

Министерство образования Республики Беларусь
Белорусский государственный университет
Факультет биологический
Кафедра биохимии

СОГЛАСОВАНО

Заведующий кафедрой

_____Семак И.В.

« 2 » сентября 2025 г.

СОГЛАСОВАНО

Декан факультета

_____Хрусталеv В.В.

« 4 » сентября 2025 г.

Биотрансформация веществ

Электронный учебно-методический комплекс
для специальности 6-05-0511-02 «Биохимия»

Регистрационный № 2.4.3-24 / 663

Составитель:

Орёл Н.М., доцент кафедры биохимии биологического факультета БГУ,
кандидат биологических наук, доцент

Рассмотрено и утверждено на заседании Совета биологического факультета.
Протокол № 1 от 04.09.2025 г.

Минск 2025

УДК 577.1(075.8)+615.015.1(075.8)
Б 637

Утверждено на заседании Научно-методического совета БГУ.
Протокол № 2 от 26.09.2025 г.

С о с т а в и т е л ь :

Орёл Наталия Михайловна, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биохимии биологического факультета БГУ.

Рецензенты:

кафедра биологических и химических технологий УО «Брестский государственный университет имени А.С. Пушкина» (заведующий кафедрой Н.С. Ступень, кандидат технических наук, доцент);

Гилеп А.А., ведущий научный сотрудник Института биоорганической химии НАН Беларуси, кандидат химических наук, доцент.

Биотрансформация веществ : электронный учебно-методический комплекс для специальности 6-05-0511-02 «Биохимия» / БГУ, Биологический фак., Каф. биохимии. – Минск : БГУ, 2025 . – 147 с. : ил. – Библиогр.: с. 145–147.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов, обучающихся по специальности 6-05-0511-02 «Биохимия», для организации и поддержки учебного процесса, обеспечивая доступ к учебным материалам. Содержание ЭУМК предполагает изучение вопросов биотрансформации эндогенных токсических и чужеродных веществ (в том числе лекарственных), механизмов регуляции и взаимосвязи метаболических процессов биотрансформации в органах и тканях и организме в целом.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА	4
1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ	6
Введение	6
1.1. Эволюционные аспекты биodeградации ксенобиотиков	8
1.2. Общие представления о биологической активности ксенобиотиков	12
1.3. Общие принципы устойчивости организмов к действию неблагоприятных факторов, в том числе ксенобиотиков.....	18
1.4. Инактивация эндогенных токсических и биологически активных веществ	19
1.5. Пути и механизмы поступления ксенобиотиков в организм, органы и ткани.....	28
1.6. Организация системы биотрансформации ксенобиотиков	43
1.6. I Фаза биотрансформации.....	45
1.8. Метаболизм спиртов и альдегидов	58
1.9. Электронтранспортные цепи эндоплазматического ретикулула	63
1.10. Методы исследования цитохрома P450	73
1.11. II фаза биотрансформации ксенобиотиков. Реакции конъюгации	78
1.12. Биотрансформация лекарственных веществ.....	88
1.13. Выведение ксенобиотиков из организма	99
1.14. Биотрансформация веществ в кишечнике под действием микрофлоры	104
1.15. Биотрансформация свободных радикалов	107
1.15.1. Пути образования свободных радикалов, активных форм кислорода, азота, хлора и их значение	108
1.15.2. Антиоксидантная система	116
2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ	124
2.1. Лабораторное занятие 1. Исследование содержания нитритов и нитратов в биологическом материале.....	124
2.1.1. Лабораторная работа	128
2.1.2. Контрольные вопросы.....	131
2.2. Лабораторное занятие 2. Исследование антиоксидантных эффектов α -токоферола на процессы пероксидного окисления липидов в тканях животных	131
2.2.1. Лабораторная работа	134
2.3. Лабораторное занятие 3. Исследование антиоксидантных эффектов α -токоферола на процессы пероксидного окисления липидов в листьях растений	137
2.3.1. Лабораторная работа	137
2.3.2. Контрольные вопросы:.....	139
3. РАЗДЕЛ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ	140
3.1. Реферативная работа (УСР).....	140
3.2. Примеры ситуационных задач	141
3.5. Примерный перечень вопросов для подготовки к зачету	141
4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ	145
4.1. Рекомендуемая литература	145
4.2. Электронные ресурсы	147

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) по учебной дисциплине «Биотрансформация веществ» создан в соответствии с учебной программой, составленной на основе ОСВО 6-05-0511-02-2023, примерного учебного плана по специальности 6-05-0511-02 Биохимия регистрационный № 6-05-05-009/пр. от 20.12.2022, учебных планов БГУ: № 6-5.6-35/01 от 15.05.2023, № 6-5.6-35/21 з от 31.05.2023.

Содержание разделов ЭУМК соответствует образовательным стандартам высшего образования данной специальности. Учебная дисциплина относится к компоненту учреждения высшего образования и входит в модуль «Биотрансформация и биологическая активность органических и неорганических веществ».

Цель учебной дисциплины «Биотрансформация веществ» – сформировать у студентов целостную систему знаний об основных путях биотрансформации чужеродных веществ, поступающих в живые организмы, механизмах регуляции и взаимосвязи метаболических процессов биотрансформации.

Задачи учебной дисциплины:

1. изучить комплекс биохимических превращений токсических веществ эндогенного и экзогенного происхождения (в частности, лекарственных средств) в биосистемах разного уровня организации.;
2. рассмотреть основные принципы и теоретические положения использования ферментов системы биотрансформации ксенобиотиков для решения экологических, биотехнологических, фармакологических, токсикологических и медицинских задач.

Требования к компетенциям Освоение учебной дисциплины «Биотрансформация веществ» должно обеспечить формирование следующей специализированной компетенции:

СК-5 Применять знания структурно-функциональной роли основных классов биологически активных веществ, реакций биотрансформации чужеродных соединений, биологической роли неорганических элементов и биолигандов при решении задач в области медицины, фармакологии и фармацевтической биотехнологии.

Цель ЭУМК – оказание методической помощи студентам в получении современных знаний по дисциплине «Биотрансформация веществ», создание образовательной среды для самореализации студентов, стимулирование познавательной деятельности, формирование академических, когнитивных и коммуникативных компетенций студентов, систематизация учебного материала в процессе подготовки к текущей аттестации.

В структуру ЭУМК входит:

1. Теоретический раздел. Включает данные о биохимических механизмах биотрансформации гидрофильных и гидрофобных ксенобиотиков и токсических веществ эндогенного происхождения; ферментах системы биотрансформации; внутриклеточную локализацию процессов и основные типы реакций

биотрансформации чужеродных веществ, их видо- и тканеспецифичность

2. Практический раздел содержит учебно-методические материалы для проведения лабораторных работ по дисциплине «Биотрансформация веществ». Для успешного выполнения лабораторных работ приводятся основы теории по теме, перечень необходимых материалов и реактивов, методики определения биохимических показателей, контрольные вопросы.

3. Раздел контроля знаний включает перечень контрольных мероприятий управляемой самостоятельной работы студентов; темы рефератов; примеры ситуационных задач, примерный перечень вопросов для подготовки к зачету.

4. Вспомогательный раздел содержит список рекомендуемой литературы.

Сопровождение обучающихся по всем разделам и на всех этапах обучения осуществляется посредством Образовательного портала БГУ, на котором размещены презентации лекций, задания по управляемой самостоятельной работе, задания для самоконтроля, а также другие материалы по дисциплине. Контент на портале обновляется и дополняется каждый семестр.

Дисциплина изучается в 3 семестре очной формы получения высшего образования, в 3-4 семестре заочной формы получения высшего образования. Всего на изучение учебной дисциплины «Биотрансформация веществ» отведено:

– в очной форме получения высшего образования: 108 часов, в том числе 46 аудиторных часов, из них: лекции – 30 часов, лабораторные занятия – 12 часов, аудиторный контроль управляемой самостоятельной работы – 2 часа, управляемая самостоятельная работа с применением дистанционных образовательных технологий (далее: ДОТ) – 2 часа;

– в заочной форме получения высшего образования: 108 часов, в том числе – 10 аудиторных часов, из них лекции – 6 часов, лабораторные занятия – 4 часа.

Трудоемкость учебной дисциплины составляет 3 зачетные единицы.

Форма промежуточной аттестации – зачет

Работа студента с ЭУМК должна базироваться на ознакомлении с тематическим планом учебной дисциплины, представленным в учебной программе учреждения высшего образования. Программа позволяет получить информацию о тематике лекций и практических занятий, перечнях рассматриваемых вопросов и рекомендуемой для их изучения литературы. Для теоретической и практической подготовки, успешной сдачи текущей и промежуточной (зачет) аттестаций рекомендуется использовать информационно-аналитические материалы, указанные в соответствующих разделах ЭУМК.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

Введение

Биотрансформация веществ – (био.. и позднелат. *Transformatio* – преобразование), высокоспецифичные реакции превращений, осуществляемые в организме как с естественными для них, так и с чужеродными веществами.

В ксенобиохимии под биотрансформацией веществ понимают биохимическое превращение проникающих в организм чужеродных соединений (ксенобиотиков), в результате которого образуются либо менее токсические вещества (обезвреживание, или детоксикация), либо соединения более токсичные, чем исходное вещество.

Таким образом, среди веществ, поступающих в организм из окружающей среды, можно выделить естественный поток – питательные вещества, которые используются организмом на метаболизм, обеспечивающий процессы жизнедеятельности. Однако в процессе образуются конечные продукты, одни из них выводятся из организма без изменений (CO_2 , H_2O), другие (аммиак, гормоны, продукты катаболизма гема, продукты гниения аминокислот в кишечнике) подвергаются биотрансформации и, затем, удаляются.

Другой поток – это вещества природного или синтетического происхождения, которые не являются питательными и не используются организмом, но по различным причинам в него попадают (содержатся в пище и окружающей среде) и могут оказывать неблагоприятное действие – влиять на метаболизм, рост, развитие, размножение, вызвать интоксикацию и т.д., и организм должен от них избавляться. Эти чужеродные соединения также могут выделяться в неизменном виде или проходить этапы биохимической трансформации, а затем удаляться.

Эти потоки веществ взаимодействуют на всех уровнях организации живых систем и биотрансформация осуществляется на всех уровнях организации живого: субклеточном, клеточном, органно-тканевом, организменном; надорганизменном (в популяциях, биогеоценозах, биосфере).

Объект исследования биотрансформации веществ – живые системы (всех уровней организации). Предмет исследования – поступающие в живые системы чужеродные соединения, их строение, распределение, метаболические превращения и пути выведения.

Превращение большинства ксенобиотиков под действием ферментов называют по аналогии с процессами классической биохимии метаболическим. Биотрансформация (метаболизм) ксенобиотиков – самостоятельный раздел биохимии. Исследования в этой области имеют свою теоретическую базу и технические приемы.

Развитие ксенобиохимии, в основном, ведется по двум направлениям.

1-е направление – установление структуры ксенобиотиков и их метаболитов, образующихся в организме в результате биотрансформации; распределение в органах и тканях, формы и способы выведения. Исследуется

структура образующихся в организме промежуточных метаболитов из веществ, которые апробируются как лекарственные, проверяется их активность, токсичность, тератогенность, канцерогенность или мутагенность. На этих исследованиях базируется деятельность фармакологов и токсикологов.

Для изучения структуры ксенобиотиков используются сложные и многостадийные приемы физико-химических методов анализа. Методы направлены на извлечение метаболитов из биологических объектов, их хроматографическое разделение, идентификация и количественное определение, установление скорости элиминации и др. Наиболее полную информацию дает ВЭЖХ-анализ.

2-е направление занимается исследованием путей метаболизма ксенобиотиков. Наибольший объем информации дают результаты изучения активности ферментов биотрансформации, их кинетики, установления природы и влияния на организм промежуточных и конечных продуктов. Установление механизма протекания реакции биотрансформации определяет характер структурной избирательности и стереохимические изменения, сопровождающие реакцию. Исследования структуры и каталитических свойств ферментов биотрансформации, их специфичность, локализация, кинетика помогают понять как пути метаболизма ксенобиотиков, так и эндогенных веществ.

Создание новых лекарственных средств фармакологами невозможно без всестороннего знания механизмов их действия и биотрансформации. Этим достигается безопасность лечения.

Фармакокинетика изучает всасывание, распределение в организме, депонирование, метаболизм (биотрансформация) и выведение лекарственных веществ. Фармакодинамика рассматривает совокупность эффектов лекарственных веществ на организм и механизмы реализации их действия.

Активность ферментов, метаболизирующих лекарственные препараты при длительном их введении, определяют такие явления, как толерантность и привыкание.

Для токсикологии необходимы данные для понимания биотрансформации ядовитых (токсических) веществ, или приобретения токсичности в процессе биотрансформации, раскрытия механизмов токсического действия, совершенствования методов диагностики, профилактики и лечения развивающихся вследствие такого воздействия заболеваний. Проводится систематический анализ процессов метаболизма различных ксенобиотиков в филогенетическом и онтогенетическом аспектах; исследуются особенности метаболизма лекарственных веществ в органах и тканях человека и животных.

