используется при детоксикации бензойной кислоты в организме рептилий и птиц, а аргинин – в организмчленистоногих;

6) *глутамин* у приматов используется для конъюгации фенилуксусной кислоты и некоторых ее гетероциклических аналогов;

7) *рибоза и глюкоза* часто используются для конъюгации; конъюгаты глюкозы особенно широко представлены в растениях, у моллюсков и насекомых. Способность растений гликолизировать ксенобиотики была открыта в 1938 г. Д. Миллером. Гликозирование является основным путем детоксикации растениями чужеродных фенолов;

8) *конъюгация ксенобиотиков с глюкуроновой кислотой* (образование глюкуронидов) – наиболее важный механизм детоксикации ксенобиотиков. В реакции участвует активная форма глюкуроновой кислоты – уридиндифосфоглюкуроновая кислота (УДФГ). Катализирует процесс уридиндифосфатглюкуронозилтрансфераза (УДФГТ), локализованная в мембранах ЭР гепатоцитов, легких, кожи, кишечника, почек.

Глюкуроновая кислота используется для конъюгации с ксенобиотиками у большинства позвоночных и всех млекопитающих. Она имеет преимущество перед глюкозой как детоксицирующий агент, поскольку содержит ионизируемую группу. Конъюгации подвергаются спирты, фенолы, карбоксилы, амины, гидроксилмины, карбамиды, сульфонамиды и тиолы;

9) *конъюгация с лигнином*. С лигнином могут ковалентно связываться молекулы пестицидов 2,4-Д (дихлорфеноксиуксусная кислота), пентахлорфенола, а также 3,4-дихлоранилина;

10) *сульфатная конъюгация (сульфатирование)* – эволюционно один из древних видов биотрансформации. В нее вступают фенолы, спирты, ароматические амины, гидроксилламины, некоторые стероиды. Происходит с участием сульфатаденилтрансферазы, аденилсульфаткиназы, и др. ферментов. В некоторых случаях сульфатная конъюгация приводит к появлению канцерогенного вещества, взаимодействующего с нуклеиновыми кислотами.

Описаны также и другие виды конъюгации (например, фосфатная конъюгация, реакция ксенобиотиков с глицинтаурином и формилом).

Дегалогенирование. К хлорсодержащим ксенобиотикам относятся многие персистентные поллютанты, в том числе пестициды, а также ряд природных метаболитов низших растений.

Можно выделить следующие виды реакций дегалогенирования:

1) *гидролитическое дегалогенирование* (хлорированных алифатических кислот, при деградации ароматических пестицидов). Например, гербицид 2,4-Д деградируется почвенными бактериями с участием реакции этого типа;

2) *восстановительное дегалогенирование* – это реакция замещения атома галоида на водород. Многие бактерии, грибы, водоросли таким образом трансформируют ДДТ в ДДД. Могут образоваться интермедиаты, токсичные для клеток.

3) *Окислительное дегалогенирование.* Реакции этого типа подразделяются на: дегидрогалогенирование (при метаболизме ДДТ); окислительное дегалогенирование с образованием двойной связи; дегалогенирование – гидроксילирование с участием молекулярного кислорода.

6.3 Факторы, влияющие на метаболизм ксенобиотиков

Эти факторы могут быть:

– *генетическими* – относятся видовые различия и различия внутри одного вида.

– *физиологическими*, которые влияют на метаболизм – относятся возраст, пол, состояние питания, заболевания и т. д.

– *факторы окружающей среды:* стресс из-за неблагоприятных условий, облучение ионизирующей радиацией, окислительно-восстановительный потенциал (ОВП), наличие других ксенобиотиков.

– *природа (структура)* ксенобиотиков.

Так, неблагоприятные внешние условия приводят к увеличению микросомального окисления, а ионизирующая радиация вызывает угнетение гидроксильирования стероидов. Хорошо известно активирование метаболизма чужеродных соединений введением других ксенобиотиков – медикаментов, пестицидов и полициклических углеводов (явление лекарственного синергизма и толерантности, индукция ферментов и канцерогенезу).

Ксенобиотики оказывают стимулирующий эффект путем увеличения количества микросомальных ферментов, в том числе цитохрома Р-450 и НАДФ-Н-цитохром-с-редуктазы. Это может происходить вследствие увеличения поверхности мембраны, скорости синтеза ферментов и уменьшения скорости их распада.

Известен ряд лекарственных препаратов, которые подавляют микросомальный метаболизм ксенобиотиков, продлевая тем самым действие многих лекарств.

Имеется много данных по зависимости скорости метаболических превращений от природы вещества. Многие из ароматических углеводов содержатся в сырой нефти и каменном дегте, некоторые известны как канцерогены. Основная реакция в их метаболических превращениях – это реакция гидроксилирования (сопровождается введением молекулы воды, образуются дигидролы). Даже для ряда близких по структуре многоядерных углеводов скорость метаболизма изменяется более чем в двадцать раз.

У некоторых соединений (например, 1,1-дихлорэтан, 1,1-дихлорпропан и 1,1,2-трихлорпропан) дехлорирование протекает очень легко, тогда как другие вещества очень устойчивы к этому превращению. Скорость реакции дехлорирования повышается, если хлорированный атом связан с одним атомом водорода.

Экспериментальные данные показывают, что родственные вещества метаболизируются оксидазой микросом печени крыс, обладающей смешанной функцией, с разной скоростью. Такие изменения активности обусловлены ограниченной доступностью активных мест на поверхности фермента и стереохимическими свойствами субстрата.

На скорость реакции могут влиять изменения плотности электронов в молекуле субстрата, вызываемые различными заместителями.

Лекция 7

Особенности метаболизма ксенобиотиков у различных организмов

7.1 Особенности метаболизма ксенобиотиков микроорганизмами

7.2 Особенности метаболизма ксенобиотиков растениями

7.3 Механизмы детоксикации ксенобиотиков

7.1 Особенности метаболизма ксенобиотиков микроорганизмами

Различия между организмами в их реакциях на воздействие ксенобиотиков обусловлены разной способностью метаболизировать эти вещества и могут быть очень существенными. Например, в процессе деметилирования антипирена препарат печени хомяка почти в 200 раз активнее препарата печени краба. Более низкая активность, по-видимому, характерна для всех водных организмов, что хорошо согласуется с их способностью аккумулялировать вещества из среды обитания.

В пределах одного вида уровень микросомальной активности зависит от пола организма и стадии его развития. В разных органах – печени, кишечнике, легких и т. д. – активность также различна.

Далее следует отметить, что в природе очень распространены процессы ферментативной модификации микроорганизмами различных по химическому строению и физико-химическим свойствам ксенобиотиков. Микроорганизмы обычно содержат большое число ферментов, участвующих в процессах трансформации ксенобиотиков.

Между микроорганизмами, обитающими во внешней среде и живущими внутри организма, существуют значительные различия в метаболизме ксенобиотиков. Так, многие микроорганизмы внешней среды, в отличие от кишечной микрофлоры, способны к более глубокой деградации (разрыву ароматических ядер и гетероциклических колец) ксенобиотиков. Продукты расщепления служат для микроорганизмов единственным источником углерода. Источником серы для них также могут быть продукты трансформации некоторых ксенобиотиков.

Типичные реакции метаболизма ксенобиотиков в микроорганизмах напоминают таковые у животных организмов. Однако есть и специфические механизмы трансформации чужеродных соединений микроорганизмами. В микробиологической трансформации ксенобиотиков различаются процессы метаболизма и кометаболизма.

Под метаболизмом понимают превращение соединения до конечного продукта реакции, который не участвует в трансформации. *Кометаболизм* – это изменение структуры молекулы ксенобиотика, катализируемое ферментами микроорганизмов, которые выросли на субстратах или их метаболитах. Субстраты оказывают индуцирующее действие на такие

ферменты. Существует и другое определение кометаболизма как трансформационного процесса, в котором обязательно должны участвовать ростовые субстраты определенного химического состава.

Многие ксенобиотики (например, ДДТ и некоторые другие пестициды) могут разлагаться рядом микроорганизмов только в условиях кометаболизма, т. е. при обеспеченности соответствующими косубстратами, кофакторами и т. д. Так, в экспериментальных условиях метаболизм некоторых пестицидов значительно стимулировался добавками этанола, глюкозы и др.

Во многих случаях в метаболизм сложных органических веществ вовлекается не одна, а несколько ферментативных систем микроорганизмов. По аналогии с животными данный процесс называется политрансформацией.

Среди микроорганизмов чаще всего встречаются штаммы, осуществляющие неполную деградацию ксенобиотиков. Поэтому полное разрушение, например, пестицидов требует, как правило, совместного действия нескольких организмов и абиотических факторов.

Очень важен тот факт, что генетическая способность некоторых штаммов бактерий разрушать тот или иной ксенобиотик зависит от наличия в клетках плазмид. Обнаружено около полутора десятков плазмид, придающих бактериям способность разрушать органические вещества.

Было обнаружено, что один из штаммов почвенной бактерии *Alcaliqueus paradoxus* содержит плазмиду, придающую микроорганизму способность разрушать широко распространенный гербицид 2,4-Д (дихлорфеноксисукусная кислота). Показано, что эта плазида находится и у другого вида бактерий (*A. eutrophus*); она относится к группе плазмид с широким спектром хозяев.

Вероятно, с помощью генной инженерии и конструирования плазмид, объединяющих гены, ответственные за отдельные последовательные стадии разрушения устойчивых пестицидов, можно будет придать бактериям способность разрушать ряд ксенобиотиков. Возможно, что полезным окажется клонирование (операция, приводящая к накоплению большого числа копий определенного участка ДНК) генов резистентных насекомых, ответственных за детоксикацию пестицидов.

В метаболизме некоторых ксенобиотиков бактериями действуют окислительные ферменты – диоксигеназы. В отличие от монооксигеназ диоксигеназы внедряют в субстрат два атома кислорода.

7.2 Особенности метаболизма ксенобиотиков растениями

В высших наземных и водных растениях функции активаторов кислорода и его восстановления осуществляют пероксидазы, каталаза и полифенолоксидазы.

Растения способны к метаболическому превращению ксенобиотиков, хотя, в отличие от животных, не имеют органа или специальной ткани,

ответственных за их метаболизм. Различные части растений содержат ферменты, катализирующие превращение ксенобиотиков. Так как один и тот же организм имеет участки различного возраста, то их активность неодинакова. Микросомальная система, участвующая в процессах биотрансформации, распространена в разных растительных органах и тканях: корнях, корнеплодах, корневищах, листьях и зрелых плодах.

Наличие системы биотрансформации чужеродных соединений у растений удалось выявить в результате опытов с мечеными веществами. Растения могут запасать токсины в своих клетках в нетоксичной связанной форме (например, HCN связывается в цианистый гликозид).

Наиболее изучена у растений, как и у других организмов, трансформация органических ксенобиотиков.

Трансформация ксенобиотиков у растений происходит, как и у животных, за счет реакций окисления, восстановления, гидролиза и последующей конъюгации. Эти процессы служат инактивации ксенобиотика и переводу его в растворимое состояние, что позволяет либо изолировать его в клеточных вакуолях, либо (что бывает редко) вывести через корневую систему и листья.

Для растений характерна конъюгация с глюкозой; иногда происходит конъюгация ксенобиотика с аминокислотой или белками. В последние годы установлена конъюгация с лигнином. Чужеродные вещества, содержащие фенольные или азотистые группировки, биотрансформируются прямым путем с образованием гликозида. Однако в случае отсутствия у токсических веществ таких функциональных группировок в пре-конъюгационном процессе должно происходить их введение в структуру молекулы.

Таким образом, ключевым процессом в трансформации органических веществ растением является образование гликозида, которое протекает с участием фермента гликозилтрансферазы в присутствии в качестве кофактора уридиндифосфатглюкозы. В отличие от этого для животных более характерно образование глюкоуронида или этерифицированного сульфата.

7.3 Механизмы детоксикации ксенобиотиков

В наиболее типичном варианте система защиты от самых разных ксенобиотиков представлена трехэтапным процессом, включающим фазы: 1) активации ксенобиотиков, 2) нейтрализации ксенобиотиков, 3) выведение ксенобиотиков из организма. Биотрансформация ксенобиотиков играет ключевую роль в механизмах адаптации организма к факторам внешней среды. Она включает три последовательные и функционально сопряженные фазы, которые осуществляются за счет активности более 200 различных ферментов. Каждому индивидууму свойственна уникальная конфигурация генов, ответственных за синтез ферментов системы биотрансформа-

ции, и, соответственно, уникальную реакцию каждого человека на повреждающие действие, как факторов внешней среды, так и эндогенных факторов. Причиной фенотипических различий является полиморфизм соответствующих генов.