В центре внимания исследователей находится проблема загрязнения биосферы химическими веществами естественного и антропогенного происхождения. Для биологии и экологии важны данные по биотрансформации веществ антропогенного происхождения микроорганизмами, растениями и животными, так как многие ксенобиотики и их метаболиты могут передаваться

по трофической цепи питания, это приводит к чрезмерной их аккумуляции в экосистемах и оказывает пагубное действие на организмы. Полученные данные имеют первостепенное значение при проведении мероприятий по охране окружающей среды, разработке способов повышения резистентности организмов.

В последние два десятилетия стремительно развивается новое направление исследований на стыке экологии и токсикологии – экологическая токсикология. Это научное направление изучает токсические эффекты химических веществ на живые организмы, популяции организмов в экосистемах, биосферу в целом.

Экологическая токсикология изучает источник поступления вредных веществ в окружающую среду, их распространение в окружающей среде, действие на живые организмы. Принципы метаболизма ксенобиотиков и ферменты, принимающие участие в этих процессах, с успехом используются в биотехнологии и химии для синтеза органических веществ. Специфичность ферментов, метаболизирующих органические вещества, высокая скорость процесса делают их более выгодными по сравнению с химическим синтезом. Разрабатываются и используются модельные системы, имитирующие естественные ферментативные процессы.

1.1. Эволюционные аспекты биodeградации ксенобиотиков

В процессе эволюции формировались и сформировались метаболические механизмы, обезвреживающие липофильные токсические вещества как экзогенного, так и эндогенного происхождения. Комплекс этих реакций присущ всем аэробным организмам. Нарушение согласованной работы метаболических механизмов является одним из общих механизмов токсичности и приводит к нарушению гомеостаза и развитию патологического процесса.

Системы биотрансформации чужеродных соединений возникали как системы деградации и эволюционировали в результате адаптации к новым условиям среды. Для осуществления биотрансформации ксенобиотиков эволюционировали ферменты, играющие важную роль в эндогенном метаболизме:

- система цитохрома Р-450 участвует в метаболизме холестерина с образованием желчных кислот и стероидных гормонов, в активации витамина Д и др.;
- глутатионтрансферазы участвуют в обезвреживании продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и пероксидов ДНК, в метаболизме эйкозаноидов (простаноидов и лейкотриенов);
- глюкуронилтрансферазы – в обезвреживании билирубина, метаболизме жёлчных кислот, токоферолов, стероидов;
- сульфотрансферазы – в метаболизме жёлчных кислот, некоторых гликозаминогликанов и гликолипидов;
- ацетилтрансферазы – в метаболизме гексозаминов, нейраминовой кислоты, в синтезе ацетилхолина и мелатонина;

- метилтрансферазы - в синтезе креатина, холина, мелатонина, обмене катехоламинов, метилировании ДНК;

- эпоксидгидролазы – в переводе лейкотриена A4 в B4.

Цитохром P450 определяется во всех живущих организмах, включая бактерии. Предполагают, что в процессе эволюции цит. P-450, появился как механизм конверсии («обращение», «превращение», «изменение») инертных углеводородов окружающей среды до продуктов, используемых с энергетической или пластической целью. Альтернативной первоначальной функцией цитохрома P450 могло быть удаление токсичных гидропероксидов у примитивных организмов, использующих кислород в клеточном дыхании. В результате длительного и рационального процесса дупликации, конверсии и мутаций генов образовалось большое число изоформ цитохрома P450, участвующих в нормальном метаболизме и биотрансформации чужеродных компонентов. Организмы приобрели способность инактивировать растительные яды, токсины и другие чужеродные соединения и выживать в окружающей среде. Очевидно, все эти ферменты первично функционировали в эндогенном метаболизме и лишь затем ввиду широкой субстратной специфичности стали участвовать в метаболизме экзогенных субстратов – ксенобиотиков.

Рассмотрим некоторые примеры эволюции процессов биотрансформации ксенобиотиков и их значение.

Для биосферы характерны замкнутые круговороты биогенных элементов (углерода, азота, фосфора, серы, железа и др.). Атомы элемента вовлечены в круговорот в течение длительного времени, и надолго из цикла не изымаются. Замкнутость круговоротов элементов обеспечивает устойчивость биосферы, существующей миллиарды лет. На рисунке 1.1 приведен пример, демонстрирующий эволюционные возможности биodeградации – деструкции углерода специализированными формами жизни.

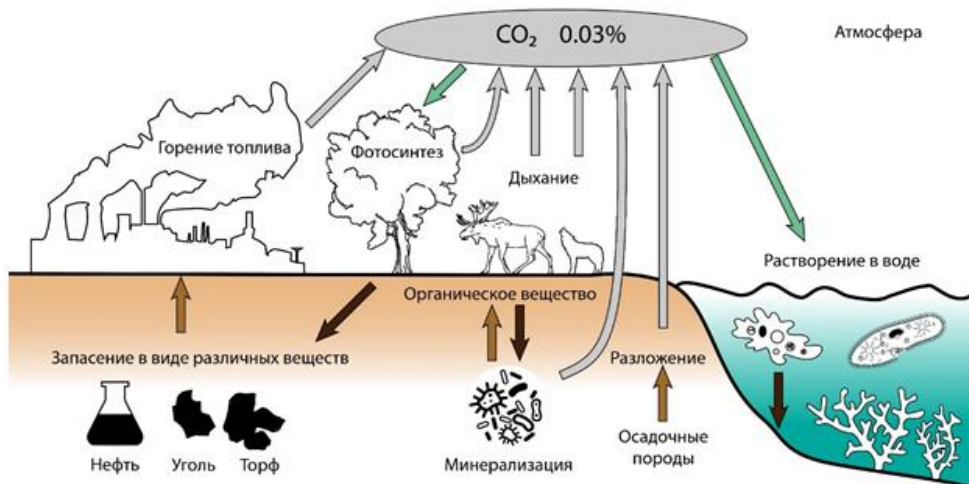


Рисунок 1.1 – Круговорот углерода в биосфере.

300 миллионов лет назад, в каменноугольном периоде появилась новая экосистема, ранее не встречавшаяся – лес (рисунок 1.2).



Рисунок 1.2 – Лес каменноугольного периода.

Углерод, связываясь деревьями при фотосинтезе, начал образовывать крупные не разлагающиеся полимеры, в частности лигнин (гидрофобный, сшитый и нерастворимый полимер оксикоричных спиртов), который составил значительная составная часть древесины (рисунок 1.3).

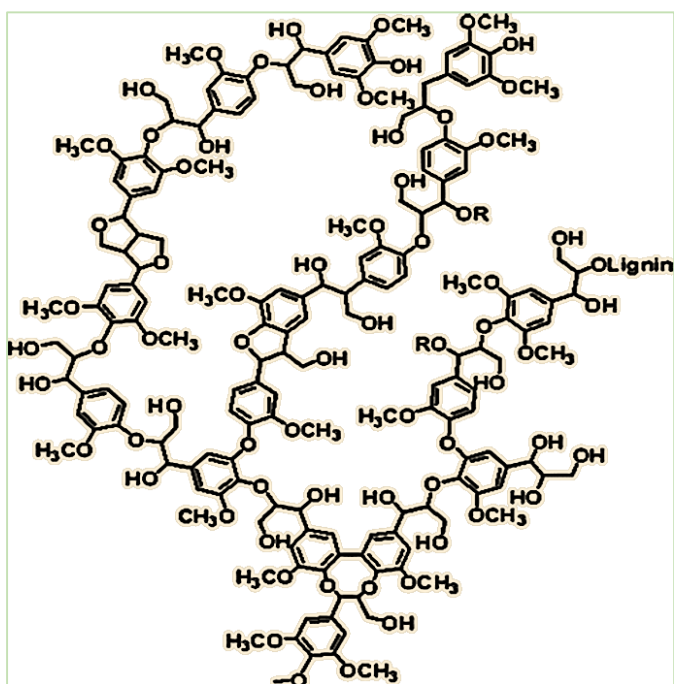


Рисунок 1.3 – Фрагмент структуры лигнина:

Появление лигнина сыграло ключевую роль в развитии древесных форм. Он пропитывает клеточные стенки, придавая им жесткость и прочность, что необходимо для поддержания вертикального положения дерева и защиты от внешних воздействий. Но лигнин – это крупный, неразлагающийся полимер,

который не подвергался деградации до простых органических и неорганических соединений. В результате этих эволюционных изменений произошел разрыв круговорота углерода.

Лигнин в природе даже в наши дни деградирует с трудом под действием грибных лакказ – медь содержащих оксидаз, катализирующих ряд реакций окисления ароматических и неароматических соединений. Лакказы вырабатываются некоторыми грибами-ксилофитами, растениями, микроорганизмами.

В начале появления лесов грибы-редуценты, разлагающие лигнин, не существовали. Мертвая древесина не гнила, а в результате абиотической деструкции обугливалась, что приводило к накоплению углерода в ископаемых остатках. Теоретически это могло привести к биосферной катастрофе. Значительная часть углевода превратилась бы в уголь и жизнь на Земле могла бы исчезнуть или вернуться к экосистемам ранней Палеозольской эры.

По счастью, этот сценарий не сбывлся. Новый пищевой ресурс открыл незанятую экологическую нишу, она начала заполняться. Появились и эволюционировали грибы с необходимыми ферментами для разложения лигнина. В целом, в результате появления грибов и других организмов, разлагающих лигнин, круговорот углерода в биосфере снова стал замкнутым.

Появились также контрорганизмы (на сфагновых болотах и торфяниках), вырабатывающие вещества, способные подавлять процессы гниения.

Формирование углей продолжается и в настоящее время, но масштабы этого процесса не заходят далеко, протекают очень медленно, останавливаясь на стадии образования бурого угля.

Еще пример:

Нам хорошо известен круговорот кислорода в биосфере (рисунок 1.4).

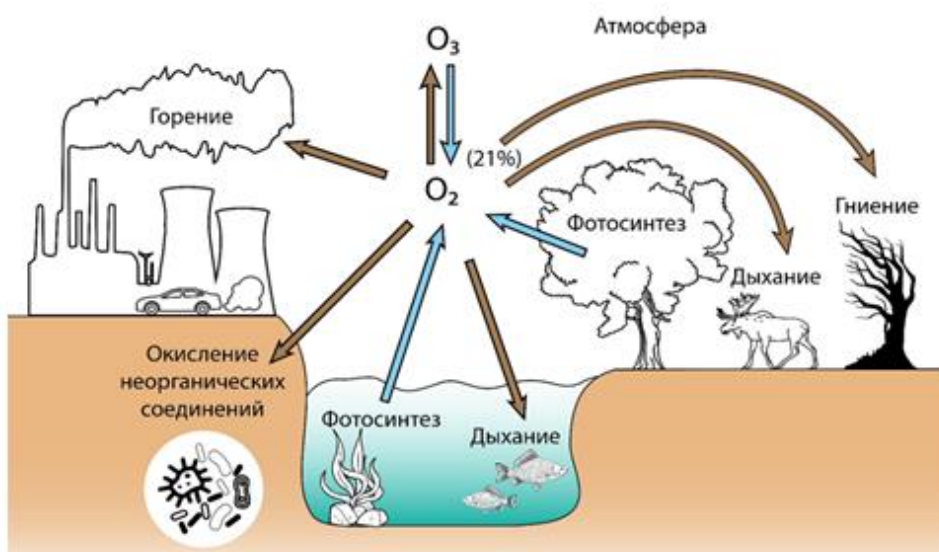


Рисунок 1.4 – Круговорот кислорода в биосфере.

Изначально атмосфера Земли была бескислородной, а примерно 2,43–2,45 миллиарда лет назад произошло ее существенное обогащение кислородом, что сделало возможным развитие жизни на Земле в том виде, в котором мы ее знаем.

Земля стала насыщаться молекулярным кислородом – агрессивным и токсичным окислителем в результате жизнедеятельности цианобактерий. Это событие могло стать катастрофой так как для первых анаэробных гетеротрофных живых организмов, как и современных облигатных анаэробных бактерий кислород чрезвычайно ядовит.

Жизнь преодолела и этот кризис. Сначала появились аэротолерантные микроорганизмы – анаэробы, которые в процессе метаболизма не способны использовать O_2 в качестве акцепторов электронов, но не погибают при контакте с ним. Затем появились аэробы, приобретшие способность использовать O_2 для окисления им органических молекул. Это позволило, с одной стороны, получать баснословное количество необходимой для жизнедеятельности энергии и осуществлять метаболизм важнейших веществ, с другой – окислять ксенобиотики. Жизнь вступила а новый виток своего развития.

Наиболее важные биохимические процессы, связанные с окислением молекулярным кислородом, представлены на рисунке 1.5.



Рисунок 1.5 – Кислородзависимые биохимические процессы.

1.2. Общие представления о биологической активности ксенобиотиков

Биологическая активность ксенобиотика – это его способность изменять функциональные возможности отдельных структур живого организма в целом или сообщества организмов.

Чужеродное химическое соединение может использоваться на нужды организма, биотрансформировать или без изменения выводиться из него, оставаться в организме и вызывать определенную ответную реакцию на биохимическом, физиологическом или организменном уровне. Некоторые чужеродные вещества настолько информативны, что попадание в организм даже одной молекулы ксенобиотика вызывает ответную реакцию. Сила и тип ответной реакции определяются химическими свойствами ксенобиотика, его концентрацией, мишенью, через которую реализуется его действие и др..

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

Ксенобиотики, воздействуя на организм, могут оказать раздражающее, дерматоксическое, пульмотоксическое, нейротоксическое, гепатоксическое, нефротоксическое, иммунотоксическое, тератогенное, мутагенное, канцерогенное или другое действие.

Ксенобиотики могут реализовывать свои эффекты по следующим механизмам:

- путем адсорбции;
- модификации мембран амфифильными ксенобиотиками;
- мембранотропными эффектами;
- рецепции;
- воздействием на физико-химические свойства цитоплазмы, проницаемость биологических мембран и обмен веществ;
- сочетанным воздействием;
- избирательностью действия.

Адсорбция. Способность ксенобиотика действовать непосредственно на поверхность клетки, адсорбируясь на клеточной поверхности (мембране) и влиять на ее физико-химические свойства. Поэтому адсорбция играет существенную роль в познании механизмов мембранотропных эффектов и вызываемых ими реакций.

Многие ксенобиотики действуют непосредственно на поверхность клетки, адсорбируясь на клеточной поверхности (мембране), или адсорбируя белки. Адсорбирующая поверхность в клетке может на несколько порядков превышать объем. Так, например, площадь поверхности белков, содержащихся в 1 см³ сыворотки крови человека, составляет 100 м².

Физико-химические характеристики веществ после их адсорбции на мономолекулярной пленке отличаются от их свойств в растворе, что имеет большую биологическую значимость. Когда говорят об адсорбции какого-либо вещества, подразумевают, что оно обратимо концентрируется на поверхности.

Адсорбция определяется суммой всех химических связей, образующихся между молекулами или молекулами с поверхностью. Процесс адсорбции обусловлен типами связей: ван-дер-ваальсовыми, водородными и ионными.

Поверхность обладает двумя особенностями:

1) на поверхности создается 100 % концентрация вещества. Т.к. вещество обладает ничтожной растворимостью, то при такой его концентрации вероятность химического взаимодействия значительно возрастает;

2) поверхность содержит ненасыщенные валентности, которые могут затрачиваться на связывание друг с другом атомов поверхности и адсорбента.

На молекулу, которая адсорбируется из раствора на поверхности, действуют силы, стремящиеся возвратить ее в раствор. Мерой способности вещества возвращаться в среду является его растворимость, которую можно рассматривать как меру способности данного вещества десорбироваться.

Адсорбцию на поверхности 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. Например, после адсорбции они могут встраиваться в мембрану и модифицировать ее.

Специфическая адсорбция свойственна гидрофобным веществам, которые стремятся разместиться на поверхности, имеющей химически комплементарный характер. Если при адсорбции не происходит образования ковалентных связей, то это обратимый процесс.

Модификация мембран амфифильными ксенобиотиками.

Амфифильные вещества легко встраиваются в мембрану и могут вызвать ее модификацию. Это, в первую очередь, присуще поверхностно-активным соединениям (детергентам). Они встраиваются в мембрану, вызывают ее разрыхление, а при большой концентрации распад мембраны на белок-липидные, белок-детергентные и липид-детергентные мицеллы.

Мембранотропные эффекты. Тропность - привязанность к определённым системам, тканям или клеткам. Мембранотропность – это прямые или косвенные (опосредованные) модификации мембранных структур, вызываемые соответствующими соединениями, и наступающие в результате этого изменения свойств биологической мембраны, например транспортных характеристик.

Мембранотропные эффекты могут быть специфическими, осуществляемыми через рецепторы, и неспецифическими – через нарушение структурно-функционального состояния мембраны (яды многих животных).

Можно выделить следующие типы мембранотропности ксенобиотиков:

1) Мембранная рецепция. В этом случае вещество не проникает внутрь клетки, а избирательно накапливается в мембранах и специфически связывается. Происходит прямой мембранотропный эффект.

2) Вещество стимулирует или угнетает биосинтетические мембранные процессы (активность ферментов, скорость синтеза и деградации веществ, и т.д.). Первичность и опосредованность эффекта оценивается конкретно в каждом случае.

3) Изменение под влиянием ксенобиотиков барьерно - транспортных свойств мембраны. Мембранотропность такого рода может быть прямой и опосредованной.

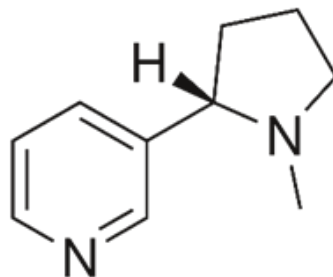
4) Мембранотропность ксенобиотиков может исследоваться экспериментально путем определения функционального взаимодействия с веществами, механизм действия которых на мембранном уровне хорошо известен.

Экспериментально выявляется стимуляция или угнетение под влиянием ксенобиотиков действия ряда гормонов, природных соединений.

Рецепция ксенобиотиков. Биологически активные соединения как естественного, так и чужеродного происхождения, на основании механизма действия на рецепторы можно классифицировать на агонисты — вещества, связывающиеся с рецепторами и индуцирующие биологический ответ, и антагонисты — соединения, препятствующие взаимодействию агониста и не вызывающие или ослабляющие биологическую реакцию.

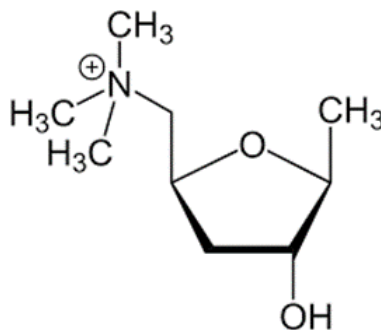
Например:

- агонист Н-холинорецепторов — никотин, (от лат. *Nicotiána* — табак) — высокотоксичный алкалоид пиридинового ряда:

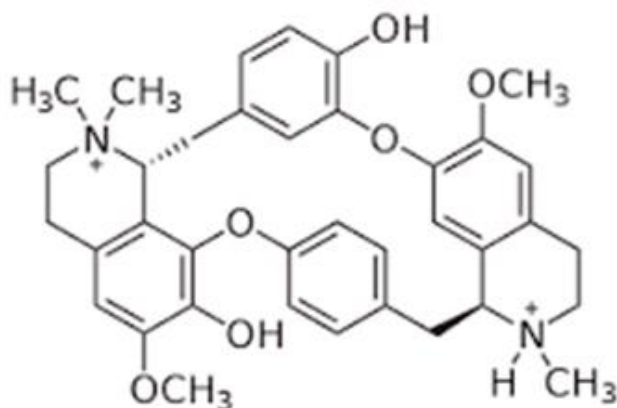


Никотин содержится в растениях семейства паслёновых (*Solanaceae*):

- агонист М-холинорецепторов — мускарин, алкалоид, содержащийся в грибах (мухоморах):

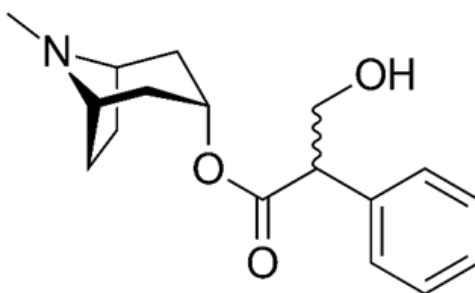


- антагонист Н-холинорецепторов – тубокурарин:



Тубокурарин – миорелаксант периферического действия. Нарушает нервно-мышечную передачу, блокируя н-холинорецепторы скелетных мышц. Является одним из действующих веществ яда кураре.

- антагонист М-холинорецепторов – атропин, м-холинолитик, растительный алкалоид:



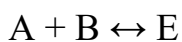
Атропин содержится в различных растениях семейства паслёновых: например, в красавке (*Atropa belladonna*), белене (*Hyoscyamus niger*), разных видах дурмана (*Datura stramonium*) и др.

Антагонизм – ослабление или угнетение биологического эффекта при совместном действии по сравнению с воздействием отдельных веществ. Например, атропин является антагонистом пилокарпина, который применяется при глаукоме.

Рассматривают следующие классы антагонистов.

Химический антагонизм, или же антагонизм через нейтрализацию, проявляется при непосредственном взаимодействии антагониста с агонистом, приводящим к инаktivации последнего.

Похожие взаимодействия можно представить в простейшем случае в виде обратимой бимолекулярной реакции образования неактивного комплекса Е:



Конкурентный антагонизм проявляется, как правило, в тех случаях, когда антагонист взаимодействует с теми же сайтами, что и агонист, но в отличие от последнего антагонист не вызывает биологической реакции.

Неконкурентный антагонизм. Взаимодействие неконкурентного антагониста с рецептором снижает эффект при образовании комплекса «агонист – рецептор».

Функциональный антагонизм. Функциональный антагонизм характеризуется тем, что в одинаковых эффекторных системах, но расположенных в разных местах, или при изменении состояния системы, вещество оказывает противоположный эффект. Например, ГАМК_A и ГАМК_C рецепторы, как правило гиперполяризующие, но могут быть и деполяризующими.

Избирательность действия ксенобиотиков. Избирательность действия – это способность воздействовать на клетки, ткани, организмы только одного определенного типа и не влиять на другие, даже если они находятся в контакте с веществом.

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

Избирательность действия ксенобиотиков определяется и их различием в распределении между клетками, тканями и организмами. Например, тетрациклины, широко применяемые для лечения бактериальных инфекций у млекопитающих, накапливаются преимущественно в клетках бактерий.

Многие биохимические процессы у всех живых существ (животные, растения или микробы) протекают одинаково. Однако даже в разных тканях одного организма биохимические процессы протекают неодинаково. Избирательность действия ксенобиотиков определяется различиями в процессах их биотрансформации или находится в зависимости от их влияния на какой-либо важный биохимический процесс, который у чувствительного организма имеется, а у устойчивого отсутствует.

Механизм действия 1,1,1-трихлор-2,2-бис(4-хлорфенил)этан (дихлордифенилтрихлорметилметан, ДДТ) на пойкилотермных животных основан на взаимодействии с белками натриевых каналов в мембране нервных клеток (в первую очередь насекомых). ДДТ поддерживает натриевый канал в открытом состоянии. Последовательный вход ионов натрия в аксон и выход из него ионов калия вызывает волну деполяризации, заканчивающуюся на нервном окончании. Выравнивание концентраций ионов натрия внутри и вне аксона приводит к постоянной деполяризации аксона, что исключает возможность передачи импульсов потенциала действия. Работа канала нарушается, затем, блокируется.

Натриевые каналы нервной системы гомойотермных животных оказались малочувствительными к ДДТ, его острая токсичность для мышей и крыс лежит

в пределах ЛД₅₀ 250-400 мг/кг. Для насекомых его токсичность примерно на два порядка выше.

Опасность для теплокровных заключается в том, этот стойкий ксенобиотик накапливается в организме животных и человека и повышает уровень микросомальных оксигеназ, следствием чего становится ослабление иммунитета и другие отрицательные эффекты.

В организме птиц ДДТ блокирует карбоангидразу, участвующую в формировании скорлупы яиц. Скорлупа истончается и теряет прочность. Следствие –невозможность высиживания яиц крупными птицами. Это стало одной из причин сокращения их численности на фоне использования хлорорганических инсектицидов. В частности, в США из-за этого значительно сократилась популяция белоголовых орланов.

ДДТ нарушает и некоторые важные процессы в растениях; так, например, он подавляет фотосинтез.

1.3. Общие принципы устойчивости организмов к действию неблагоприятных факторов, в том числе ксенобиотиков.

Под биологической устойчивостью понимается способность организмов сохранять свою структуру и функциональные особенности и давать потомство при воздействии внешних факторов.

Организмы обладают определенным комплексом защитно-приспособительных реакций, позволяющим противостоять действию разнообразных неблагоприятных, стрессовых факторов, в том числе – химических веществ (система биотрансформации).

Теоретически не существует соединений, лишенных токсичности. Всегда обнаруживается биологический объект, реагирующий повреждением, нарушением функций, гибелью на действие определенного вещества в определенных дозах.

Токсичность веществ, инертных в отношении биологических объектов, может быть количественно обозначена как стремящаяся к нулю.

Свойства токсичности присущи практически всем химическим веществам окружающего нас мира, как естественного, так и антропогенного происхождения.

Чтобы было понимание!

Существует необходимая разовая доза соли для человека, она составляет всего 250 мг, суточная – 5 г. Летальная доза, когда человек однократно съест 250 г соли.

Если человеку выпить разом 2-3 дневные нормы воды, а это приблизительно 7-10 литров воды, то может наступить смерть. Такие случаи редки, мало кто способен по собственной воле выпить такое количество воды. Но, в 2005 году смерть от водной интоксикации постигла жертву спора. 21-летний студент из Калифорнии, выпил на спор 20-ти литровую канистру воды и умер.

В 2007 году так же погибла любительница подарков, участвующая в нелепом розыгрыше приставки Nintendo Wii. Победителем должен был стать человек, выпивший наибольшее количество воды. Дженнифер Стрейндж выпила 7,5 литров воды. Приставку она выиграла, но на следующий день умерла от водной интоксикации.