Сначала поступающие в организм чужеродные соединения (канцерогены, лекарства, промышленные яды и пр.) активируются с помощью ферментов семейства цитохромов P450 или микросомальных эпоксидгидролаз (mEPOX) , образуя короткоживущие промежуточные электрофильные метаболиты, которые обладают генотоксическими свойствами. В процессе первой фазы нередко происходит активация гидрофобных ксенобиотиков с образованием активных промежуточных электрофильных метаболитов, являющихся основным субстратом детоксикации системы ферментов второй фазы.

Главным назначением второй фазы является нейтрализация дезактивация, детоксикация гидрофильных и зачастую токсичных продуктов первой фазы при помощи различных гидролаз и трансфераз . Промежуточные метаболиты с помощью ферментов семейств глутатионтрансферазы (GSTM) , УДФ-глюкуронсульфотрансфераз (UDF) , N-ацетилтрансфераз (NAT) превращаются в водорастворимые нетоксические продукты и выводятся из организма. Ферменты второй фазы присутствуют во всех клетках, т. е. функционируют при любых путях поступления ксенобиотиков, осуществляют или завершают детоксикацию, а иногда исправляют ошибки первой фазы. Большинство этих ферментов находятся в гиалоплазме, часть из них локализована в мембранах эндоплазматического ретикулума и митохондрий.

Наиболее эффективно система детоксикации функционирует при сопряженном, гармоничном действии ферментов первой и второй фазы. Десинхронизация этих процессов ведет к быстрому отравлению организма в результате накопления продуктов перекисного окисления, различных канцерогенов, мутагенов и тератогенов.

В третьей фазе биотрансформации происходит выведение из организма продуктов детоксикации через легкие, почки, кишечник. Важная роль в этих процессах принадлежит белку плазмы крови – альбумину, который связывает и транспортирует метаболиты экзогенных и эндогенных субстратов, в том числе продукты первой и второй фаз детоксикации.

Лекция 8

Хелатообразование и снижение токсических эффектов в организме

- 8.1 Химизм хелатообразования
- 8.2 Механизмы биологического действия хелатирующих агентов
- 8.3 Основные принципы создания новых хелатирующих агентов, перспективы их применения

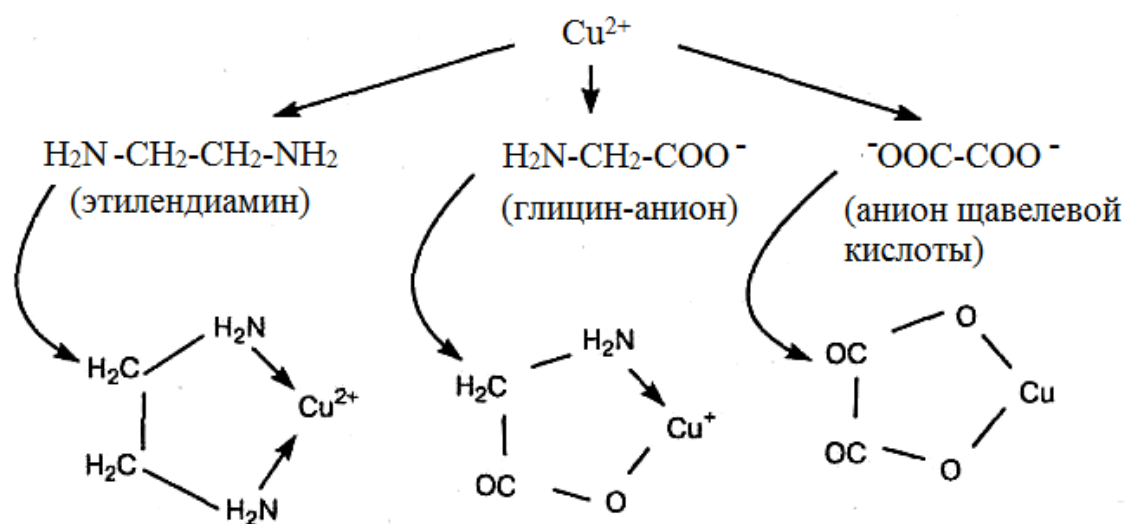
8.1 Химизм хелатообразования

Известно много веществ (лигандов), способных связываться с металлами. Они часто образуют с ними хелатные соединения. Если металл оказывается заключенным в лиганде между такими элементами, как N, O или S, то образуется хелатное кольцо.

Понятие «лиганд» относится не ко всем находящимся в системе молекулам органического соединения, а только к их части, находящейся в соответствующей форме, которая может связывать катион металла.

В зависимости от количества вступивших во взаимодействие атомов металлов и лигандов могут образовываться комплексы 1:1, 1:2 и др.

Образование комплексов в стехиометрическом соотношении 1:1. Три основных типа лигандов, образующих одно кольцо в комплексе 1:1 (бидентатные лиганды):



Стрелки в кольце показывают направление смещения неподеленной в норме пары электронов от атомов O, N или S к металлу.

а) если лиганд содержит две электрондонорные группы (этилендиамин), то заряд катиона металла при образовании хелатного соединения не меняется;

б) если лиганд содержит одну электронодонорную и одну анионную группу (глицин), то заряд металла уменьшается на единицу;

в) если, лиганд содержит две анионные группы (щавелевая кислота), то заряд металла уменьшается на две единицы.

Хелатные связи с атомами кислорода и азота возникают, обычно, в случае образования пяти- и шестичленных циклов (такие циклы значительно стабильнее). Однако при образовании хелатных связей через серу возникают устойчивые четырехчленные циклы.

Образование комплексов в стехиометрическом соотношении 2:1. Такие комплексы могут образовываться в присутствии избытка лигандов.

Образование комплексов 2:1 обусловлено тем, что:

– комплексы щавелевой кислоты 1:1 могут соединяться в дальнейшем с комплексом этилендиаминового типа, образуя смешанные комплексы;

– комплексы 1:1 глицинового типа способны соединяться с другими лигандами этого типа;

– комплекс 1:1, образованный лигандами, подобными этилендиаминам, может соединяться с любым из трех типов лигандов, образующих комплексы 1:1.

Для оценки прочности связей применяют константы устойчивости, характеризующие равновесие между одним или несколькими лигандами и одним ионом металла, подчиняющееся закону действия масс. Так, для комплекса в соотношении 1:1 константа устойчивости (Θ) рассчитывается по формуле:

$$\Theta = \frac{[\text{MeX}]}{[\text{Me}] [\text{X}]} .$$

В приведенном уравнении в числителе находится значение концентрации комплекса, а в знаменателе – значение концентраций образующих его компонентов.

Факторы, влияющие на хелатообразование:

1) *радиус иона.* Металлы по своему средству к большинству хелатирующих агентов располагаются в следующем порядке (от наибольшего средства к наименьшему): Fe^{3+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Li^+ , Na^+ , K^+ .

В ряду металлов, являющимся первым рядом переходных элементов, ${}_{25}\text{Mn}$, ${}_{26}\text{Fe}$, ${}_{27}\text{Co}$, ${}_{28}\text{Ni}$, ${}_{29}\text{Cu}$, ${}_{30}\text{Zn}$ средство к хелатирующим агентам последовательно увеличивается, достигая максимума у меди (Cu^{2+}). Повышение средства к хелатирующим агентам является следствием уменьшения ионного радиуса.

С увеличением заряда катиона металла происходит уменьшение его радиуса, поэтому Fe^{3+} имеет большее средство, чем Fe^{2+} (ионы трехвалентных металлов располагаются в начале ряда, а одновалентных – в конце).

2) *степень ионизации хелатообразующих агентов*. Вещество, обладающее меньшим сродством к металлу, может присоединить большее количество катионов металла, чем вещества, у которых это сродство больше. Это объясняется тем, что для хелатообразования необходимо не только наличие сродства между лигандом и металлом, но также быстрое образование анионов лиганда из агента (или молекул лиганда), т. е. зависит от значения константы ионизации.

3) *химическая природа лиганда*. Большинство металлов легче соединяются с лигандами, содержащими кислород, а не серу. Однако Cu^+ , Ag^+ , Hg^{2+} , As^+ и Sb^{3+} отдают предпочтение сере; у Cu^{2+} , Ni^{2+} и Co^{2+} сродство к сере несколько выше, чем к кислороду, если сера находится в неионизированном состоянии, как, например, в органических сульфидах.

4) *изменение окислительно-восстановительного потенциала металла*, вызванное образованием хелатных соединений с металлами, имеющими переменную валентность (например, Cu, Fe, Co, Mn, Mo, V). Вследствие хелатообразования такие металлы могут даже изменять первоначальную валентность.

Металл может изменять избирательность органического лиганда:

- влияя на распределение электронов в лиганде;
- повышая реакционную способность активного центра лиганда;
- вызывая изменение конформации лиганда;
- обеспечивая возможность присоединения или отрыва электрона;
- увеличивая липофильность лиганда и, следовательно, его способность проникать в живую клетку.

8.2 Механизмы биологического действия хелатирующих агентов

Наличие двухфазной реакции организма на металлы свидетельствует о существовании двух разных механизмов действия хелатирующего агента в биологических системах: 1) удаление металлов из клетки или «маскировка» их в клетке (в виде комплексов); 2) накопление в клетке металлов в большем количестве, чем в обычных условиях. Дальнейшее подразделение зависит от того, являются ли исследуемые металлы жизненно важными или токсичными для организма.

Маскировка. Большинство хелатирующих агентов, биологическое действие которых осуществляется через «маскировку» или удаление из организма токсичных металлов (по первому механизму), случайно попавших в организм, получили распространение в качестве антидотов.

Антидоты – это хелатирующие вещества, уменьшающие токсическое действие чужеродного для организма соединения.

Первый антидот – димеркапрол был синтезирован в 1940 г. в качестве антидота при отравлениях боевым отравляющим веществом, содержащим мышьяк. В настоящее время его часто применяют для лечения отравлений

соединениями золота, ртути (в виде неорганических и органических соединений), сурьмы и мышьяка.

По сути, любой антидот – химическое вещество, предназначенное для введения до, в момент или после поступления токсиканта в организм, то есть коергист, обязательным свойством которого должен быть антагонизм к яду. Антагонизм никогда не бывает абсолютным и его выраженность существенным образом зависит от последовательности введения веществ, их доз, времени между введениями. Очень часто антагонизм носит односторонний характер: одно из соединений ослабляет действие на организм другого, но не наоборот.

Антидоты широко используются при профессиональных и бытовых отравлениях, хронических интоксикациях металлами, вызванных передозировками лекарственных препаратов, для ускорения выведения из организма радионуклидов.

Обычно выделяют следующие механизмы антагонистических отношений двух химических веществ: химический, биохимический, физиологический, основанный на модификации процессов метаболизма ксенобиотика.

Антидоты с *химическим антагонизмом* непосредственно связываются с токсикантами. При этом осуществляется нейтрализация свободно циркулирующего яда. *Биохимические антагонисты* вытесняют токсикант из его связи с биомолекулами-мишенями и восстанавливают нормальное течение биохимических процессов в организме. *Физиологические антидоты*, как правило, нормализуют проведение нервных импульсов в синапсах, подвергшихся атаке токсикантов. *Модификаторы метаболизма* препятствуют превращению ксенобиотика в высокотоксичные метаболиты, либо, ускоряют биодетоксикацию вещества.

Требования, предъявляемые к антидотам:

- они должны циркулировать в крови, не вызывая уменьшения концентрации жизненно важных тяжелых металлов;
- для того чтобы антидот смог проникать в клетку в небольших количествах и быстро выводиться из организма, его молекулы должны содержать полярные (желательно легко ионизирующиеся) группы, например, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$, $-\text{NH}_2$. Эти группы должны присутствовать в избытке;
- желательно, чтобы хелатные комплексы антидота не могли проникать в клетки из кровотока;
- хелатные комплексы антидота должны легко выводиться почками.

Негативное действие «маскировки». В редких случаях сам агент, связывающий металл, оказывается токсичным для организма. Повреждающее действие «маскировки» наиболее изучено на сильной кислоте. Синильная кислота связывает свободные валентности железа в цитохромоксидазе, не затрагивая связей с порфириновым ядром. В результате фермент лишается возможности соединяться со своим субстратом и дыхание прекращается. У многих видов это приводит к немедленной гибели организма.

Накопление. Накопление обусловлено такими явлениями, как 1) перевод вещества из одной формы в другую, что облегчает поступление ксенобиотика в организм; 2) кооперативный эффект; 3) эффект распределения.