В основе устойчивости лежит совокупность клеточно-молекулярных механизмов, поддерживающих гомеостазис и целостность клетки, организма, популяции в условиях их действия.

Механизмы устойчивости могут формироваться двумя путями:

1) предотвращением поступления фактора (в частности, ксенобиотика) в организм;

2) включением внутриклеточных механизмов обезвреживания: инактивации и выведения, иммобилизации поглощенных ксенобиотиков, а также репарации повреждений.

Механизмы устойчивости к чужеродным химическим веществам могут носить специфический и неспецифический характер.

1) Неспецифические механизмы устойчивости носят универсальный характер и не зависят от природы действующего фактора.

Примеры неспецифических процессов устойчивости растений при действии любых неблагоприятных факторов:

- усиление поглощения O_2 , ускоренная трата АТФ;
- увеличение синтеза этилена и абсцизовой кислоты;
- торможение деления, роста и других физиологических процессов, которые осуществляются в обычных условиях; и др.

2) Специфические приспособительные реакции характерны для конкретного повреждающего фактора.

Например:

- синтез белков теплового шока при перегревании;
- индукция ферментов, окисляющих ксенобиотик, и др.

При разном характере воздействия неблагоприятного фактора ответные реакции могут различаться, например:

- при слабом, но длительном воздействии неблагоприятного фактора проявляются специфические реакции;
- при сильном кратковременном – неспецифические реакции (развитие стресса).

Под влиянием химического загрязнения развивается окислительный стресс, связанный с образованием активных форм кислорода.

1.4. Инактивация эндогенных токсических и биологически активных веществ

Система детоксикации – это слаженная работа нескольких систем сразу:

- кровь - белки и клетки (в том числе иммунная система);
- системы биотрансформации органов и тканей;

- системы экскреторных органов: желудочно-кишечный тракт, почки, легкие, кожа.

В процессе работы происходит обезвреживание (инактивация) веществ эндогенного происхождения.

Инактивация гемсодержащих белков

Рассмотрим процесс на примере катаболизма гемоглобина (рисунок 1.6).

В клетках селезенки, костного мозга и печени распад гемоглобина осуществляет гемоксигеназная система. Гемоглобин под действием гемоксигеназы (цит. Р-450) при участии НАДН, O_2 , и аскорбиновой кислоты превращается в вердоглобинн, который затем распадается на глобин, биливердин и Fe. Биливердинредуктаза восстанавливает биливердин в билирубин (рисунок 1.6).

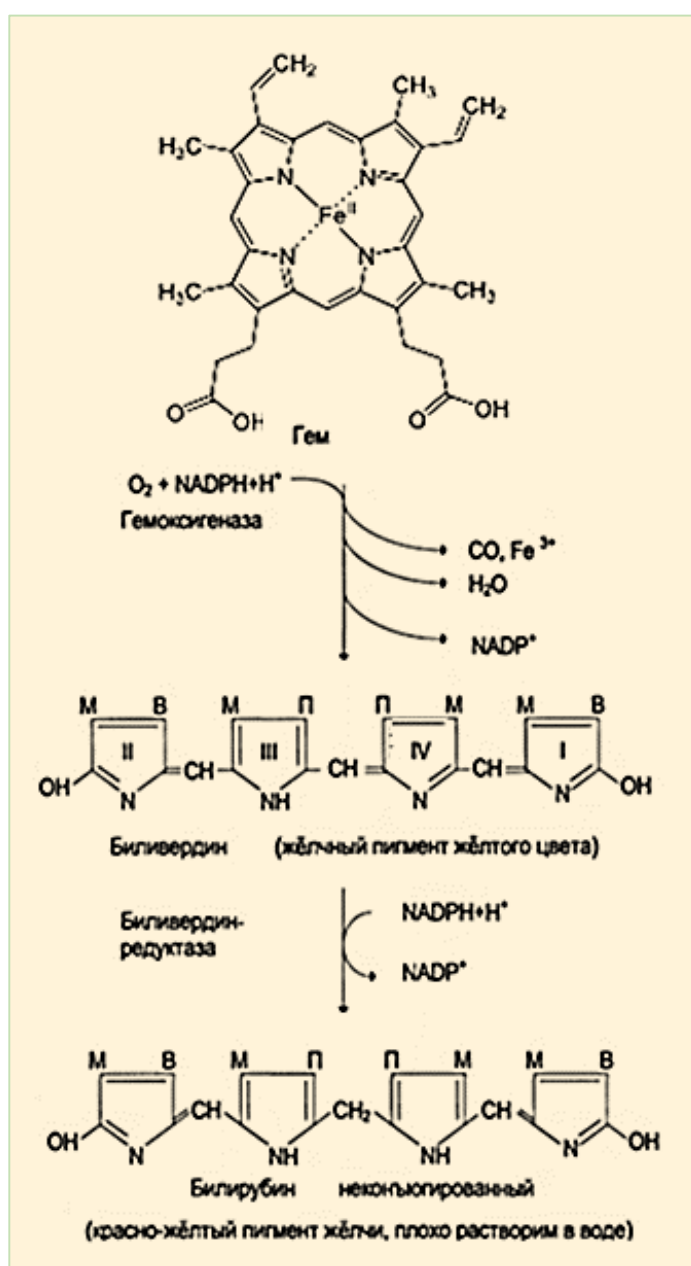


Рисунок 1.6 – Распад гема до неконъюгированного билирубина.

Из клеток ретикуло-эндотелиальной системы билирубин попадает в кровь. Концентрация билирубина в крови человека в норме 1,7-17 мкмоль/л.

Здесь он быстро вступает в комплекс с альбуминами плазмы. В гораздо меньшем количестве образует комплексы с металлами, аминокислотами, пептидами и некоторыми малыми молекулами. Комплекс билирубина с альбумином и другими компонентами крови называется свободным (неконъюгированным), или непрямым билирубином. Образование таких комплексов не позволяет выделяться билирубину с мочой.

Из сосудистого русла в гепатоциты билирубин попадает с помощью белка-переносчика – это мембранный транспортный белок органических анионов (работает по механизму – флип-флоп перенос). Далее при участии цитозольного связывающего белка лигандин (Y-протеин) билирубин транспортируется в ЭПР. В ЭПР протекает реакция конъюгации билирубина с УДФ-глюкуроновой кислотой. Катализирует реакцию УДФ-глюкуронилтрансфераза. Образуются моно- и диглюкурониды – это прямой, или конъюгированный билирубин (рисунок 1.7).

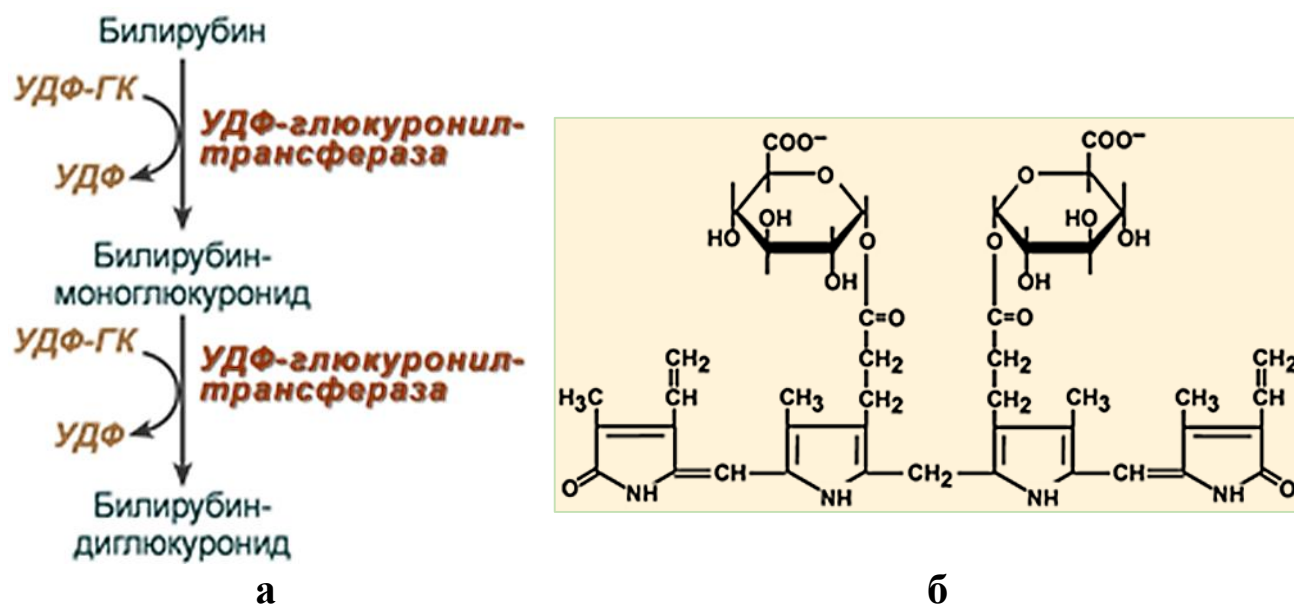


Рисунок 1.7 – Реакции синтеза билирубиндиглюкуронида – а. Строение билирубиндиглюкуронида (прямой билирубин) – б.

Кроме глюкуроновой кислоты, в реакцию конъюгации с билирубином могут вступать сульфаты, фосфаты, глюкозиды. Прямой билирубин дает реакцию с диазореактивом Эрлиха.

Диазореакция Эрлиха – это качественная проба обнаружения биологически важных веществ в крови и моче. Основана на неспецифической цветной реакции между диазореактивом Эрлиха и некоторыми органическими

веществами (пиррол, крезол, индикан, белки, содержащие аминокислоты тирозин, триптофан, гистидин, прямой билирубин и др.).

Приготовление диазореактива осуществляют следующим образом: раствор, состоящий из 5 г сульфаниловой кислоты и 50 мл крепкой соляной кислоты ($d=1,12$), доводят водой до объема 1 л; к полученному раствору добавляют 0,5 % раствор азотистокислого натрия. Образуется диазофенилсульфоновая кислота (реактив Эрлиха).

Образовавшиеся в печени билирубин-глюкурониды при участии АТФ-зависимого переносчика секретируются в желчные протоки и далее в кишечник.

Одновременно, даже в норме (особенно у взрослых), некоторое количество билирубин-глюкуронидов может попадать из желчи в кровь по межклеточным щелям. Таким образом, в плазме крови обычно присутствуют две формы билирубина: свободный (непрямой), попадающий сюда из макрофагов (80% и более всего количества), и связанный (прямой), попадающий из желчных протоков (в норме не более 20%).

Из печени в составе желчи прямой билирубин секретируется в двенадцатиперстную кишку и далее в толстый кишечник. В толстом кишечнике под действием гидролаз бактерий происходит его деконъюгация на глюкуроновую кислоту и непрямой билирубин.

Освободившийся от глюкуроновой кислоты билирубин при участии бактерий превращается в уробилиноген. Уробилиноген частично возвращается в печень и расщепляется до пирролов. Оставшийся в кишечнике — превращается в стеркобилиноген, часть которого всасывается в кровь и удаляется при участии почек с мочой. Другая часть удаляется из кишечника с калом. Под действием кислорода стеркобилиноген окисляется и превращается в окрашенный стеркобилин (рисунок 1.8).

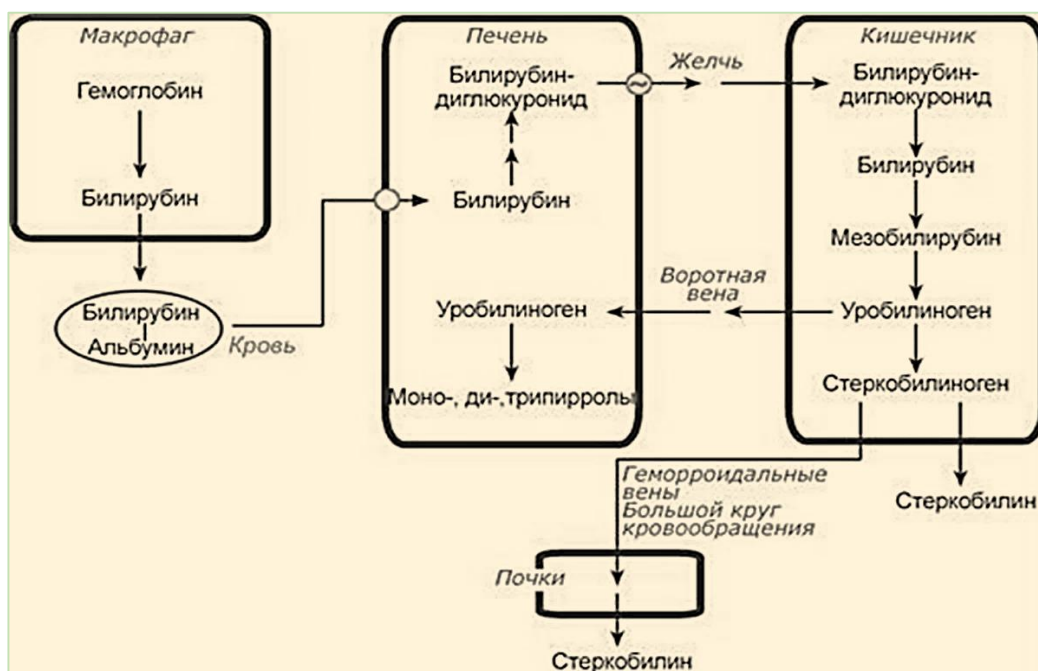


Рисунок 1.8 – Этапы метаболизма билирубина в организме.

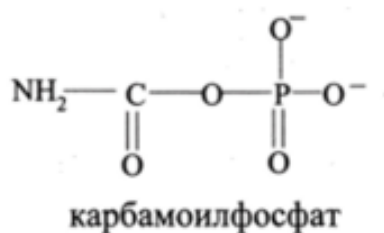
Обезвреживание аммиака

В сутки у человека подвергается распаду в среднем 70 г аминокислот, при этом освобождается NH_3 . Норма NH_3 в крови не превышает 60 мкмоль/л (3 ммоль/л – летальна).

Механизм обезвреживания NH_3 - биосинтез мочевины в орнитиновом цикле, происходит в основном в печени.

На образование 1 моль мочевины расходуется 4 эквивалента АТФ).

Вначале в митохондриях из аммиака и бикарбоната (с затратой 2 АТР) синтезируется карбамоилфосфат – активная форма аммиака:



Это макроэргическое соединение участвует в синтезе пиримидинов, аргинина, мочевины и др. Реакцию катализирует карбамоилфосфат синтаза I.

Карбамоил фосфат, взаимодействуя с орнитином вступает в цикл мочевинообразования (рисунок 1.9).

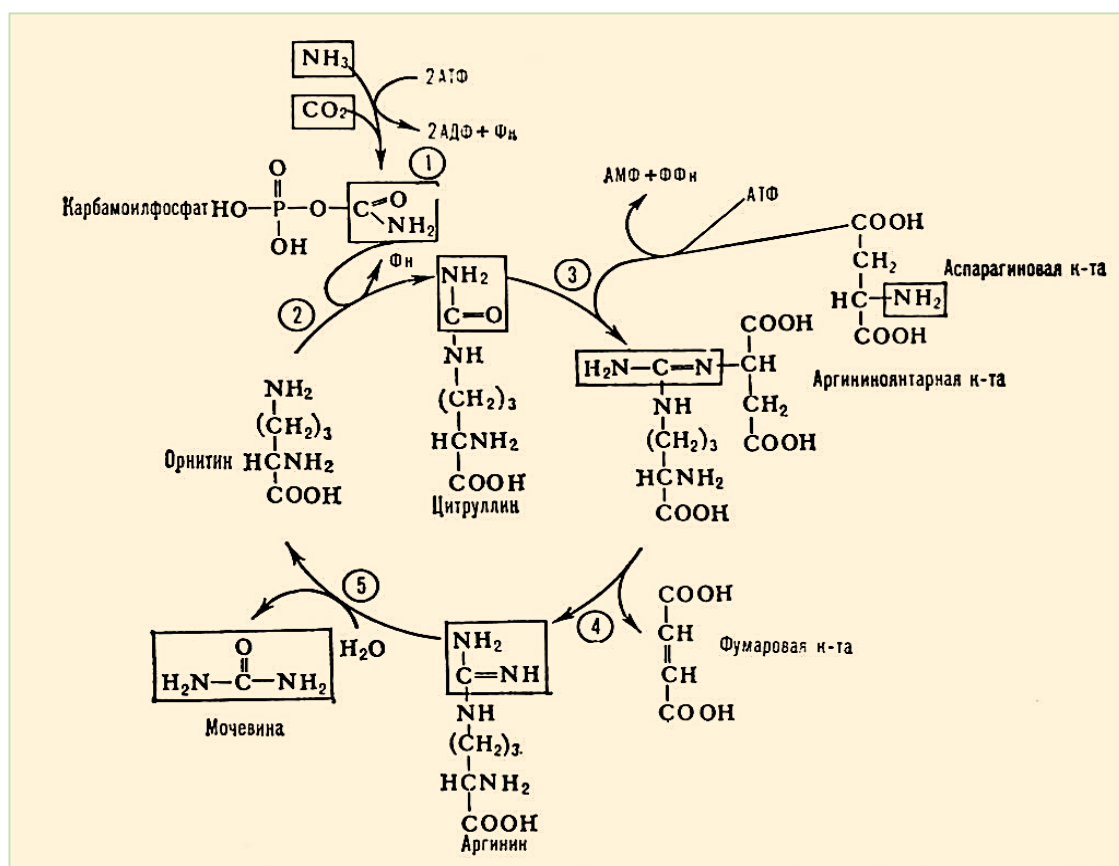


Рисунок 1.9 –Орнитиновый цикл синтеза мочевины в печени

Орнитиновый цикл мочевинообразования поддерживает концентрацию аммиака на стационарном уровне и удаляет метаболический бикарбонат.

При синтезе 1 моля мочевины выводится 2 моль HCO_3^- . Один ион HCO_3^- включается в молекулу мочевины, другой – протонируется с образованием CO_2 .

Инактивация гормонов

Метаболизм стероидов. Стероидные гормонов покидают клетку, где были синтезированы, и транспортируются кровью.

Например, показано, что половые гормоны в плазме крови образуют комплексы с глобулином, связывающем стероиды.

Глобулин связывает и, следовательно, инактивирует около 80% этих гормонов. Ещё 19–20% связывается альбуминами. 1–3% гормонов свободно циркулирует в крови и проявляет свою биологическую активность.

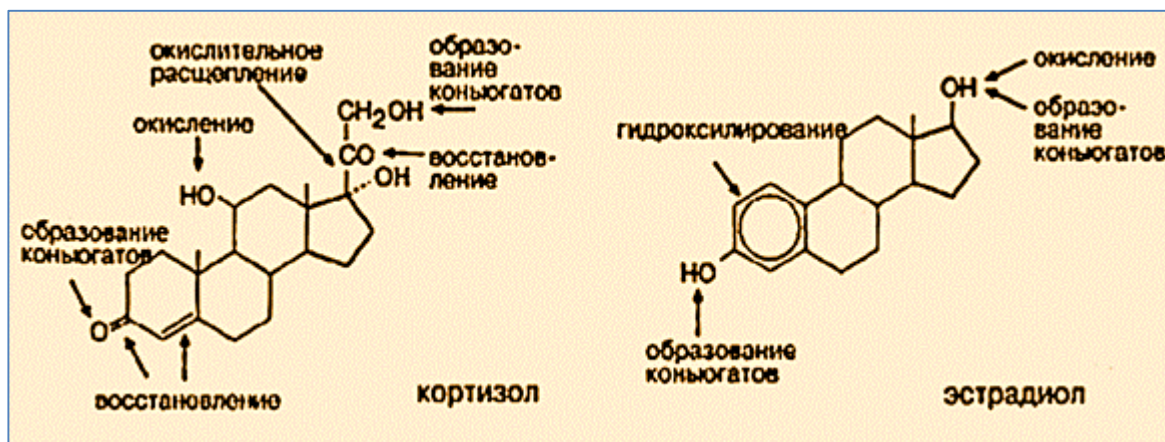
Гормоны после выполнения своих функций подвергаются биотрансформации в печени при участии ферментов системы цитохрома P450, в частности изофермента P450-3A4.

Метаболизм стероидов можно разбить на следующие этапы:

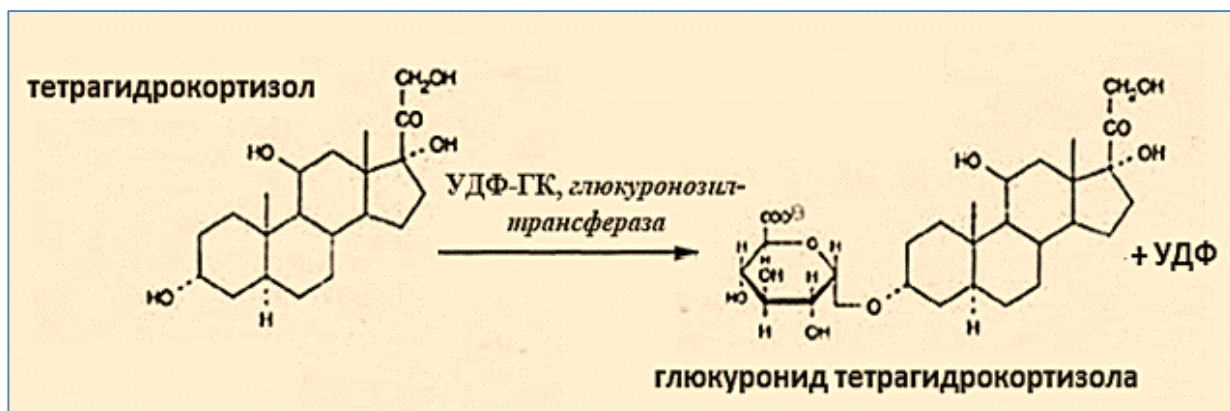
1. Гидроксирование. Это первый и самый важный шаг в метаболизме стероидов. Он происходит в эндоплазматическом ретикулуме печени, где ферменты добавляют гидроксильные группы к молекулам стероидов.

2. Восстановление. В кольце А может происходить восстановление оксогруппы и двойной связи.

3. Окисление. После гидроксирования стероиды подвергаются окислению с помощью ферментов, что часто приводит к образованию более легких метаболизируемых соединений. Например, при окислении гидроксильных групп образуются кето- и альдегидные группы. В частности, образуются 17-кетостероиды, которые выводятся из организма с мочой и частично с желчью в виде конъюгатов:



4. Конъюгация. Далее происходит связывание стероидных метаболитов с различными молекулами (конъюгация): глюкуроновой кислотой, сульфатами и аминокислотами:



Это делает метаболиты более водорастворимыми и улучшает их выведение из организма почками.

Содержание 17-КС в моче используется в качестве критерия при изучении их метаболизма.

Обезвреживание катехоламинов. Только 5 % адреналина удаляется непосредственно с мочой (у человека), остальной после выполнения функций подвергается распаду.

В органах катехоламины вступают в соединение с различными белками, образуя комплексные соединения. Образование комплексов имеет большое значение в стабилизации и временной инактивации гормона.

К числу наиболее вероятных путей ферментативных изменений структуры катехоламинов относятся хиноидное окисление, окислительное дезаминирование, метилирование.

Хиноидное окисление осуществляется катехолоксидазой, цитохромоксидазой, в результате образуются вещества индольной структуры типа адренолютина и адренохрома. Эти продукты обладают выраженной биологической активностью. В моче здорового человека продукты хиноидного окисления почти не обнаруживаются.

Распад катехоламинов протекает, главным образом, под влиянием двух ферментных систем: катехол-О-метилтрансферазы (КОМТ) и моноаминоксидазы (МАО) (рисунок 1.10).

Под действием КОМТ в присутствии донора метиловых групп S-адренозилметионина катехоламины превращаются в норметанефрин (норметадреналин) и метанефрин (метадреналин) – О-метилпроизводные норадреналина и адреналина, которые под влиянием МАО переходят в альдегиды, и далее (в присутствии альдегидоксидазы) в ванилилминдальную кислоту (ВМК) — основной продукт распада норадреналина и адреналина.

Если катехоламины вначале подвергаются действию MAO, а не КОМТ, они превращаются в 3,4-диоксиминдалевый альдегид, а затем под влиянием альдегидоксидазы и КОМТ – в 3,4-диоксиминдальную кислоту и винилминдальную кислоту.

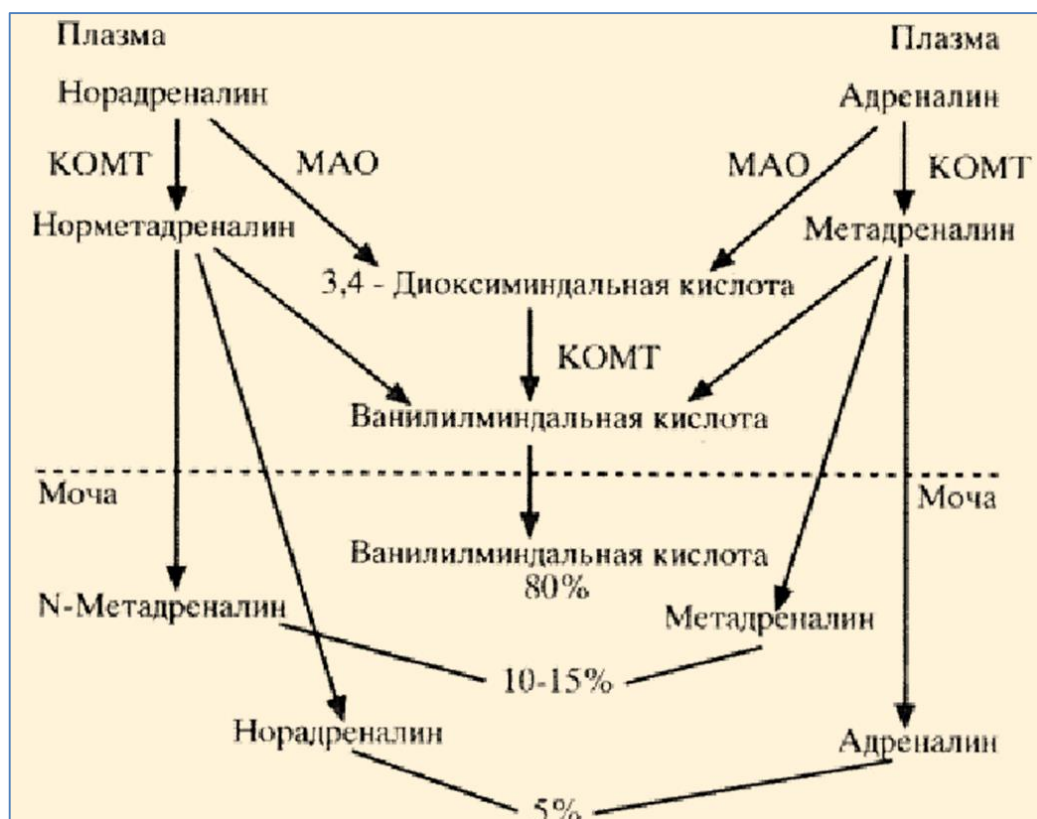


Рисунок 1.10 – Основные продукты распада адреналина и норадреналина.