1) *Перевод вещества из одной формы в другую.*

Пример 1. Использование хелатообразования для подкормки деревьев железом. Большая часть железа, содержащегося в почве, недоступна для растений. В доступную форму железо переводят соответствующие почвенные бактерии, которые растворяют его с помощью гидроксаматсидеорофоров. Такие железоорганические комплексы накапливаются в почвах и используются для питания растениями. Отсутствие полезных бактерий можно компенсировать опрыскиванием почвы этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА), экстрагирующей железо путем образования комплекса железо – ЭДТА, который поглощается корнями растений. В процессе метаболизма органическая часть комплекса разрушается, а неорганическая (железо) – остается и используется растением.

Такие природные агонисты млекопитающих, как тироксин, норадреналин и гистамин, также способны связывать металлы.

Пример 2. Использование глюконата кальция для введения больным, страдающим недостатком кальция. Комплекс кальция с глюконовой кислотой медленно разрушается в организме с выделением ионов кальция.

2) *Кооперативный эффект* – явление возрастания химической активности ксенобиотика вследствие хелатообразования. Кооперативный эффект чаще всего проявляется в тех случаях, когда прибавляется недостаточное количество комплексообразующего агента, т. е. образуется ненасыщенный комплекс.

Пример 1. Возрастание каталазной и пероксидазной активности железа при переводе его из неорганических солей в порфириновое ядро, связанное со специфичным белком.

Пример 2. Многократное усиление каталитического действия меди (ионы меди катализируют окисление аскорбиновой кислоты на воздухе) при включении ее в аскорбиноксидазу.

При добавлении комплексообразующего соединения с целью дезактивации металла может наблюдаться усиление токсического действия (усиление каталитической активности). Такой эффект характерен для металлов с переменной валентностью, особенно для меди и железа.

3) *Эффект распределения.* Клеточные мембраны точно регулируют поглощение катионов тяжелых металлов. Однако комплексы, не имеющие заряда, жирорастворимы и поэтому способны легко проникать в клетку через клеточные мембраны. Такие комплексы могут накапливаться в разных органах и тканях.

8.4. Основные принципы создания новых хелатирующих агентов, перспективы их применения

Поводом для создания эффективного противоядия является либо случайное обнаружение факта антагонизма веществ, либо целенаправленное и глубокое изучение механизмов действия токсиканта, особенностей его токсикокинетики и установление на этой основе возможности химической модификации токсичности. В любом случае, пока не найден относительно активный антагонист, процесс разработки антидотов идет сложно.

После выявления антагониста начинается планирование и проведение целенаправленных, порой длительных исследований по выбору из большого числа аналогов исходного вещества таких средств, которые в наибольшей степени соответствуют требованиям:

- высокая эффективность;
- хорошая переносимость;
- дешевизна.

Оценка эффективности средств, рассматриваемых как потенциальные антидоты, может быть проведена в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

При создании новых хелатирующих агентов руководствуются следующими принципами:

- 1) следует учитывать биологическую активность этих соединений;
- 2) необходимо предполагать место их биологического действия: например, внутри, или снаружи клетки. Если молекула должна проникнуть в клетку, то необходимо ввести липофильные группы. Для этой цели используют атомы углерода, галогенов, водорода и серы. Атомы азота и кислорода придают молекулам гидрофильные свойства;
- 3) необходимо учитывать то, что очень небольшие изменения в химической структуре молекулы ксенобиотиков могут вызывать значительные сдвиги в величинах коэффициентов распределения;
- 4) можно увеличить способность вещества проникать в клетки путем повышения коэффициента распределения и используя лиганды, сходные с природными субстратами, например аминокислоты, углеводороды.

Современный поиск хелатирующих средств направлен на:

- 1) решение вопросов детоксикации и обезвреживания тканей, поврежденных химически токсичными или радиоактивными металлами
- 2) предупреждение хелатообразования, как, например, в случае кариеса зубов, преждевременного старения из-за потерь кальция из костной ткани и т. д.

К настоящему времени изучены характеристики десятков тысяч ксенобиотиков. Токсикологами постоянно «отслеживается» роль химических веществ, как причин острых интоксикаций среди населения. Накопленные данные позволяют формулировать прогноз, относительно перспектив разработки новых противоядий.

Противоядия могут быть разработаны лишь для ограниченного количества ксенобиотиков.

Во-первых, маловероятна разработка лечебных антидотов в отношении токсикантов, в основе механизма действия которых лежит альтерация биологических систем (например, денатурация макромолекул, разрушение биологических мембран) и образование прочных ковалентных связей с биомолекулами (например, действие алкилирующих агентов на белки и нуклеиновые кислоты). Сроки, в течение которых антагонисты подобных веществ оказываются эффективными, крайне непродолжительны и ограничены временем, необходимым для взаимодействия токсиканта с молекулами-мишенями (минуты).

Во-вторых, антидоты к малотоксичным (но порой весьма опасным) токсикантам редко оказываются достаточно эффективными. Установлено, что чем менее токсично вещество, тем менее специфично его действие, тем больше механизмов, посредством которых оно инициирует развитие токсического процесса.

Противоядия следует разрабатывать лишь для ограниченного количества ксенобиотиков и вполне конкретным условиям оказания помощи.

Известно более 10 миллионов химических соединений, большая часть которых теоретически может стать причиной острых отравлений. Уже одно количество потенциальных токсикантов показывает, насколько нереалистичной является постановка задачи на разработку антидотов к любому из них.

Вместе с тем, антидот требуется всегда, когда помощь должна быть оказана быстро и большому количеству пострадавших. Критериями, позволяющими определить вещества, разработка антидотов к которым имеет смысл в современных условиях, могут быть:

- потенциальная возможность применения токсиканта с военными и полицейскими целями;
- большие масштабы производства и высокая вероятность формирования массовых поражений людей при авариях и катастрофах;
- высокая токсичность ксенобиотика, в сочетании с обратимостью действия на системы-мишени;
- установленные механизмы токсического действия, позволяющие предполагать возможность разработки противоядия;
- наличие данных о существовании веществ-антагонистов.

Лекция 9

Биоаккумуляция ксенобиотиков

9.1 Коэффициент накопления

9.2 Одно- и многокомпарментные системы, однократное и многократное дозирование

9.3 Факторы, влияющие на аккумуляцию ксенобиотиков организмами

9.1. Коэффициент накопления

Организмы, обитающие в окружающей среде, содержащей относительно низкую концентрацию какого-либо вещества, могут накапливать его в своих тканях до концентраций, на несколько порядков больших, чем в среде обитания.

Способность живых организмов накапливать различные элементы даже при очень низком их содержании в среде называется **биоаккумуляцией**. Способность организмов к накоплению веществ характеризуется коэффициентом накопления (N):

$$N = \frac{\text{содержание (концентрация) вещества в организме}}{\text{содержание (концентрация) вещества в окружающей среде}}.$$

Явление биоаккумуляции ксенобиотиков было обнаружено при изучении накопления пестицидов, в частности хлорсодержащих углеводородов. Так, в одной из экосистем озера Мичиган (США) была выявлена биоконцентрация ДДТ в следующем ряду:

0,014 мг/кг (при расчете на сырую массу) – в донном иле;

0,41 мг/кг – в ракообразных, питающихся на дне;

3–6 мг/кг – в рыбах (бельдюговые, язь, елец);

24 000 мг/кг – в жировой ткани чаек, питающихся рыбой.

В больших количествах идет накопление организмами ПХБ (полихлорбифенилы). Обладая низкой скоростью разложения в окружающей среде (период полураспада около 5 лет), ПХБ поступают в пищевые цепи и в значительных количествах аккумуляруются в живых организмах. Например, в угрях, выловленных из воды с содержанием полихлорбифенила 0,1 мкг/л, концентрация этого вещества составила 7,9 мг/кг, т. е. коэффициент накопления ПХБ был равен около 80 000.

Включение ПХБ в трофические цепи типа *водоросли (планктон) – ракообразные – рыбы – человек* может привести к поступлению в организм человека с продуктами питания больших количеств этих токсикантов. Поступление ПХБ в организм ребенка с материнским молоком может достигать 3 мкг/кг массы в сутки.

Велика накопительная способность и у растений, особенно водных. Наиболее известный и яркий пример – это накопление йода водорослью ламинарией. Содержание йода в ламинарии достигает 0,3 % при концентрации его в морской воде 0,0001 %. Еще в первой половине нашего столетия большое количество йода добывалось из золы ламинарии. Затем были разработаны более выгодные в техническом отношении способы его добычи на базе минерального сырья. Накопительные свойства растений используются для:

- 1) для поиска полезных ископаемых (так называемые фитогеохимические методы);
- 2) выделения биогеохимических провинций на основании анализа золы растений-концентраторов;
- 3) контроля радиоактивности вод Мирового океана (радиоальгологический анализ).

9.2 Одно- и многокомпартментные системы, однократное и многократное дозирование

Введение в организм *разовой дозы* вещества приводит к появлению определенного количества этого вещества в тканях. В процессах метаболизма и экскреции это вещество выводится из организма с определенной скоростью. Например, концентрационная зависимость ДДТ от времени в жировой ткани человека при однократном дозировании имеет экспоненциальный характер (рисунок 14 а). В этом случае зависимость, представленная в полулогарифмических координатах, выражается прямой линией, наклон которой определяет константу скорости реакции (рисунок 14 б). Период полувыведения составил 3,7 года.

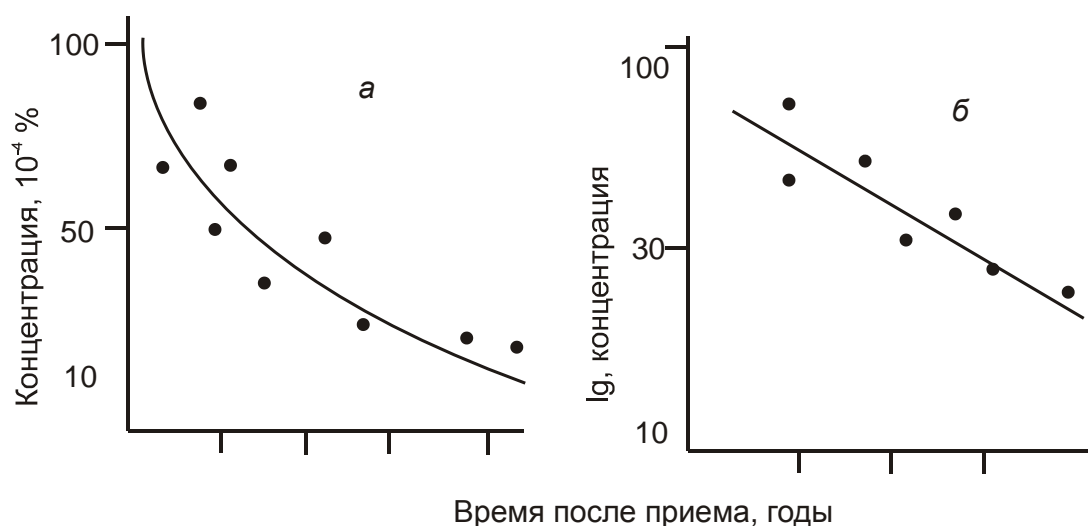


Рисунок 13 – Концентрация ДДТ в жировой ткани человека при одноразовом его приеме

Множественное дозирование. В природе воздействие вещества на организм редко ограничивается разовой дозой. Если в окружающей среде вещество распределено повсеместно, организм подвергается его воздействию непрерывно.

Предположим: организм ежедневно получает дозу в 1 г вещества, период полувыведения вещества в организме составляет 24 ч, организм поглощает все вещество, доза вводится за короткий промежуток времени.

В начальный момент (первый день) вещество в организме отсутствует. После введения дозы содержание вещества в организме составляет 1 г. На второй день, спустя 24 ч после приема первой дозы, организм содержит лишь 0,5 г вещества. Введение еще 1 г вещества повышает общее его содержание до 1,5 г. На третий день перед введением вещества его содержание вновь снижается наполовину, до 0,75 г, а после введения новой порции составит 1,75 г и т. д.

Со временем содержание вещества в организме достигает некоторого предельного максимального значения, так как при повышении концентрации в тканях ежедневное его выведение повышается и становится равным дозе, вводимой ежедневно. При увеличении первоначальной вводимой дозы повышается количество выводимого вещества и его содержание в организме, т. е. устанавливается новое равновесие.

Максимальное содержание вещества (A_{cp}) можно рассчитать по формуле:

$$A_{cp} = \frac{1,44 t_{1/2} Q_0 f}{\tau}$$

где $t_{1/2}$ – периодом полувыведения вещества, Q_0 – массой ежедневной дозы, f – часть этой дозы, которая поглощается организмом, τ – интервал между введением доз.

При $t_{1/2} = 24$ ч, $\tau = 24$ ч, $Q_0 = 1$ и $f = 1$ максимальная средняя нагрузка на организм составляет 1,44 г. Это средняя величина между максимальным и минимальным содержанием вещества в данный день.

Максимальная концентрация вещества в тканях зависит: от размера дозы (повышается при ее увеличении) и от периода полувыведения или скорости выведения. Вещества с большим периодом полувыведения соответственно накапливаются в больших концентрациях. Другим важным фактором является время, необходимое для достижения состояния равновесия.

Многокомпарментные системы (многоячеистые). Каждая ткань животного – ткань почек, печени, сердца, мозга, жировые отложения – рассматривается как ячейка. После того как вещество попадает в организм, оно начинает перемещаться с током крови. Каждая ячейка характеризуется своим размером, содержанием жира, скоростью тока крови, коэффициентом распределения, определяющим способность вещества перемещаться из

крови в ткань. Определив скорость поглощения и скорость выведения (обычно включающую скорость метаболизма в печени) вещества, а также подобрав соответствующие математические соотношения, можно с помощью ЭВМ создать модели многоячеечной системы (рисунок 15).

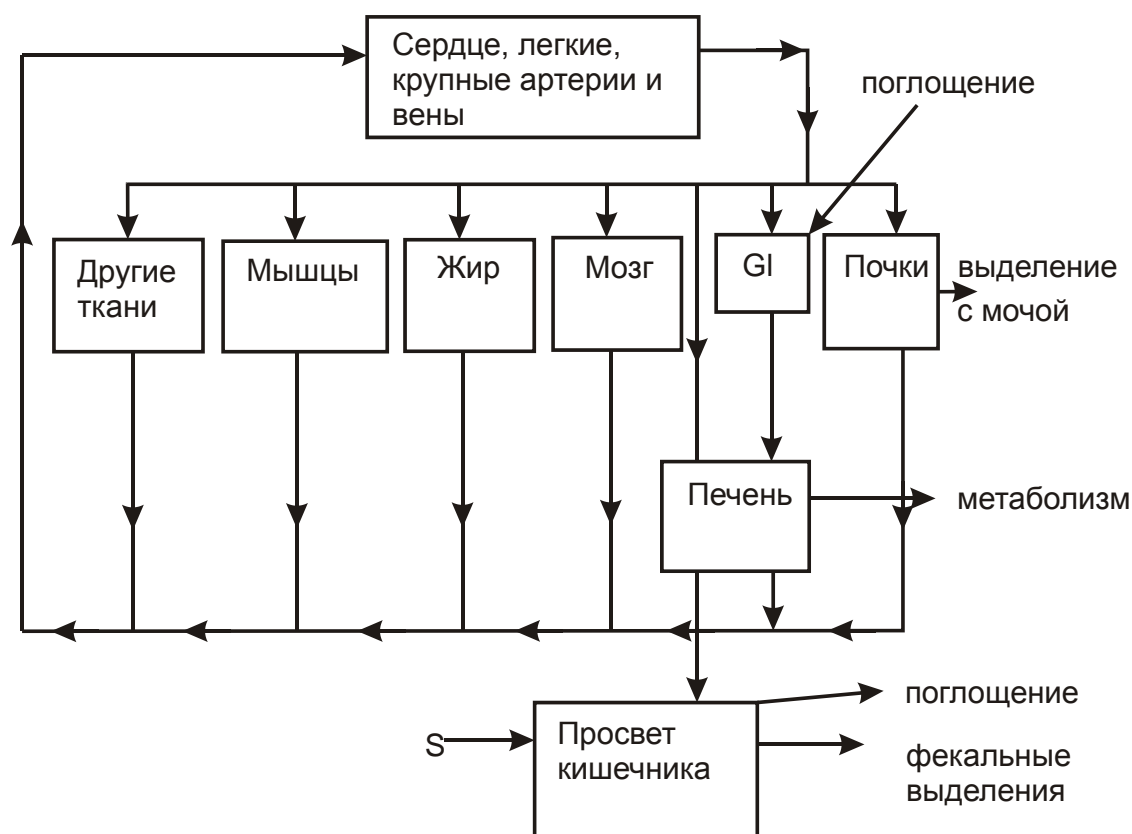


Рисунок 15 – Схематическое изображение тока крови и распределения вещества в тканях организма как многоячеечной системы

Соответствие таких моделей реальным системам необходимо подтверждать экспериментальными данными. В рамках разработанной модели можно провести анализ взаимного влияния различных переменных и прогнозировать те ситуации, которые невозможно воспроизвести экспериментально.

9.3 Факторы, влияющие на аккумуляцию ксенобиотиков организмами

Устойчивость ксенобиотика. Для того чтобы ксенобиотик мог накапливаться в организме, его воздействие должно быть достаточно длительным, особенно когда оно осуществляется через цепь питания. Как правило, ксенобиотики, которые устойчивы в окружающей среде, в большинстве организмов имеют относительно продолжительные периоды полувыведения и

при высокой концентрации их в окружающей среде способны накапливаться в сравнительно больших количествах.

Площадь поверхности. Если процесс аккумуляции чужеродного вещества включает физические стадии (адсорбция, диффузия), степень его накопления в большей мере зависит от площади поверхности контакта организма с окружающей средой. Пример: адсорбция растениями пестицида из воздуха после опрыскивания или адсорбция организмами ПХБ (полихлорбифенилы) в водной среде.

Доступная для вещества поверхность относится к лимитирующим факторам, особенно, когда адсорбция является определяющим процессом в накоплении.

Величина поверхности на единицу массы или объема повышается при уменьшении размера частицы. Следовательно, если адсорбция в процессе аккумуляции играет значительную роль, то можно ожидать, что более мелкие организмы будут накапливать в единице объема большее количество вещества, чем более крупные.

Распределение. Большинство организмов содержит значительные жировые отложения. Степень аккумуляции вещества зависит от его способности распределяться в жировых депо. В этих тканях накапливаются ксенобиотики с большими значениями коэффициента распределения.

Способность данного ксенобиотика распределяться в жировых депо организма может также влиять на период его полувыведения. Жировые ткани – не самые активные в процессах метаболического преобразования.

Среда обитания. Среда обитания организма может существенно влиять на его способность аккумулятировать ксенобиотики. Устойчивые в окружающей среде ксенобиотики очень плохо растворяются в воде. Организмы, обитающие в донных отложениях, подвергаются воздействию более высоких концентраций ксенобиотика, чем находящиеся в верхних слоях того же самого участка водоема.

Размер частиц, проглатываемых организмами. Поскольку на более мелкие частицы в большем количестве адсорбируются на своей поверхности чужеродное вещество, чем крупные, то организмы, проглатывающие такие частицы, будут подвергаться воздействию более высокого содержания ксенобиотика.

Количество потребляемой пищи. Организмы, нуждающиеся в относительно большом количестве пищи, могут аккумулятировать чужеродное вещество из окружающей среды в большей степени, если процесс накопления ксенобиотика не компенсируется более активным процессом его выведения.

Цепь питания. Суммарное количество ксенобиотиков, поступающих в организм, в значительной степени определяется интенсивностью их разрушения под действием физико-химических факторов среды (свет, вода,

тепло и др.), скоростью их деструкции в предшествующих элементах трофических цепей и закономерностями биоконцентрации.

Организмы – компоненты экосистем – подразделяются на производителей (продуцентов), потребителей (консументов) и разрушителей (редуцентов), разлагающих сложные органические соединения мертвых остатков. По мере движения ксенобиотика по пищевой цепи к следующему консументу, в организме которого он метаболизируется в незначительной степени, происходит существенное увеличение концентрации чужеродного вещества.

При рассмотрении распределения любого ксенобиотика в экосистеме необходимо учитывать биологические аспекты, иметь определенные сведения об относительном положении различных видов в цепи питания, а также информацию о плотности популяций различных организмов и скоростях поглощения ими данного вещества.

Аккумуляция ксенобиотика в цепи питания определяется его перемещением по этой цепи, а также тем обстоятельством, что менее 50 % всей массы вещества преобразуется в ткани организма на следующем, более высоком уровне.

Процесс иллюстрируется схемой (рисунок 16), где показаны также возможные потери ксенобиотика путем экскреции на различных уровнях цепи питания. Проведенный анализ показывает, что концентрация чужеродного вещества в цепи питания постепенно повышается.

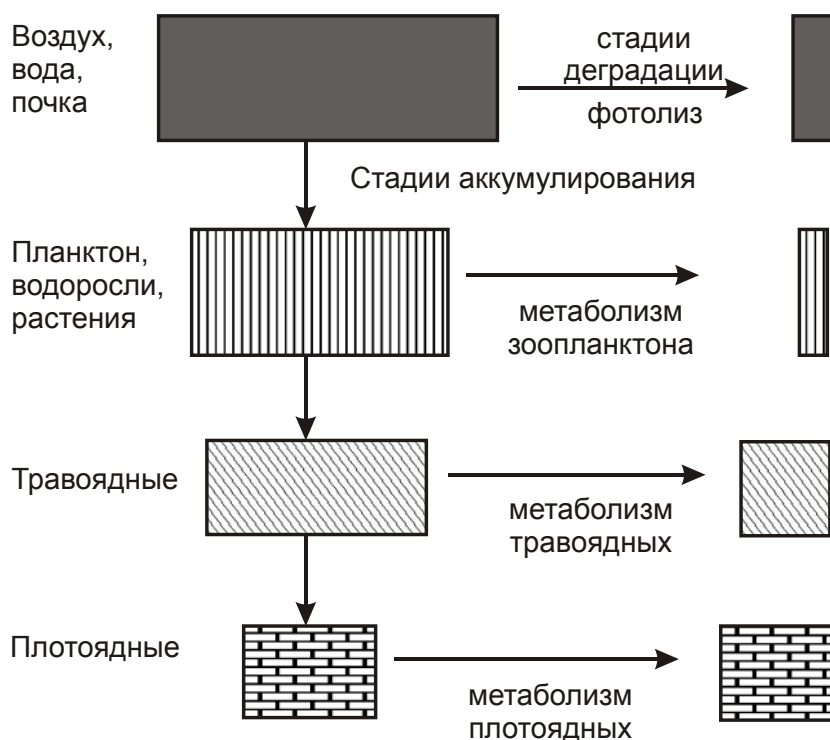


Рисунок 16 – Усиление в цепи питания: схема увеличения концентрации вещества в организмах по мере повышения трофического уровня

В условиях поступления в организм чужеродных химических веществ, которые не могут быстро метаболизироваться и полностью экскретироваться во внешнюю среду, начинается накопление этих веществ по ходу пищевой цепи. При этом, Поскольку организмы-потребители, стоящие на более высоких уровнях экологической пирамиды, обладают меньшей суммарной биомассой по сравнению с организмами предыдущего уровня, происходит последовательная биоконцентрация токсикантов, достигающая максимальных значений у конечных консументов, которыми могут являться люди.

Накопление токсических элементов в компонентах экосистем может вызывать разнообразные негативные эффекты, приводя к нарушению устойчивости экосистем и неблагоприятному влиянию на организм человека. Так, вследствие длительного и значительного накопления ДДТ и других химикатов в водоемах и промышленных стоках в 1989 г. была запрещена продажа рыбы из городских водоемов населению Западного Берлина.

В результате передачи через почву растениям и сельскохозяйственным животным свинца, входящего в состав этилированного бензина, возможно поступление этого токсиканта в организм человека.

С явлениями биоконцентрации связаны и кадмиевые катастрофы, произошедшие в 70-е годы в ФРГ и Японии. Тысячи японских граждан пали жертвой болезни «итай-итай» вследствие употребления зараженных кадмием питьевой воды и овощей в результате выбросов в окружающую среду отходов нефтекомбинатов.

Лекция 10

Механизмы избирательного действия ксенобиотиков

10.1 Избирательная токсичность ксенобиотиков

10.2 Избирательность действия, обусловленная преимущественным накоплением и распределением

10.3 Избирательность, обусловленная биохимическими различиям

10.4 Цитологические различия как основа избирательного действия

10.5 Влияние самого ксенобиотика на избирательную токсичность

10.1 Избирательная токсичность ксенобиотиков

Избирательным действием обладают многие вещества: большинство лекарственных средств, применяемых в медицине или ветеринарии, а также все фунгициды, инсектициды и гербициды, используемые в сельском хозяйстве.

Избирательность вещества – это его способность воздействовать на клетки, ткани, организмы только одного определенного типа и не влиять на другие, даже находящиеся в контакте с первыми.