Если катехоламины вначале подвергаются действию MAO, а не КОМТ, они превращаются в 3,4-диоксиминдалевый альдегид, а затем под влиянием альдегидоксидазы и КОМТ — в 3,4-диоксиминдальную кислоту и винилминдальную кислоту.

В присутствии алкогольдегидрогеназы из катехоламинов может образовываться 3-метокси-4-оксифенилгликоль, являющийся основным конечным продуктом деградации адреналина и норадреналина в ЦНС.

Продукты метаболизма катехоламинов образуют конъюгаты с глюкуроновой или серной кислотой. Период полураспада катехоламинов составляет 1-2 мин.

Распад дофамина происходит аналогично, отличие в том, что его метаболиты лишены гидроксильной группы у β -углеродного атома, поэтому вместо ванилилминдальной кислоты образуется гомованилиновая (ГВК) или 3-метокси-4-оксифенилуксусная кислота.

Образующиеся под действием цитозольных ферментов норадреналин и адреналин в синаптических окончаниях симпатических нервов и мозговом слое

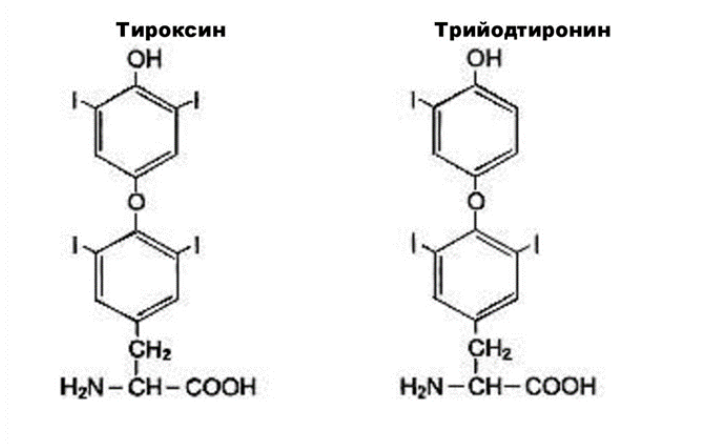
надпочечников поступают в секреторные гранулы, что предохраняет их от действия ферментов деградации.

Если обратиться к классической схеме обмена катехоламинов, нетрудно заметить, что все ферменты, вовлеченные в обмен катехоламинов, локализованы внутри клеток. Поэтому, очевидно, что попавшие в кровоток катехоламины, будут беспрепятственно оказывать регуляторные (в том числе и нежелательные) воздействия на различные органы и системы организма, а такого в принципе быть не должно.

Открыт секреторный фермент, ответственный за селективную деградацию циркулирующих в крови катехоламинов – реналаза. Это аминоксидаза, проявляющая свою активность преимущественно в отношении катехоламинов – дофамина, норадреналина, адреналина. Синтезируется почками и выделяется в кровь. К настоящему времени обнаружено 7 подтипов этого биомаркера. На сегодняшний день каталитические и регуляторные свойства были определены только для фермента человека. Фермент неактивен при использовании в качестве субстратов других физиологически важных аминов: серотонина, тирамина, бензиламина, метиламина и спермидина. Известно, что в ходе инкубации реналазы с потенциальными субстратами происходит образование пероксида водорода, по накоплению которого и судят об активности этого фермента.

Катаболизм гормонов щитовидной железы. Процесс протекает по двум направлениям:

- распад с участием дейодиназ, последовательно удаляющих от молекулы йод с его освобождением, чаще в виде йодидов;
- дезаминирование или декарбоксилирование боковой цепи или расщепление эфирной связи с образованием неактивных соединений.



В печени дейодированные метаболиты связываются с глюкуроновой или серной кислотой и удаляются с желчью.

Продукты обмена или неизмененные гормоны могут экскретироваться почками или печенью, а затем кишечником. Возможно, что некоторая часть неизмененного тироксина, поступая через печень и желчь в кишечник, вновь всасывается, пополняя резервы этого гормона в организме.

Дегградация пептидных гормонов. Процесс начинается уже в крови или на стенках кровеносных сосудов, интенсивно идет в почках.

Гормоны, содержащие дисульфидные мостики, например инсулин, могут инактивироваться за счет восстановления остатков цистина. Другие – гидролизуются экзо- и эндопептидазами. Протеолиз приводит к образованию множества фрагментов, некоторые из них могут проявлять биологическую активность (рисунок 1.11).

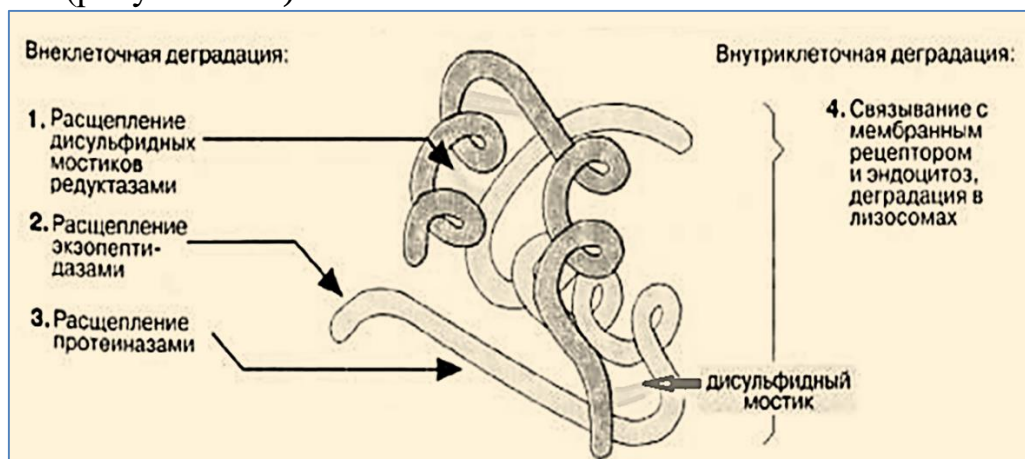


Рисунок 1.11– Дегградация пептидных гормонов.

Многие белково-пептидные гормоны удаляются из системы циркуляции за счет связывания с мембранным рецептором и последующего эндоцитоза гормон-рецепторного комплекса. Дегградация таких комплексов происходит в лизосомах, конечным продуктом дегградации являются аминокислоты, которые вновь используются в качестве субстратов в анаболических и катаболических процессах. Дегградация в протеосомах не описана.

Липофильные и гидрофильные гормоны имеют различный полупериод существования в системе циркуляции. По сравнению с гидрофильными гормонами ($t_{1/2}$ несколько минут или часов) липофильные гормоны живут существенно дольше ($t_{1/2}$ – несколько часов или дней). Биохимический полупериод функционирования гормонов зависит от активности системы дегградации. Воздействие на систему дегградации лекарственными препаратами или повреждение тканей может вызвать изменение скорости распада и концентрации гормонов.

1.5. Пути и механизмы поступления ксенобиотиков в организм, органы и ткани.

Поступление ксенобиотиков в организм осуществляется через кожу, легкие, пищеварительный тракт (дигестивный путь, то есть через ЖКТ) и другие.

Площадь «всасывающих» поверхностей тела человека (m^2) существенно различается:

- Кожа – 1,2 – 2.
- Полость рта – 0,02.
- Желудок – 0,1 – 0,2.
- Тонкий кишечник – 100.
- Толстый кишечник – 0,5 – 1,0.
- Прямая кишка – 0,04 – 0,07.
- Полость носа – 0,01.
- Легкие – 70.

Это, наряду с другими факторами, влияет на скорость проникновения веществ в организм:

Всасывание через кожу

Кожа – это уникальный орган нашего организма, выполняющий множество функций, одной из которых является барьерная защита: механическая; биологическая; от ультрафиолетового облучения; обезвоживания.

Механическая защита осуществляется всеми структурами кожи от гиподермы до рогового слоя. Но, основной преградой для проникновения чужеродных веществ, аллергенов, токсинов и прочих агрессивных факторов окружающей среды является эпидермис.

Роговые чешуйки, липидный барьер, плотная сцепка клеток эпидермиса и базальная мембрана физически препятствуют проникновению огромного количества опасных веществ.

Все же защите неабсолютна и существуют пути через которые, при определенных условиях, вещества могут проникнуть в кожу. Давайте рассмотрим их.

Чрескожное (транскутанное) поступление происходит:

- а) через эпидермис (трансэпителиальный трансэпидермальный);
- б) через сальные и потовые железы (трансгландулярный);
- в) через волосяные фолликулы (трансфолликулярный).

Для водорастворимых веществ кожа представляет практически непреодолимый барьер.

Низкомолекулярные липидорастворимые и липофильные соединения могут поступать трансэпителиальным путем.

На процесс резорбции через кожу в наибольшей степени влияют физико-химические свойства ксенобиотика, прежде всего, его липофильность.

Факторы, влияющие на проникновение активных веществ в кожу:

- липофильность вещества, может быть охарактеризована количественно при помощи коэффициента распределения LogP , чем выше липофильность вещества, тем большей проникающей способностью через липидный барьер оно обладает;

- размер молекул – принято считать, что молекулы размером ниже 500 Да проникают в кожу. Это правило было выведено исходя из фактов что, молекулярную массу менее 500 Да имеют все контактные аллергены, а так же наиболее широко используемые лекарственные средства местного применения

(анальгетики, кортикостероиды, антигистаминные препараты, ретиноиды т.д.). У каждого вещества есть своя рабочая концентрация.

- применение энхансеров – ПАВ, спирт и др. вещества повышающие проницаемость липидов;

- температура и время экспозиции так же влияют на проникновение активных компонентов в кожу.

- трансдермальные системы доставки – это транспортные частицы, представляющие собой полые капсулы, в центре которых помещают активное вещество (липосомы, наносомы, нисомы, этосомы, трансферосомы, микросферы и др).

Трансэпидермальное проникновение веществ осуществляется:

- непосредственно через клетки;
- через межклеточные пространства.

Следует различать:

- собственно резорбцию (проникновение веществ через кожу в кровь);
- фиксацию ксенобиотиков в кожных покровах.

Если вещества проникают через кожу медленно, она может выполнять функции депо. В этом случае эффекты вещества на организм формируются постепенно и имеют достаточно продолжительный скрытый период.

При поступлении ксенобиотиков через кожу может проявляться их высокая токсичность даже в низких концентрациях. Существуют контактные яды.

Например, мыши, получающие 0,3 мкг диоксина на килограмм массы при нанесении на кожу, поглощали 40 % апплицированной дозы. А мыши, получающие от 32 до 320 мкг диоксина на килограмм массы перорально (через рот), накапливали меньше 20 % дозы.

В отношении дермального действия чужеродных химических веществ в низких концентрациях важно учитывать длительность и частоту периодов воздействия. Пример – поступление алюминия через кожу за счет использования дезодорантов в аэрозольных баллончиках из этого металла; всасывание моющих средств и др.

В таблице 1.1 представлены параметры пенетрации (% вещества из нанесенного, который усваивается за определенный период времени) некоторых токсикантов в организм человека через кожу.

Таблица 1.1 – Параметры пенетрации.

Вещества	Место Аппликации	Растворитель	Параметры пенетрации
----------	---------------------	--------------	-------------------------

Фенол	Накожная камера	Испарение	48%, 8ч
Фенол	Руки	Вода	23%, 1ч
Ацетат свинца	Лоб	Лосьон	0,3%, 48ч
Хром	Предплечие	Вода	23%, 1ч
Малатион	Предплечие	Ацетон	8%, 5 дней
Паратион	Предплечие	Ацетон	10%, 5 дней
Карбарил (севин)	Предплечие	Ацетон	74%, 5 дней
Альдрин	Предплечие	Ацетон	8%, 5 дней
2,4-Д	Предплечие	Ацетон	6%, 5 дней
Дикват	Предплечие	Ацетон	1%, 5 дней

Через кожу в организм человека легко проникают, например:

- жирорастворимые токсины, например никотин;
- хлорированные углеводороды (особенно опасны хлорированные дибензодиоксины и дибензофураны);
- соли ртути, таллия и др.

Из токсинов животных - батрахотоксин кожи лягушек-древолазов; - лекарственные препараты в виде мазей, гелей, содержащие токсические вещества природного происхождения.