Существует три основных фактора (механизма) определяющие избирательность действия вещества: 1) различия в распределении (соединение может избирательно накапливаться в различных клетках, органах и т. д); 2) биохимические факторы (вмешиваться в биохимические процессы, происходящие в живых организмах); 3) цитологические (соединение может взаимодействовать с цитологическими структурами, существующими только в определенных видах клеток и организмах).

10.2 Избирательность действия, обусловленная преимущественным накоплением и распределением

Избирательность действия, обусловленная преимущественным накоплением и распределением вещества, может быть вызвана морфологическими особенностями. Например, сильная опушенность сорняков по сравнению с культурными злаками или относительно большая (в расчете на единицу веса или объема) уязвимая поверхность тела насекомых по сравнению с млекопитающими приводит к большой площади контакта распыляемого агента с вредным видом.

Этот тип избирательности основывается на различии в распределении и накоплении. Агент, токсичный как для полезных, так и для вредных клеток, накапливается только в последних. Иногда полезные и вредные клетки находятся в организмах разных видов.

Пример 1. обработка посевов пшеницы 10 %-ном раствором серной кислоты из расчета 13000 л/га убивает сорняки, не повреждая растений пшеницы. Листья пшеницы имеют гладкую и скользкую поверхность, а у двудольных сорняков она грубая и морщинистая, поэтому серная кислота скатывается с побегов пшеницы и задерживается на сорняках. Кроме того, нежные молодые ростки хлебных злаков защищены листочками и находятся у основания растения, тогда как точка роста двудольных – на верхушках побегов, где они оказываются более уязвимыми.

Пример 2. Тетрациклины, применяемая для лечения бактериальных инфекций у млекопитающих, накапливаются преимущественно в клетках бактерий.

Пример 3. Йод избирательно накапливается в щитовидной железе. В зависимости от дозы йод может понижать повышенный уровень метаболизма в железе или повреждать ее, вызывая возникновение опухоли.

Пример 4. Гризеоульфин накапливается у человека только в ороговевших клетках – эпидермисе, волосах и ногтях. Поэтому он применяется при лечении грибковых поражений этих тканей, поскольку у грибов гризеофульвин блокирует митоз.

Следует помнить, что распределение ксенобиотиков (лекарственные препараты, гербициды и т. д.) связано с коэффициентом распределения.

В ряде случаев стараются получить вещества (лекарственные препараты), обладающие способностью накапливаться вблизи нужных клеток-мишеней (реципиентов).

Методы, позволяющих создать высокую концентрацию действующего вещества в нужном месте:

1) кусочек специального пластика, пропитанного лекарственным веществом, прикрепляют к участку тела, где это вещество должно проявить свое действие;

2) две израильские фирмы разработали безинъекционный метод лечения сахарного диабета первого типа: больному на запястье прикрепляется губчатый пластырь, из которого инсулин непрерывно поступает через кожу в кровяное русло;

3) для предотвращения зарастания днища кораблей морскими ракушками его покрывают резиновыми полосками, пропитанными органическими соединениями олова.

10.3 Избирательность, обусловленная биохимическими различиями

Многие биохимические процессы у всех живых существ: одинаково протекают во всех клетках катаболические процессы, а также процессы гликолиза; аденозинтрифосфат служит универсальной «валютой» в энергетическом, обмене. Однако даже в разных тканях одного организма биохимические процессы протекают неодинаково.

Биохимические различия качественного характера

Избирательность действия ксенобиотика

– определяется различиями в процессах его биотрансформации;
– зависит от его влияния на тот или иной биохимический процесс, который имеет место у чувствительного организма, но отсутствует у организма устойчивого (или не столь чувствительного к данному веществу).

В связи с успехами биохимии в настоящее время установлен целый ряд соединений, действие которых определяется протеканием метаболических процессов в клетке и организме в целом.

Так, известны вещества:

- 1) ингибирующие начальные стадии синтеза ДНК;
- 2) взаимодействующие с ДНК (ингибиторы, останавливающие как ее репликацию, так и транскрипцию);
- 3) разрушающие ДНК;
- 4) ингибиторы синтеза РНК, белков, ферментов,
- 5) ингибиторы различных путей катаболизма (метаболизм азота и фосфора), метаболизма углеводов, липидов, цикла трикарбоновых кислот, транспорта электронов и т. д.

Примеры избирательности, основанные на биохимическом действии ксенобиотиков.

Пример 1. Сульфаниламиды обладают антибактериальным действием, что обусловлено нарушением ими синтеза ДНК через ингибирование синтеза дегидрофолиевой кислоты – предшественника кофермента, необходимого для биосинтеза тимина и всех пуриновых оснований. Причина избирательного действия: у млекопитающих отсутствует фермент, синтезирующий дегидрофолиевую кислоту, поэтому они толерантны к сульфаниламидам, а у патогенных бактерий отсутствуют мембранные белки, с помощью которых дегидрофолиевая кислота попадает в клетки млекопитающих из пищи.

Пример 2. Механизм инсектицидного действия ДДТ связан с его способностью блокировать ионные каналы у холоднокровных животных. Избирательность действия ДДТ обусловлена тем, что при температуре тела теплокровных, не образуется донорно-акцепторной связи между бензольными кольцами препарата и противоположно заряженной поверхностью мембраны около устья ионного канала.

У птиц под воздействием ДДТ нарушается кальциевый обмен, вследствие чего яичная скорлупа оказывается более тонкой. Такие яйца при насиживании раздавливаются, и птицы не выводят птенцов.

ДДТ подавляет фотосинтез у водорослей.

Пример биохимической избирательности, связанный с процессом биотрансформации, когда устойчивый организм способен разрушать ксенобиотик до нетоксичных соединений, а чувствительный – не способен:

растения кукурузы обезвреживают гербицид симазин, гидролизуя в его молекуле хлор до гидроксигруппы.

Если ксенобиотик не обладает токсичностью и превращается в токсическое соединение уже в самих организмах, после чего убивает их; то в таких ситуациях любой организм, не способный осуществлять это превращение, будет устойчив к данному веществу. Так, механизм избирательного действия большинства самых эффективных фосфорорганических инсектицидов основан на метаболических превращениях. В процессе биотрансформации, которая происходит у насекомых, эти соединения становятся более токсичными, тогда как в организмах млекопитающих эти инсектициды превращаются в менее токсичные производные.

Особый интерес представляют случаи избирательно протекающих метаболических реакций, отличающих человека от большинства других млекопитающих, но именно в этих различиях кроются опасности неудач при переходе от опытов на лабораторных животных к лечению людей.

Избирательность действия ксенобиотиков, обусловленная количественными различиями в метаболических процессах

Даже в тех случаях, когда у двух видов используются одинаковые метаболические пути, между ними могут существовать количественные различия, например в способности к накоплению или метаболизму. Человек, например, в 15 раз более чувствителен к действию атропина, чем кролик. Однако для него безвредна доза стрихнина, убивающая столько кроликов, что их общий вес превосходит вес человека. Синильная кислота в безопасной для человека концентрации мгновенно убивает собаку.

Различия можно обнаружить и у одной особи. Например, глутаминсинтетаза почек крысы в 10 раз быстрее перерабатывает свой субстрат, чем фермент-аналог из ее мышцы. В опухолевых (раковых) клетках клеточный цикл протекает быстрее, чем в здоровых, поэтому они более чувствительны к действию лекарственных препаратов, вмешивающихся в синтез нуклеотидов.

10.4 Цитологические различия как основа избирательного действия

Известно, что строение клеток у животных и растений различно. У растений нет нервной системы и мышечных клеток. Поэтому фосфорорганические соединения, блокируя проведение нервного импульса, поражают насекомых, но не приносят заметного вреда растениям. На этом основана весьма система химической защиты растений от насекомых.

У растений, в отличие от животных, имеются клеточная стенка, хлоропласты и механизмы, осуществляющие фотосинтез. Разработаны многочисленные гербициды, избирательно нарушающие процесс фотосинтеза на стадии реакции Хилла и, следовательно, совершенно безвредные для млекопитающих. К широко распространенным гербицидам, действие

которых основано на ингибировании реакции Хилла, относятся фенил мочевины, триазины, урацилы и др.

У растения, грибы, бактерии клеточная стенка значительно отличается по химическому составу. Клеточные стенки многоклеточных растений состоят из микрофибрилл целлюлозы различной длины, включенных в амфотерный матрикс из целлюлозы и пектинов.

Клеточная стенка грибов представляет собой мозаику из различных углеводов с отдельными включениями липидов и белков.

У дрожжей клеточные стенки состоят из глюкана (полиангидрид глюкозы) и маннанпротеинового комплекса, компоненты которого соединены между собой дисульфидными связями.

Стенка грамположительных бактерий примерно наполовину состоит из муреина; остальная ее часть представлена тейхоевой кислотой. Стенка грамотрицательных бактерий устроена сложнее – муреин с наружной стороны покрыт мембраной, состоящей из липопротеидов и монополисахаридов; в стенках отсутствует тейхоевая кислота.

Действие некоторых антибиотиков обусловлено нарушением различных стадий биосинтеза клеточной стенки бактерий. Так, механизм противомикробного действия бензилпенициллина заключается в образовании ковалентной связи с ферментом, в норме образующим поперечные сшивки в муреине на последней стадии биосинтеза. В результате этого растущая бактерия теряет способность строить новую стенку и погибает.

Различие функций организма существует и внутри клеток благодаря наличию компартментов, отделенных друг от друга избирательно проницаемыми мембранами, в которых одновременно протекают различные взаимоконкурирующие реакции. Метаболические реакции, протекающие в определенном порядке при участии ферментов в отдельных компартментах на поверхности раздела фаз и на мембранах органелл, могут подавляться различными ксенобиотиками.

10.5 Влияние самого ксенобиотика на избирательную токсичность

Свойства самого ксенобиотика, в частности степень ионизации, оказывают большое влияние на избирательность его действия. Ионы не образуют с местами связывания ковалентных связей, а следовательно, могут легко отрываться. Поэтому для поддержания активного центра в насыщенном состоянии необходимо, чтобы в растворе, окружающем место связывания (рецептор), постоянно присутствовал избыток данных ионов.

Свойства, отличающие ионы от неионизированных молекул, которые определяют избирательность действия: а) ковалентную реакционную способность (образование и разрыв ковалентных связей); б) адсорбцию на поверхности и в) проникновение (транспорт) через мембраны.

Разрыв ковалентных связей ферментами сильно влияет на избирательность действия агентов, так как при этом они могут превращаться в более активные или, наоборот, инертные вещества.

При неспецифической адсорбции нейтральные молекулы адсорбируются сильнее, чем ионы. Это происходит потому, что ион гидролизуется сильнее, чем соответствующие неионизированные молекулы, которые в этом случае легче вытесняются из воды.

Специфическая адсорбция свойственна гидрофильным веществам. Так, в результате притяжения к противоположно заряженным участкам поверхности ион будет адсорбироваться сильнее, чем неионизированная молекула.

Проникновение ксенобиотиков в клетку зависит от типа мембраны. Причины затруднения прохождения иона через липопротеидную мембрану:

1) ионы имеют относительно большую величину вследствие гидратации;

2) заряд ионов совпадает по знаку с той частью белковой поверхности, к которой он приближается, что приводит к отталкиванию;

3) заряд иона противоположен по знаку с белковой поверхностью, что приводит к фиксации.

Незаряженные молекулы с малой молекулярной массой обычно легко проникают через мембраны. Ионы могут также хорошо проникать в клетки при наличии в мембранах ионных каналов, систем активного транспорта (АТФаз) и др.

Лекция 11

Поведение ксенобиотиков в экосистемах, их экологическая опасность

11.1 Судьба ксенобиотиков в биогеоценозах

11.2 Взаимодействие биотических и абиотических факторов при превращениях ксенобиотиков в биосфере

11.3 Устойчивые, неразлагающиеся поллютанты и экологическая опасность биоразрушаемых поллютантов и остатков неразложившихся поллютантов

11.1 Судьба ксенобиотиков в биогеоценозах

Важное значение имеют скорости превращений ксенобиотиков в экосистеме. Высокая скорость превращения обычно приводит к исчезновению вещества и, следовательно, к исчезновению проблемы, связанной с загрязнением окружающей среды; при медленном разрушении вещество сохраняется длительное время, что может приводить к его концентрированию.

Ксенобиотики, попадающие в экосистемы, могут претерпевать следующие основные этапы дальнейшей трансформации:

- 1) реакции превращения: распад ксенобиотиков, окислительно-восстановительные и гидролитические реакции, реакции конъюгации;
- 2) адсорбция на частицах биологического и абиотического происхождения;
- 3) переход из одной среды в другую.

Судьба ксенобиотика в экосистеме зависит от целого ряда факторов и их взаимодействия. Например, распад (деградация) ксенобиотиков может осуществляться под действием ферментов, а также чисто физико-химическим путем – вследствие фотоллиза (действия света) или гидролиза (взаимодействия с водой).

11.2 Взаимодействие биотических и абиотических факторов при превращениях ксенобиотиков в биосфере

Фотохимические превращения. Солнечная радиация хорошо поглощается некоторыми молекулами и во многих случаях способна индуцировать изменения в молекуле. Ионизирующее излучение, также присутствующее в окружающей среде, но оно менее концентрированное и не может вызвать заметный эффект. Энергия инфракрасного излучения достаточна лишь для продуцирования минимальных молекулярных изменений, но не для полного превращения молекул. Ультрафиолетовое излучение

также поглощается молекулами некоторых ксенобиотиков. Фотохимические превращения проходят в три стадии:

- 1) поглощение излучения определенной длины волны и переход молекулы ксенобиотика в возбужденное состояние;
- 2) преобразование электронно-возбужденного состояния и переход молекулы в невозбужденное состояние (*первичный фотохимический процесс*);
- 3) образования различных веществ в результате первичного фотохимического процесса (*вторичные, или «темновые» реакции*).

При этом активные частицы, образующиеся в первичных фотохимических процессах, прежде всего свободные радикалы, могут реагировать с другими молекулами в своем непосредственном окружении, например с молекулами кислорода или воды. Возбужденные молекулы могут передавать поглощенную энергию молекулам другого ксенобиотика, который затем разрушается.

Степень деструкции ксенобиотика в фотохимических процессах зависит от:

- 1) его способности перемещаться в атмосфере или оставаться на поверхности. Ксенобиотики, легко проникающие в глубь почвы, не доступны для фотохимического разрушения;
- 2) от свойств самого ксенобиотика. Вещество должно поглощать электромагнитное излучение в доступном интервале длин волн и, кроме того, обладать потенциальной способностью к химическому изменению, т. е. иметь связи, реагирующие на воздействие излучения, которые при соответствующих уровнях энергии могут перестраиваться или разрываться.

Окислительно-восстановительные превращения. Окислительно-восстановительные процессы имеют важное значение, так как:

- окисленные и восстановленные формы данного ксенобиотика могут существенно различаться по биологическими экологическим свойствам;
- значительная вариация окислительных или восстановительных условий в окружающей среде влияет на трансформацию ксенобиотиков.

Окислительно-восстановительная способность окружающей среды характеризуется величиной $p\varepsilon$, позволяющей установить, в какой форме в данной среде может существовать ксенобиотик:

$$p\varepsilon = -\lg [e^-]$$

где $p\varepsilon$ – показатель активности электрона, указывающий на способность среды отдавать или принимать электроны.

Можно провести аналогию между pH как показателем активности протона и $p\varepsilon$ как показателем активности электрона:

- высокое значение $p\varepsilon$ соответствует низкой активности электронов: соединение находится в «обедненной» электронами или окисленной форме;

– низкое значение $p\varepsilon$ соответствует высокой активности электронов: соединение «обогащено» электронами или восстановлено.

Величина $p\varepsilon$ выступает одним из регулирующих факторов, определяющих поведение ксенобиотиков в окружающей среде.

Пример 1. Ртуть может существовать в виде двухзарядного катиона, способного выпадать в осадок при взаимодействии с рядом анионов или превращаться организмами в производные метилртути. Ртуть, восстановленная до элементарной формы, обладает совершенно другими реакционными свойствами и становится довольно летучей.

Пример 2. Азот (в зависимости от окислительно-восстановительной способности, присущей природным водам) может существовать в различной степени окисления. Уровень содержания нитратов в некоторых поверхностных водах, поступающих из сельскохозяйственных угодий или животноводческих ферм, может создать серьезную экологическую проблему. Нитраты содержат азот в самой высокой степени окисления и образуются при высоких значениях $p\varepsilon$. Будучи сами по себе токсичными, в промежуточной области значений $p\varepsilon$ нитраты в ряде случаев способны восстанавливаться до нитритов. Присутствие последних опасно для здоровья людей вследствие их специфического сродства к гемоглобину. Еще более опасна способность нитритов образовывать нитрозамины, которые являются канцерогенами. Нитриты далее могут восстанавливаться до аммиака, который при низких значениях $p\varepsilon$ существует в виде ионов аммония.

Окисление ксенобиотиков может происходить в водной среде за счет растворенного в воде кислорода, образующегося из пероксида водорода, который выделяется в воду некоторыми гидробионтами, и с участием свободных радикалов.

Токсичность продуктов окисления ряда ксенобиотиков (пестицидов, например, гептахлора, альдрина, фосфоамида) выше, чем токсичность исходных веществ.

Гидролиз. Реакции гидролиза обусловлены способностью вещества вступать в реакции с водой. Гидролиз зависит от распределения зарядов в веществе и от pH среды.

Водородные ионы и другие группы с дефицитом электронов называются электрофильными. Электрофильные группы особенно сильно притягиваются к атому с небольшим отрицательным зарядом, к неподеленной электронной паре или электронам двойной связи. Вещества с избытком несвязывающихся электронов являются нуклеофилами. Например, эфиры могут гидролизироваться путем катализа кислотой или основанием либо в результате непосредственного взаимодействия молекулы воды с эфиром в нейтральной среде.

Гидролизу подвержены многие соединения, например эфиры и амиды карбоновых кислот, карбонаты, фосфорорганические соединения и др.

При гидролизе амидов образуются карбоновая кислота и амин. Многие галогензамещенные соединения также чувствительны к гидролизу.

Адсорбция ксенобиотиков на частицах. Доступность ксенобиотика для ферментов и, следовательно, возможность его деградации снижаются в результате сорбции его молекул на частицах биологического или абиотического происхождения. Процессы сорбции-десорбции ксенобиотиков взаимосвязаны с переносом этих соединений в биосфере на большие расстояния.

Например, многие образующиеся в почве продукты гидролиза пестицидов адсорбируются на частицах почвы и связываются с гумусом. В адсорбированном состоянии они не разлагаются фотохимически и не гидролизуются водой, т.е. устойчивость их повышается. По мере разрушения гумуса грибами (что является ферментативным процессом) ранее связанные продукты гидролиза пестицида высвобождаются и могут проявлять свое токсическое действие на организмы данной экосистемы.

Конъюгация ксенобиотика с различными органическими молекулами.

Ксенобиотик в форме конъюгата, образовавшегося внутри живого организма, попадает в почву или в воду и продолжает циркулировать в биогеоценозе. Продукты конденсации некоторых пестицидов (или их метаболитов) с веществами растений разлагаются медленнее, чем исходные вещества (фосфорорганический пестицид винфос).

Одним из типов конъюгации ксенобиотиков считается алкилирование. При алкилировании может существенно изменяться водо- и жирорастворимость (липофильность) данного соединения, а последнее свойство вещества определяет его переходы из гидрофильной среды в гидрофобную и обратно.

Эти переходы определяют прохождение ксенобиотика через гидрофобный слой мембран, окружающий живые клетки, и последующие его воздействия. Кроме того, именно гидрофобность ряда ксенобиотиков (в том числе многих хлорорганических соединений) обуславливает их повышенную способность к биоаккумуляции.

Важность перехода ксенобиотиков из гидрофильной среды в гидрофобную (и обратно) заключается и в том, что при этом изменяется доступность молекулы для ферментов. Подавляющее большинство ферментов действует в водной среде. Переход молекулы ксенобиотика из водной среды в гидрофобную означает уменьшение его доступности для ферментов, а это в свою очередь снижает вероятность его биотрансформации и детоксикации.

Переходы веществ из одной среды в другую. Таковы переходы ксенобиотиков из воды в воздух и обратно, из организмов в воду и обратно, из почвы в воду и т. д. Например, летучесть ряда пестицидов (особенно хлорорганических) – переход в результате испарения из почвы или воды в воздух – обуславливает их дальнейший перенос на большие расстояния.

Ксенобиотики переносятся воздушными массами и в значительных количествах выпадают в виде пыли и с атмосферными осадками. Так, ксенобиотик может переноситься из южного полушария в северное и загрязнять среду даже в тех регионах, где его применение полностью запрещено.

Подсчитано, например, что в некоторых регионах на землю ежемесячно выпадает 45–270 г ДДТ на 1 км². При этом известно, что из Африки в Америку перемещается 100–400 млн. т пыли в год, причем пыль достигает Южной Америки всего лишь за 4–5 суток. Итак, высокая способность ксенобиотиков и их метаболитов переходить из одного блока экосистемы (почвы или воды) в другие (воздух, биота) порождает серьезные экологические проблемы.

По некоторым данным, ДДТ исчезает из почвы за период до 30 лет, альдрин и хлордан – 15 лет, диэльдрин – 25 лет, гептахлор – 14 лет и т. д.

Не менее серьезные проблемы возникают и вследствие затрудненности перехода подобного типа. Например, переход ртути из почвы в воду происходит очень медленно (период полувыведения из почвы в поверхностные воды составляет 850 лет). Попавшая в водоемы ртуть метилируется и накапливается в гидробионтах. В результате возникает огромное запаздывание в миграции ртути в биосфере, что затрудняет борьбу с ртутным загрязнением. Даже если бы сегодня удалось полностью прекратить антропогенное загрязнение биосферы (в частности, почвы) ртутью, то все равно еще сотни лет будет продолжаться ее вымывание из почвы в водоемы.

11.3 Устойчивые, неразлагающиеся поллютанты и экологическая опасность биоразрушаемых поллютантов и остатков неразложившихся поллютантов

В связи с неспособностью экосистем к полной биодegradации ксенобиотиков создается экологическая опасность, обусловленная наличием в биосфере как устойчивых (персистентных) или вообще не разлагающихся в окружающей среде ксенобиотиков, так и подвергающихся биодegradации. В этой связи возникает несколько возможных ситуаций:

- нарушение функционирования экосистем, обусловленное наличием устойчивых, неразлагающихся или разлагающихся крайне медленно ксенобиотиков. В конечном итоге ксенобиотики, постоянно накапливаясь, будут оказывать негативное воздействие на экосистемы;

- нарушение нормального функционирования экосистем, связанное с наличием биоразрушаемых ксенобиотиков. Причины такого нарушения: природа превращений и аккумуляции ксенобиотиков; опасностью воздействия больших доз; воздействием малых (сублетальных) концентраций.

Природа превращений и аккумуляция ксенобиотиков. Способность ксенобиотиков распространяться в окружающей среде создает проблемы,

связанные с длительностью их сохранения в природных условиях. Легко разрушаемые соединения большей частью не считаются потенциально опасными для окружающей среды. Тем не менее необходимо проводить сравнительный анализ и знать способность различных организмов разрушать то или иное вещество. Конкретный ксенобиотик может легко разрушаться в одной среде, но может быть устойчивым в других условиях.

Наряду с определением скорости разрушения вещества очень важно также изучить, какие типы веществ образуются в процессе такого разрушения. Если органическое вещество разрушается полностью с образованием углерода и воды, как это происходит во многих микробных системах, такого вопроса не возникает.

ДДТ оказывает очень большое влияние на природную среду; он очень устойчив к метаболическому разрушению, слабо растворяется в воде, липофилен. Однако согласно установленной последовательности реакций ДДТ все же распадается на ряд производных. Так, например, при удалении из молекулы ДДТ атома хлора образуется ДДД, а при отщеплении HCl – ненасыщенное соединение ДДЭ. Оказывается, ДДЭ – еще более опасное для окружающей среды вещество, чем ДДТ, поскольку оно еще медленнее метаболизируется и разрушается.

Превращение ДДТ в ДДЭ – основная причина возникновения экологической проблемы. Если ДДТ превращается в ДДД, то последний быстро разрушается; однако чаще ДДТ превращается в ДДЕ – соединение исключительно устойчивое, и именно этот метаболит обычно обнаруживается в окружающей среде.

В некоторых микробиологических системах при разрушении ДДТ образуются диоксид углерода и вода, однако последовательность протекающих при этом реакций не установлена.

При оценке экологической опасности необходимо учитывать природу и процессы метаболических превращений. Важно помнить: почти любой органический ксенобиотик может метаболизироваться в каком-либо организме, и часто в результате довольно сложных последовательностей реакций образуются многочисленные метаболиты. Степень накопления метаболитов в организме зависит от относительных скоростей их образования и последующего метаболизирования и (или) вывода из организма. Метаболит накапливается в организме, если он вырабатывается с относительно высокой скоростью, тогда как последующие метаболические реакции идут с меньшей скоростью или скорость выведения метаболита из организма мала по сравнению со скоростью его образования.