Пенетрация веществ в кожный покров зависит от: увлажненности кожи, ее состояния, возраста, размера эмульсионных частиц, концентрации активного вещества, времени контакта и свойств вещества, наносимого на кожу.

Ксенобиотик проникает через кожу в процессе пассивной диффузии. До настоящего времени не установлено случаев активного трансдермального транспорта веществ. Резорбция веществ, умеренно растворимых в воде со средней массой молекулы, описывается уравнением Фика.

Закон Фика (диффузия) выражается формулой:

$$m = D \frac{c_1 - c_2}{l} S t,$$

где m - количество диффундирующего вещества, проходящего за время t через площадку S см², расположенную перпендикулярно к направлению, в котором движется вещество;
 c_1 и c_2 - концентрации диффундирующего вещества в двух слоях, отстоящих друг от друга на расстоянии l ;
 D - коэффициент диффузии.

На скорость резорбции существенно влияет анатомическая локализация области контакта с веществом. Наибольшей способностью к резорбции обладает кожа мошонки и подмышечной впадины. В таблице Представлены данные скорости проникновения паратиона (тиофоса) через кожу различных областей тела человека (таблица 1.2).

Таблица 1.2 – Процент резорбировавшегося паратиона от нанесенного количества, за 5 суток.

Анатомическая область	Количество, %
Наружная поверхность предплечья	8,6
Волосистая часть головы	32,2
Ладонь	11,8
Коленная область	13,8
Живот	18,5
Тыл кисти	21,0
Лоб	36,3
Аксиллярная область	64,0
Мошонка	100,0

Повреждение рогового слоя эпидермиса и жировой смазки кожи (кератолитическими средствами, органическими растворителями) приводит к усилению резорбции ксенобиотиков. Механическое повреждение кожи с образованием дефектов, особенно обширных, лишает ее барьерных свойств.

Увлажненная кожа лучше всасывает вещества, чем сухая.

На скорость резорбции лекарственных веществ, апплицируемых в виде эмульсий, растворов, мазей, существенное влияние оказывают свойства носителя (растворителя, эмульгатора, мазовой основы).

Скорость трансдермального (транскутанного) поступления и глубину проникновения лекарственного вещества можно усилить, используя электрофорез, лазерофорез и др.

Трансдермальная доставка ЛС имеет большие перспективы как альтернатива пероральному и внутривенному назначению и особенно привлекательна для пациентов, страдающих хроническими заболеваниями.

Трансдермальная доставка является простой в применении, этот подход способствует приверженности, одной из важных проблем лечения пациентов. По оценкам аналитиков фармацевтического рынка, мировые объемы продаж трансдермальных форм будут расти. Это связано как с разработкой новых ЛС, так и с увеличением количества трансдермальных систем и способов доставки.

В эпидермальном слое осуществляется метаболизм некоторых ксенобиотиков. Общая активность процессов составляет 2 - 6 % по сравнению с метаболической активностью печени.

Следует иметь в виду, что площадь кожных покровов большая, у взрослого человека – в среднем 1,6 м², у пятилетнего ребенка — 0,8 м². Поэтому метаболизм в коже вносит вклад как в общие механизмы обезвреживания, так и проявления токсичности ксенобиотика.

Резорбция через слизистые оболочки

Слизистые оболочки лишены рогового слоя и жировой пленки. Они покрыты водной пленкой, иногда с примесью слизи. Поэтому многие вещества достаточно легко проникают через слизистые оболочки. Резорбтивная способность для слизистых оболочек разных анатомических областей, (несмотря на структурные различия), достаточно близка.

Резорбция веществ через слизистые оболочки (как и через другие всасывающие поверхности) определяется следующими факторами:

- 1) агрегатным состоянием вещества;
- 2) дозой и концентрацией ксенобиотика;
- 3) видом слизистой оболочки, её толщиной;
- 4) продолжительностью контакта;
- 5) интенсивностью кровоснабжения анатомической структуры;
- 6) площадью поверхности структуры.

Характеристика слизистых оболочек различных анатомических образований человека приведена в таблице 1.3.

Таблица 1.3 – Характеристика слизистых оболочек различных анатомических областей человека.

Область	Тип эпителия	Площадь поверхность и (м ²)	Время контакта с веществом
Полость рта	Многослойный плоскоклеточный	0,02	произвольное
Желудок	Однослойный цилиндрический	0,1 - 0,2	минуты - часы
Тонкая кишка	Однослойный цилиндрический ворсинчатый	100	часы
Толстая кишка	Однослойный цилиндрический складчатый	0,5 - 1,0	часы
Прямая кишка	Однослойный цилиндрический; однослойный плоскоклеточный; многослойный плоскоклеточный	0,04 - 0,07	часы
Полость носа	Многослойный мерцательный	0,01	определяется продолжительностью экспозиции
Бронхи и альвеолы	Однослойный цилиндрический; однослойный плоскоклеточный	70	определяется продолжительностью экспозиции

В таблице 1.4.– приведены термины, обозначающие некоторые способы введения лекарственных средств в организм. Такими путями могут проникать и другие ксенобиотики.

Основным механизмом энтерального и перорального (дигестивного) поступления является пассивная диффузия веществ через эпителий желудочно-кишечного тракта.

Некоторые ксенобиотики поступают в организм при помощи активного транспорта. Таким способом, например, проникают гликозиды, среди которых немало высокотоксичных веществ (амигдалин, дигитоксин, буфотоксин и др.). Токсичные белки и пептиды – эндоцитозом.

Таблица 1.4 – Способ введения лекарственных средств в организм человека

Способ введения	Область поступления
Парентеральный	Путь введения, при котором лекарственное средство минует желудочно-кишечный тракт, это прежде всего инъекции, а также электрофорез, лазерофорез.
Энтеральный	Путь введения лекарства через желудочно-кишечный тракт:
Пероральный	Прием лекарства через рот путем проглатывания
Сублингвальный	Приём определённого лекарства путём размещения его под языком до полного рассасывания
Трансбуккальный	Приём определенного лекарства путем размещения его между слизистой внутренней поверхности щеки и десен с зубами (в щечном пространстве) до полного рассасывания
Ректальный	Путь введения лекарства в просвет прямой кишки через анус с целью его абсорбции слизистой прямой кишки

Резорбция в ротовой полости

Эпителий полости рта не представляет собой значительной преграды на пути ксенобиотиков. В резорбции участвуют все отделы ротовой полости. Площадь поверхности невелика, но слизистая хорошо снабжается кровью.

Растворы лучше резорбируются, чем взвеси. Раствор обволакивает всю поверхность полости, покрывая ее слизистой пленкой. Взвеси имеют меньшую площадь контакта с поверхностью слизистой и плохо всасываются.

В отличие от других способов проникновения через слизистые желудочно-кишечного тракта, при резорбции в ротовой полости, всосавшиеся вещества распределяются в организме минуя печень, что сказывается на биологической активности быстро метаболизирующих соединений.

Резорбция в желудке

В целом ксенобиотики плохо всасываются в желудке.

В основе резорбции лежит механизм простой диффузии. Специальные переносчики именно ксенобиотиков в слизистой не обнаружены.

Скорость процесса в значительной степени определяется коэффициентом распределения веществ в системе масло/вода. Жирорастворимые (или растворимые в неполярных органических растворителях) соединения достаточно легко проникают через слизистую желудка в кровь.

Определяющий фактор всасывания – кислотность желудочного содержимого. Резорбция в желудке осуществляется из среды с низким значением pH в слабощелочную. В этой связи эпителий слизистой (мембраны клеток) формирует своего рода липидный барьер между водными фазами: кислой (pH желудочного сока $\approx 1,5 - 2,0$) и щелочной (pH крови 7,4). Этот барьер вещества могут преодолеть в форме незаряженных молекул.

Резорбция в кишечнике

Кишечник является одним из основных мест всасывания химических веществ. Некоторые характеристики слизистой тонкого кишечника представлены в таблице 1.5.

Таблица 1.5 – Количественные характеристики слизистой тонкого кишечника.

Структуры	Количественные характеристики	Площадь поверхности (м ²)
Тонкая кишка	Длина - 4000 мм Диаметр - 25 мм	0,3
Складки слизистой	Высота - 8 мм Количество - 650	1,0
Крипты	Высота - 1 мм Диаметр - 0,16 мм Количество 10 млн	6,0

Ворсинки	Высота - 1 мкм Диаметр - 0,1 мкм Количество - $3 \cdot 10^{14}$	100
----------	---	-----

Перистальтика тонкого кишечника обеспечивает перемешивание содержимого, вследствие чего поддерживается высокая концентрация веществ на границе контакта гумуса с клетками слизистой оболочки.

Субстраты (глюкоза, аминокислоты, электролиты, нуклеотиды и т.д.) резорбируются в кишечнике посредством активного транспорта.

Ксенобиотики - структурные аналоги субстратов, (5-фторурацил, ксилит, аналоги аминокислот и др.), а также гликозиды (амигдалин, дигитоксин, буфотоксин и др.) могут поступать в организм с помощью этих же транспортеров.

Основным является механизм пассивной диффузии. Пассивная диффузия в кишечнике – дозозависимый процесс. При увеличении содержания ксенобиотика в кишке увеличивается и скорость его всасывания, но при сохранении процента всосавшегося вещества.

Все отделы кишечника принимают участие в резорбции ксенобиотиков. В среднем период "полувсасывания" веществ у крысы в тонкой кишке составляет около 5 минут.

Для веществ, поступающих перорально, время пребывания в желудке в целом отсрочивает резорбцию в кишечнике, поэтому решающее значение имеет скорость перехода веществ из желудка в двенадцатиперстную кишку.

Холодные растворы быстрее покидают желудок. В этой связи холодные растворы ксенобиотиков–токсикантов порой оказываются более токсичными, чем теплые.

Резорбция в толстой кишке происходит сравнительно медленно. Этому способствует как меньшая площадь поверхности слизистой этого отдела, так и более низкая, в сравнении с вышележащими отделами, концентрация веществ в просвете кишки.

Микрофлора кишечника может вызвать биотрансформацию ксенобиотика

Например, инициируемый кишечной флорой процесс восстановления нитратов до нитритов особенно у грудных детей приводит к тому, что образующиеся ионы NO_2^- проникают в кровь и вызывают быстрое образование метгемоглобина со всеми вытекающими пагубными последствиями.

Ингаляционное поступление

Кроме вдыхаемого кислорода в кровоток через легкие могут легко проникать и другие вещества, находящиеся в газообразном или парообразном состоянии, даже порошкообразном состоянии (например, стиральные порошки и др.)

Благоприятным условием всасывания веществ является большая площадь поверхности легких, составляющая у взрослого человека в среднем 70 м², у четырехлетнего ребенка - 22 м².

При ингаляции аэрозолей глубина проникновения в дыхательные пути зависит от размера частиц.

Аэрозоли представляют собой фазовые смеси, состоящие из воздуха и мелких частиц жидкости (туман) или твердого вещества (дым). Обычно размеры частиц в аэрозоли колеблются от 0,5 до 15 мкм. Чем крупнее частицы, тем относительно выше концентрация в воздухе распыляемого вещества.

Глубокому проникновению частиц в дыхательные пути препятствует их седиментация на слизистые оболочки. Крупные частицы накапливаются на слизистой верхних отделов дыхательных путей, средние – в более глубоких отделах, мельчайшие – могут достичь поверхности альвеол. Продвижение газов по дыхательным путям сопряжено с их частичной адсорбцией на поверхности трахеи и бронхов.

Возможность депонирования ингалируемых газов определяется степенью их растворимости в тонком слое жидкости, выстилающей слизистую дыхательных путей и альвеолярный эпителий (легочный сурфактант). Чем хуже растворяется вещество в воде, тем глубже проникает оно в легкие.

Способность многих химических веществ переходить из одного агрегатного состояния в другое и локализоваться вследствие этого в разных средах, порой затрудняет предсказание, каким будет основной способ резорбции ксенобиотика. Например, многие летучие вещества, способные поступать ингаляционно, хорошо растворяются в воде и связываются с продуктами питания, следовательно, могут поступать различными путями (! боевые отравляющие вещества: иприт, люизит, зоман; металлы и их соединения и т.д.).

Лекарственные препараты вводятся в организм и другими способами: через слизистые глаз и носовой полости; инъекционным, нозальным, ректальным, вагинальным, с помощью ультразвука, электрофоретическим, лазерофоретическим, и др.

Поступление ксенобиотика в кровь и распределение по органам и тканям

После всасывания ксенобиотика поступают в кровь, распределяются кровью (лимфой, межклеточной жидкостью) по органам и тканям, подвергаются биотрансформации и выводятся из организма (рисунок 1.12).