Природу метаболических превращений следует учитывать при разработке аналитических методов. Например, при определении остатков 2,4-Д (дихлорфеноксисукусной кислоты) в обработанных этим гербицидом растениях нужно учитывать следующее. Вещество можно экстрагировать в виде соли в водном растворе, затем необходимо снизить рН, чтобы

перевести кислоту в неионизированную форму. В такой форме оно экстрагируется неполярным растворителем, затем очищается и анализируется. В растениях обычно протекают реакции конъюгирования, и 2,4-Д может быть связан с остатками некоторых углеводов. Образованное соединение обладает значительной полярностью, поэтому после экстрагирования и подкисления извлечь его неполярным растворителем оказывается невозможным.

Экологическая опасность больших доз биоразрушаемых ксенобиотиков и остатков неразложившихся ксенобиотиков связана с возможностью нарушения практически всех элементов структуры и функционирования экосистем, включая видовое богатство и разнообразие видов, структуру популяций, стабильность и продуктивность экосистем. Большие дозы ксенобиотиков могут нести огромную экологическую опасность, во-первых, поскольку они отравляют организмы раньше, чем те успевают их метаболизировать, и, во-вторых, в связи с накоплением этих веществ организмами. В результате биоконцентрации может усиливаться токсическое воздействие ксенобиотиков и ухудшаться качество кормовой базы для организмов вышестоящих трофических уровней.

Опасность сублетальных (талых) концентраций (доз) обусловлена следующими факторами:

1) может происходить хроническое отравление организмов, ведущее к падению репродуктивной способности. Например, отравление ПХБ и пестицидами способствовало развитию бесплодия в популяции тюленя в Балтийском море. В конечном итоге это может приводить к вымиранию популяции из-за снижения рождаемости;

2) может нарушаться тонкая регуляция межвидовых и внутривидовых взаимодействий, которая опосредована различными хемомедиаторами и хеморегуляторами;

3) сублетальные концентрации, оказывая неодинаковое влияние на конкурентные виды одного трофического уровня, могут нарушать естественный экологический баланс в экосистемах;

4) малые дозы ряда пестицидов могут даже стимулировать воспроизводство популяций некоторых крайне нежелательных видов, наносящих экономический ущерб в агроэкосистемах. Так, в одной из серии опытов сублетальные дозы ДДТ, диэльдрина и паратиона увеличивали отложение яиц колорадским жуком на 50,33 и 65 % соответственно.

Итак, изучение путей биотрансформации ксенобиотиков в экосистемах и входящих в их состав организмах показывает, что экологическая опасность ксенобиотиков-поллютантов определяется не только их непосредственной токсичностью, но и токсичностью и персистентностью продуктов их биотрансформации, а также способностью ксенобиотиков и продуктов их биотрансформации влиять на биохимические и физико-химические процессы в экосистемах.

Принципиальное значение имеет соотношение между скоростью поступления ксенобиотиков в конкретные экосистемы и скоростью их деградации.

Пути снижения нежелательных последствий загрязнения биосферы

- разработка, производство и применение биоразрушающихся соединений, т. е. материалов и веществ, относительно быстро разлагаемых в экосистемах без образования токсичных или персистентных продуктов распада;

- использование природных веществ для регуляции различных физиологических процессов и создания интегрированной системы защиты растений.

Схема действия ксенобиотиков в экосистемах представлена на рисунке 17.

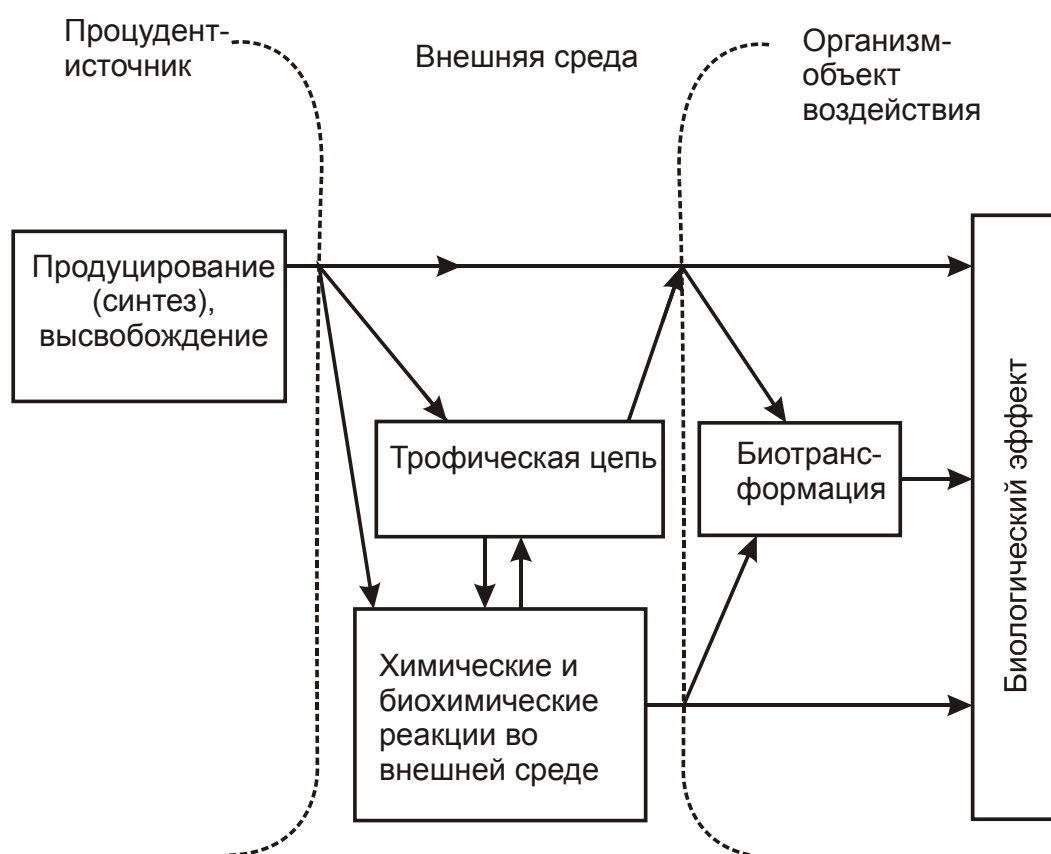


Рисунок 17 – Общая схема действия экологических ксенобиотиков

На основании изложенного выше материала можно сделать следующее заключение:

- ксенобиотики включают многие классы веществ, они способны мигрировать по всей биосфере и переходить из одной среды в другую;
- биологическое влияние многих ксенобиотиков, действующих совместно, усиливается;
- продукты метаболизма многих ксенобиотиков оказываются более

токсичными и канцерогенными, чем исходные соединения;

- действию ксенобиотиков подвергаются такие структурно-функциональные системы клетки, как генетический аппарат, биомембраны, белки;

- трансформация ксенобиотиков в объектах окружающей среды может приводить к появлению более персистентных соединений и остатков неразложившихся токсикантов;

- многие ксенобиотики (например, гидрофобные пестициды некоторые металлы и их соединения) способны аккумулироваться в живых организмах в более высоких концентрациях, чем в окружающей среде;

- экологическую опасность представляют даже низкие, сублетальные концентрации ксенобиотиков, которые (особенно при длительном воздействии) могут в течение ряда поколений снижать воспроизводство в популяциях и тем самым приводить к их вымиранию.

Лекция 12

Система скрининга ксенобиотиков

12.1 Общие представления о мониторинге и скрининге

12.2 Выбор тест-объектов и тест-реакций для индикации химического загрязнения окружающей среды

12.3 Принципы создания автоматизированной системы скрининга ксенобиотиков

12.4 Разработка основ промышленного, сельскохозяйственного и экологического мониторинга на основе техники испытания биологической активности ксенобиотиков

12.1 Общие представления о мониторинге и скрининге

В практику должны вводиться только те соединения, которые подверглись биологическим испытаниям. Необходимо создание производительной системы испытаний ксенобиотиков на разные виды биологической активности. Назначение системы испытаний – формирование информационного массива фундаментальных научных знаний о биологической активности и паспортизация каждого из ксенобиотиков по видам активности.

Практика показывает, что применяемое вещество часто обнаруживает новые, весьма неожиданные свойства, как полезные, так и вредные. Поэтому при поиске веществ с конкретными видами биологической активности необходимо максимально полно определить весь спектр биологической активности этих веществ.

Проверка большого массива ксенобиотиков на один или несколько видов биологической активности получила название *скрининга*.

Идея скрининга возникла давно – в период становления химической индустрии она уже прочно завоевала себе место в умах фармакологов. Тотальная проверка большого массива химических соединений или природных объектов, направленная на выявление потенциальных лекарств, получила в XX в. свое развитие как один из основных методов поиска новых лекарств (и химических соединений вообще) с заданным типом биологической активности. В 1910 г. одна из немецких фирм испытала около 1200 производных акридина. На «сите» оказались три препарата: трифловин (противопаразитический), риванол (антисептик) и акрихин (противомалярийный). В поисках заменителя хинина в 30-е годы XX в. было исследовано 16 000 соединений, принадлежащих к различным группам. Среди них 7618-м по счету оказался хлорохин, а 13 272-м – притахин.

В 1966 г. в США в поисках противоопухолевых препаратов испытывалось около 114 000 соединений, из которых было отобрано 12 потенциальных лекарств, но ни одно из них не стало достаточно выдающимся в своем классе фармакологических препаратов.

С 1928 г. в СССР на протяжении 10 лет в поисках алкалоидов под руководством А. П. Орехова исследовано 700 растений, среди которых искомыми оказались всего 60. В следующие 10 лет в результате исследования 4500 растений к этому списку добавилось еще 20 алкалоидов.

Системное определение биологической активности всего массива соединений может быть осуществлено путем создания высокопроизводительной системы их классификации по видам биологической активности. Каждый ксенобиотик обладает определенными видами и степенью биологической активности. Необходимо выявить эти свойства и предсказать возможность практического использования данного соединения или его возможную роль в окружающей среде.

12.2 Выбор тест-объектов и тест-реакций для индикации химического загрязнения окружающей среды

Система тестирования ксенобиотиков по видам биологической активности может включать *два взаимосвязанных подхода*. Первый подход – исследование целевого объекта испытаний (человек, животное, растение, биогеоценоз), на который должно быть направлено действие искомого ксенобиотика исходя из целей поиска (лекарство, ветеринарное средство, гербицид и т.д.); второй – изучение совокупности тест-объектов более примитивной организации, чем целевой. Использование второго подхода оправданно в тех случаях, когда первый не обеспечивает достаточной производительности и т. п.

Традиционный путь поиска: с применением фармакологических тестов организменного уровня определяют биологическую активность ряда чужеродных соединений, затем улучшают их свойства путем химической модификации в соответствующих рядах соединений. После этого проводят новые испытания модифицированных веществ, снова их улучшают и т. д. Это делается до тех пор, пока указанная процедура не приведет к созданию наиболее эффективного в данном ряду соединения. Такой подход охватывает лишь один или несколько видов биологической активности и сравнительно малую выборку ксенобиотиков.

Обстоятельства, затрудняющие индустриализацию процесса биологического испытания соединений на организменном уровне (в частности на животных):

- необходимость большого числа животных в качестве тест-объектов;
- затраты большого количества исследуемого химического соединения (на первых порах синтезируются лишь десятки – сотни миллиграммов вещества);
- ограниченность автоматизации процесса;
- большие временные затраты в связи с тем, что единичный акт испытания химического соединения на животных мало управляем во времени.

Работая со сравнительно небольшими массивами чужеродных соединений и определяя сравнительно немного видов активности можно использовать животных как основной тест-объект. Однако промышленные масштабы испытаний и их промышленная организация требуют увеличения на порядки производительности системы и обеспечения возможности работы с малым количеством испытуемого вещества.

Поэтому возникла необходимость обратиться к исследованиям на тканевом, клеточном, молекулярном уровнях. Здесь вступает в право использование принципа качественного подобия – эпиморфизма тест-объекта и целевого объекта в отношении определенного биологического свойства ксенобиотика.

Принцип *эпиморфизма* – это принцип конструктора: из небольшого числа деталей построить как можно больше фигур. Возможности принципа эпиморфизма велики, поскольку основные молекулярные структуры и субклеточные образования в большей степени единообразны у самых разнообразных живых объектов.

Главные методологические трудности при использовании эпиморфных моделей связаны с определением оптимального уровня детализации модели по отношению к целостному организму. Этого можно достичь исходя из того, что в системе тест-объектов на клеточном уровне организации представляются все царства живого и основные типы тканей организма человека, а также из того, что у тест-объектов в совокупности определяются все основные реакции (гибель, повреждение, адаптация, проницаемость, метаболизм ксенобиотиков, синтез белка и ДНК, возбудимость и т. д.).

Когда говорят о биологической активности ксенобиотиков, то для ее определения необходимы *тест-объекты*, у которых регистрируются определенные виды биологических реакций (гибель, изменение роста, изменение различных метаболических реакций и т. д.) при их действии, называемые *тест-реакциями*. В этой связи разработаны принципы отбора и стандартизации тест-объектов при классификации ксенобиотиков по видам биологической активности.

Совокупность набора тест-объектов клеточно-тканевого уровня должна удовлетворять главному принципу системы – представительности выбранных биологических тест-объектов (БТО) по отношению к моделям биосферы и организму человека с соответствующим набором характеристик (тест-реакций).

Предлагается подбирать тест-объекты по следующим критериям: сходство молекулярных рецепторов, являющихся мишенями для веществ с данными видами активности; принцип надмолекулярной организации и молекулярный состав (близость по структуре); функциональное сходство; органное или тканевое происхождение; идентичность патологического состояния тест-объекта таковому реальному объекту.

Первый критерий является самым надежным. Например, на этом критерии основан выбор ганглиев прудовика как модели нейронов головного мозга в отношении медиаторных и антимедиаторных видов биологической активности. Высокая гомология или даже тождество рецепторов для медиаторов у моллюсков и позвоночных служит основанием для надежности прогноза этих активностей на целевой тест-объект.

Второй (близость по структуре) и третий (близость по функции) критерии используются при выборе моделей для оценки влияния на подвижность (сперматозоиды, тетрахимена), на дыхание и гликолиз (печень, эритроциты, клетки опухолей), на фотосинтез (водоросль *Nitella*), на химический гомеостаз (печень — монооксигеназная система).

При использовании всех трех критериев остается неопределенность прогноза, обусловленная необходимостью переносить результаты ответов *in vitro* на систему *in vivo*, а именно тем, что *in vitro* не учитывается доступность объекта-мишени, метаболизма ксенобиотика и строения реального объекта. Гибель клетки не означает гибели организма.

Большая степень неопределенности существует в отношении тех видов активности, которым присущи системные эффекты на уровне ткани, органа или организма. В этом случае подбор биологических тест-объектов по критерию органного происхождения дает значительную гарантию прогноза.

Классификация ксенобиотиков по видам биологической активности по-новому ставит вопрос о подборе и стандартизации тест-объектов. Степень воспроизводимости, стандартность набора тест-объектов непосредственно определяют надежность принимаемых решений и степень автоматизации системы. С молекулярными тест-объектами это сделать проще.

Каждый тест-объект индивидуален, что приводит к целому ряду затруднений при регистрации его характеристик, интерпретации данных, выявлении их соответствия поставленным целям и т. д. Существует ряд методических подходов для стандартизации, подбора, приготовления тест-объектов, например:

- стандартизация условий содержания животных;
- использование контрольных карт (отбраковка животных, для которых отклонения, согласно карте, превышают определенную величину);
- выбор наиболее щадящих условий выделения и инкубации;
- использование дополнительных воздействий, переводящих тест-объект в заданное состояние;
- нормирование регистрируемых параметров (приведение к норме);
- выбор тест-реакций, минимально зависящих от индивидуальности тест-объектов и т. д.

12.3 Принципы создания автоматизированной системы скрининга ксенобиотиков

С целью индустриализации процесса тестирования биологической активности ксенобиотиков необходимо иметь автоматизированную систему испытаний. Схема испытаний общего потока соединений на любые виды биологической активности должна включать и систему их предварительной фильтрации. Какие подходы могут быть положены в систему предварительной фильтрации общего потока ксенобиотиков?

Попадая в организм, химическое вещество проникает в определенные ткани; в тканях оно взаимодействует с определенными клетками; в клетках – с определенными субклеточными структурами, а в пределах этих структур – с биополимерами или низкомолекулярными соединениями клетки. В обратном порядке развивается реакция целостного организма – от молекулы-мишени до организма.

Результаты воздействия ксенобиотиков зависят в первую очередь от химической структуры самого вещества, его физико-химических свойств, которые определяют тропность вещества к определенным тканям, клеткам и характер взаимодействия с молекулярными мишенями, а также зависят от структуры мишени и его функциональной роли.

Всю совокупность операций по классификации ксенобиотиков можно представить следующим образом:

- классификация по видам биологической активности на основании химических, физических и физико-химических свойств при отсутствии биологического тест-объекта путем расчета структуры соединений и экспериментального определения их физико-химических свойств;

- классификация по результатам взаимодействия соединений с моделями клетки, организма, биосферы, включающая последовательные иерархические уровни организации биологической материи.

Моделируемые объекты (клетки, организм, биосфера) предстают в системе в виде представительных наборов тест-объектов, обладающих основными элементарными функциями, присущими целевым объектам.

В принципе, модели клетки и организма могут быть нормальными и патологическими.

Для организма детализацию видов биологической активности следует строить по тканевой тропности действия, опираясь на чисто генетическую классификацию типов тканей, отражающую ход онтогенеза. Представление биосферы в системе классификации должно основываться на таксономической классификации организмов, отражающей процесс эволюции.

Общий принцип организации биологических испытаний чужеродных соединений – это многоуровневый набор тестов с повышающейся на каждом уровне сложностью биологического тест-объекта (модели) и

соответственно растущей детализацией и надежностью прогноза вида биологической активности.

Первый уровень – базовый, через него проходят все соединения, которые в соответствии с результатами направляются затем к специализированным тестам.

Базовый уровень состоит из трех подуровней. На первом подуровне сведения о структуре и некоторых свойствах соединений вводятся в компьютер, который производит первичный анализ принадлежности соединения данной структуры к определенным уже известным классам биологической активности.

На втором подуровне эта классификация производится на основании экспериментального определения дополнительных физико-химических характеристик веществ.

На третьем подуровне в систему вводятся тест-объекты. Основным тест-объектом этого подуровня является изолированная клетка. На этом подуровне регистрируется способность чужеродных химических соединений влиять на основные свойства живой клетки (рост, дыхание, энергетика, биосинтез, способность к генетическим изменениям и т. д.). База пропускает весь массив испытуемых ксенобиотиков, выдавая для каждого из них единообразный набор характеристик – основной биологический «паспорт».

«Паспорт» должен содержать сведения о структуре вещества, источнике его происхождения, результаты его теоретического и экспериментального изучения, включая первичную оценку безопасности.

Второй уровень, меньший по пропускной способности, – надстройка. Надстройка преимущественно ориентирована на первые две цели: нахождение чужеродного соединения, обладающего полезными для человеческого организма свойствами, и обнаружение вредных для человеческого организма биологических активностей испытуемых ксенобиотиков.

Надстройка прежде всего служит целям, связанным с организмом человека. Поэтому клетки и организм человека в целом берутся за основу при проектировании надстройки.

Испытанию ксенобиотиков на наличие различных видов биологической активности должна предшествовать операция предварительной их сортировки на моделях, допускающих создание испытательных систем высокой производительности. На предварительном этапе на упрощенных (модельных) системах необходимо предсказать вид биологической активности и определить ксенобиотики, которые, по вероятным оценкам, не обладают определенными видами активности (резус) или являются токсичными (исключаются из системы испытаний). В этом случае при определении наиболее важных видов биологической активности и перенесении закономерностей ее проявления на целостный организм подбирается

совокупность адекватных моделей на основе принципа биологического эпиморфизма.

Процедура организации биологических испытаний ксенобиотиков, ориентированная на поиск лекарственных препаратов и оценку их безопасности, в общем виде сводится к схеме, изображенной на рисунке 18.

Вначале исследуются два массива ксенобиотиков: новые и известные. Это связано с тем, что среди известных соединений, не испытывавшихся ранее на биологическую активность, могут быть обнаружены искомые лекарства. Кроме того, для известных тестируемых ксенобиотиков могут быть выявлены новые виды биологической активности.

С учетом фармакологической активности, выявленной на более простых моделях, последующая проверка ксенобиотиков проводится на животных. Ксенобиотики, у которых обнаружена нужная для практических целей активность, проходят испытания по полной программе, включая тестирование на основные и побочные виды активности, оценку острых, хронических и отдаленных форм проявления биологических активностей.

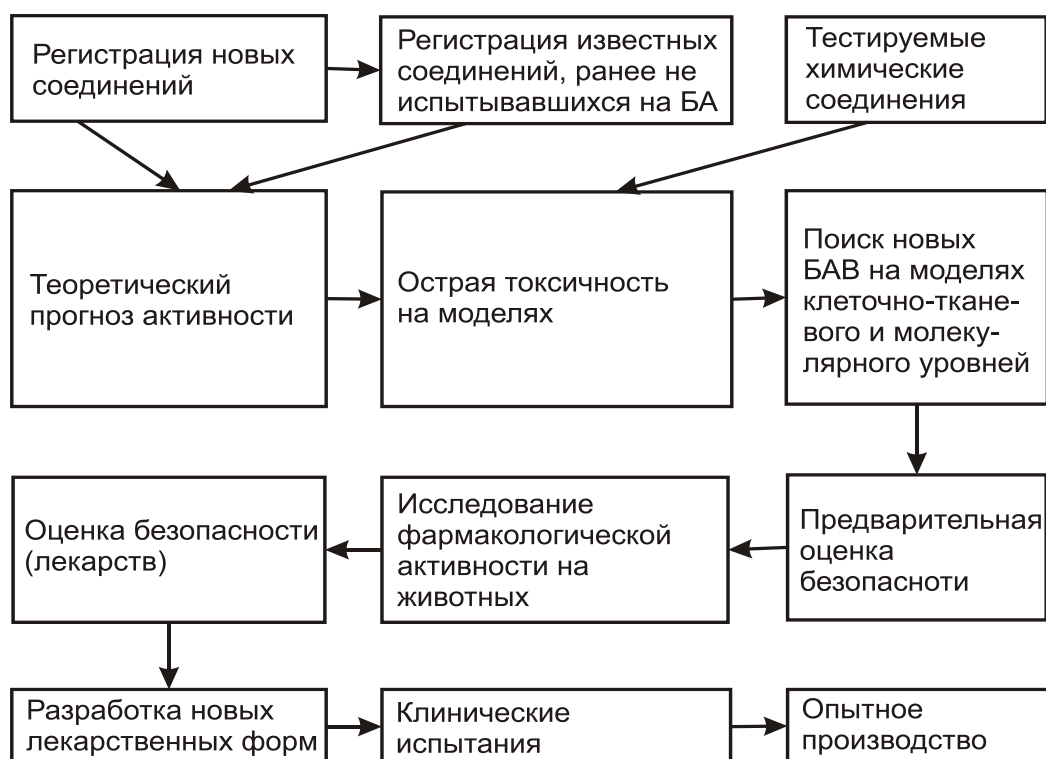


Рисунок 16 – схема организации биологических испытаний ксенобиотиков

Литература

- 1 Альберт, А. Избирательная токсичность: в 2 т. / А. Альберт. – М.: Медицина, 1989. – 432 с.
- 2 Баренбойм, Г. М. Биологически активные вещества. Новые принципы поиска / Г. М. Баренбойм, А. Г. Маленков. – М.: Наука, 1986. – 340 с.
- 3 Головенко, Н. Я. Сравнительная биохимия чужеродных соединений / Н. Я. Головенко, Т. Л. Карасева. – Киев: Наук. думка, 1983. – 200 с.
- 4 Биотрансформация ксенобиотиков в растениях / С. В. Дурмишидзе [и др.]. – Тбилиси: Мецниереба, 1988. – 287 с.
- 5 Корте, Ф. Экологическая химия / Ф. Корте [и др.]. – М.: Мир, 1997. – 396 с.
- 6 Телитченко, М. М. Введение в проблемы биохимической экологии / М. М. Телитченко, С. А. Остроумов. – М.: Наука, 1990. – 288 с.
- 7 Парк, Д. Биохимия чужеродных соединений / Д. Парк. – М.: Медицина, 1973. – 287 с.
- 8 Фелленберг, Г. Загрязнение природной среды. Введение в экологическую химию / Г. Фелленберг. – М.: Мир, 1997. – 232 с.
- 9 Юрин, В. М. Регуляция функций мембран растительных клеток / В. М. Юрин, В. М. Иванченко, С. Г. Галактионов. – Мн.: Наука и техника, 1977. – 200 с.
- 10 Юрин, В. М. Основы ксенобиологии: учебное пособие / В. М. Юрин. – Мн.: Новое знание, 2002. – 267 с.