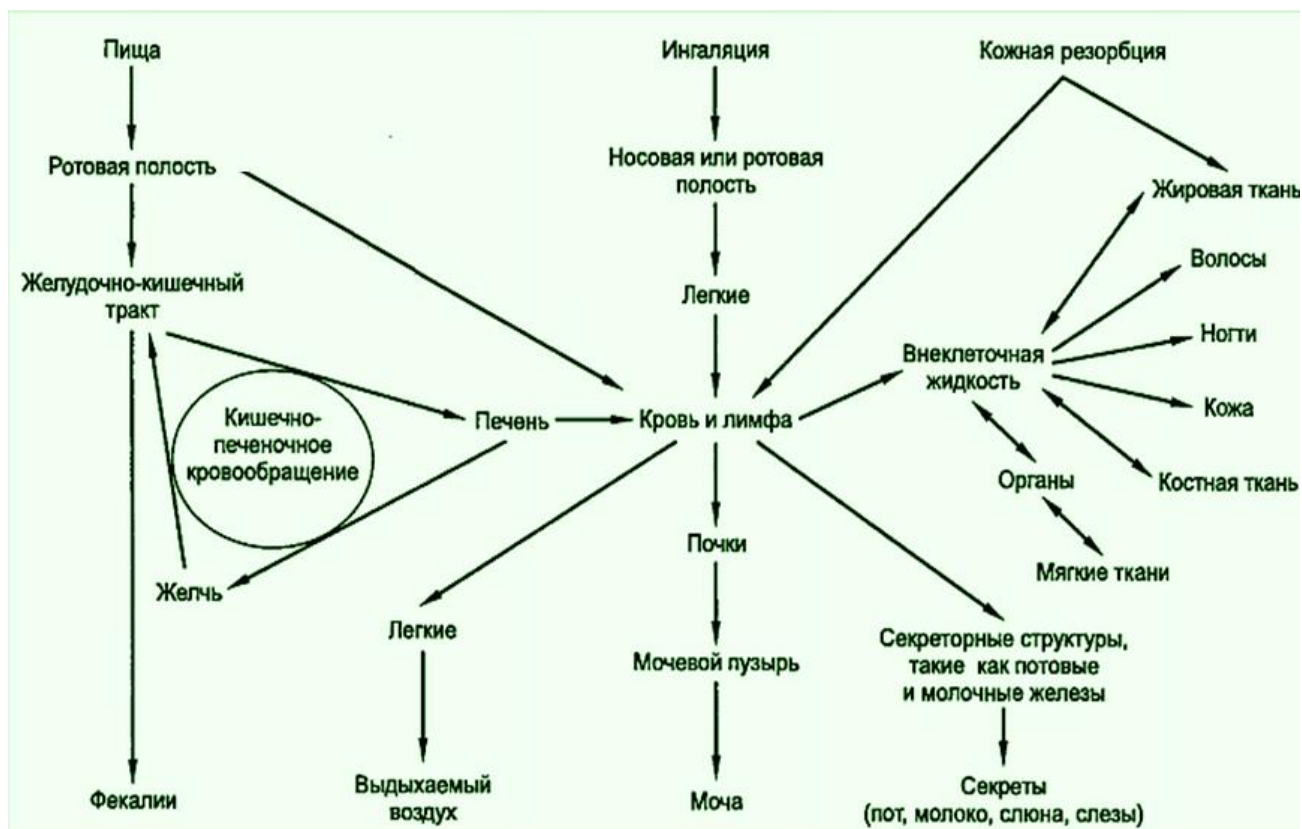


Рисунок 1.12 – Пути поступления ксенобиотиков в организм, распределение в органах и тканях, и выведение из организма.

Поступившие в кровь ксенобиотики транспортируются к органам и тканям в свободной и связанной формах. Способностью связывать ксенобиотики обладают альбумины, гликопротеины (кислый α_1 -гликопротеин) и липопротеины плазмы крови.

α_1 -Гликопротеины являются индуцируемыми белками, связывая ксенобиотики, они их переносят в печень, где комплекс с белком распадается, чужеродные вещества биотрансформируются и выводятся из организма.

Альбумины – основные белки плазмы крови, связывающие различные гидрофобные вещества, могут функционировать в качестве белков-переносчиков билирубина, ксенобиотиков, лекарственных веществ.

На молекуле альбумина выделяют 6 основных центров связывания ксенобиотиков. Центры отличаются друг от друга:

- неодинаковым сродством к веществам с различными значениями константы pK_a ,
- механизмами взаимодействия с ксенобиотиками,
- различной кривой насыщения связи,
- количеством на молекуле белка,
- величинами константы диссоциации комплекса белок-ксенобиотик.

Например, центр связывания 1-го типа содержит две различные акцепторные области (ареала). С ним взаимодействуют такие вещества как

варфарин, бензодиазепины. На 1 молекулу альбумина приходится 1–3 центра связывания 1-го типа. Физиологическая функция альбуминов состоит в связывании свободных жирных кислот и билирубина, поэтому количество этих веществ, циркулирующих в крови, может влиять на процесс взаимодействия белков с ксенобиотиками. Так, жирные кислоты ослабляют связывание гликозидов или бензодиазепинов, а билирубин влияет на фиксацию варфарина и т.д.

α_1 -Гликопротеины – кислые белки, поэтому присоединяют молекулы, обладающие свойствами слабых оснований. Из-за невысокой концентрации α_1 -гликопротеинов в плазме крови в процессе связывания химических веществ быстро наступает насыщение.

Липопротеины (любой плотности) прежде всего связывают жирорастворимые вещества. Основной центр связывания - липидный фрагмент структуры.

В основе взаимодействия ксенобиотиков с белками лежит образование между ними слабых гидрофобных, водородных и ионных связей, реже ковалентных. Связанные соединения приобретают характеристики распределения, свойственные белкам. Ковалентные связи белок–ксенобиотик затрудняют отток вещества в ткани.

Факторы, влияющие на процессы резорбции ксенобиотика в кровь

1. Свойства организма:

- морфология органа, через который осуществляется резорбция;
- площадь резорбирующей поверхности;
- кровоснабжение органа;
- наличие патологии органа;
- пол, возраст, масса тела и т.д.

2. Характеристика ксенобиотика:

- молекулярная масса;
- химическое строение;
- конформация;
- физико-химические свойства (агрегатное состояние, растворимость, заряд молекулы).

3. Модифицирующие факторы:

- абиотические факторы среды (температура, влажность воздуха и т.д.);
- форма воздействия (раствор, пар, аэрозоль);
- степень наполнения желудка и кишечника;
- состояние кожных покровов.

4. Количественные характеристики:

- продолжительность контакта с веществом;
- концентрация;
- доза.

Снижение токсичности веществ в крови.

Снижение токсичности вещества в крови происходит за счет пассивных и активных процессов.

Пассивное обезвреживание:

- за счет разведения вещества кровью,
- за счет связывания с липопротеинами, белками плазмы и др., что снижает возможность проникновения в ткани и облегчает выведение из организма.

Некоторые вещества могут надолго задерживаться в крови. Например, положительно заряженные ксенобиотики способны адсорбироваться на отрицательно заряженной мембране эритроцитов и находиться на мембране вплоть до конца жизни эритроцита, изменять свойства плазматической мембраны, а также разрушать ее и вызывать гемолиз.

Липофильные вещества проникают через эритроцитарную мембрану и взаимодействуют с гемоглобином. Связавшийся с гемоглобином ксенобиотик не всегда диффундирует из клетки, он может длительно циркулировать в крови и высвободится при отмирании эритроцита и деградациии гемоглобина, может вызвать образование в эритроците включений Гейнца. Основными веществами, под воздействием которых в эритроцитах появляются тельца Гейнца, являются окислители гемоглобина. К ним относятся токсичные вещества: анилин и его производные, нитробензол, нитрофенол, фенилгидразин, пиридин, бертолетова соль, тринитротолуол и др. Вещества, разрушающие эритроциты - гемолитики (мышьяковистый водород, нафталин, фенилгидразин и др.)

Тельца Гейнца-Эрлиха — маленькие округлые включения пурпурно-красного цвета размером 1–2 мкм, образуются из денатурированного и агрегированного гемоглобина, появляются при гемолизе и токсическом поражении крови.

Активное обезвреживание происходит с помощью ферментов плазмы и клеток крови (путем микросомального окисления и образования конъюгатов; работы аминooksидаз, алкогольдегидрогеназы, холинэстеразы и др.).

Поступление ксенобиотика в ткани

Обычная судьба резорбируемых во внутренние среды организма веществ представляется так: всасывание с мест аппликации; попадание в кровь и лимфу; перенос в интерстициальную (межклеточную) жидкость; затем в клетки органов и тканей.

Скорость поступления вещества в орган зависит от его кровоснабжения, которое определяется: площадью капиллярного русла, объемной скоростью кровотока, массой органа, организацией эндотелия капиллярного русла. Например, структурами гематоэнцефалического, плацентарного барьеров.

Направленность процесса распределения ксенобиотика определяется градиентом его концентрации во внешней среде, на месте аппликации, в крови и тканях. Чаще распределение ксенобиотика носит неравномерный характер. Например, при интоксикации диэтиламидом лизергиновой кислоты (ДЛК, ЛСД): менее 1% вещества поступает в мозг, но именно нарушения ЦНС под влиянием этого количества яда составляют основное содержание

интоксикации. Выраженность токсического эффекта пропорциональна концентрации ксенобиотика в месте действия на биологически значимые мишени. Сравнительная характеристика скорости кровотока в различных органах человека массой 70 кг представлена в таблице 1.6.

В распределении поступившего чужеродного вещества выделяют две фазы – динамическое и статическое распределение.

Динамическое распределение зависит от объема и скорости кровотока в тканях и органах. Статическое – от способности тканей и органов накапливать вещество в бóльших количествах, чем в крови. В первую фазу (резорбция) ксенобиотик в максимальной концентрации находится в крови, а во вторую – в тканях.

Таблица 1.6 – Скорость кровотока и масса органов человека.

Органы	Скорость кровотока (мл/мин)	Скорость кровотока (в %)	Масса органа (в г)	Масса органа (в %)
Органы брюшной области (желудочно-кишечный тракт, печень, селезенка)	1400	24	2800	4,0
Скелетные мышцы	1200	21	30 000	43,0
Почки	1100	19	300	0,4
Головной мозг	750	13	1500	2,0
Кожа	500	9	5000	7,0
Сердце	250	4	300	0,4

Из крови гидрофильные ксенобиотики в первую очередь попадают в органы, богато снабжаемые кровью. Липофильные вещества – концентрируются на оболочках эритроцитов или захватываются липопротеинами плазмы, а затем постепенно переносятся в ткани. Сосудистую стенку химические вещества преодолевают разными способами (рисунок 1.13).

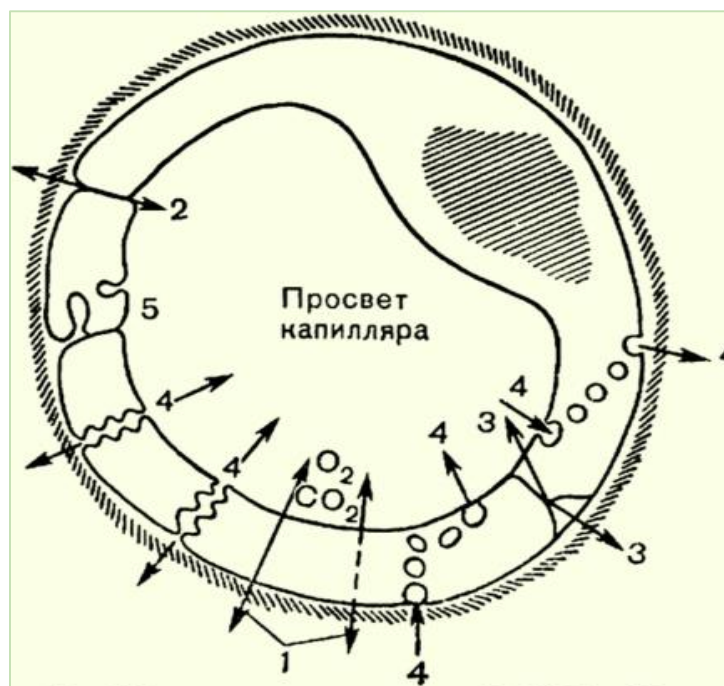


Рисунок 1.13 – Способы преодоления химическими веществами сосудистой стенки капилляров. 1 – прямой путь через эндотелиальную клетку; 2 – через межэндотелиальные промежутки; 3 – комбинированный путь с помощью диффузии; 4 – везикулярный путь; 5 – комбинированный путь через межэндотелиальные промежутки и с помощью везикулярных процессов.

В органах и тканях стенки капилляров имеют различные структурно-функциональные свойства, а следовательно, и различную проницаемость для химических веществ.

В тканях происходит извлечение веществ из клеток эндотелия капилляров и их проникновение внутрь клеток ткани. Богатые липидами ткани и органы сорбируют жирорастворимые вещества. Липофильные ксенобиотики довольно быстро депонируются в жировой ткани, откуда они вновь могут десорбироваться в кровь. В дальнейшем перераспределение ксенобиотиков по тканям происходит в соответствии с такими свойствами, как:

- наличие специальных механизмов захвата веществ;
- высокое содержание структур, связывающих ксенобиотик;
- соотношение липидов и воды в органе или ткани.

Различия в кровоснабжении могут обусловить неравномерность распределения ксенобиотика внутри органа. К примеру, через капиллярную сеть серого вещества мозга протекает примерно в 5 раз больше крови, чем через капилляры белого вещества. Поэтому при острых отравлениях этиловым спиртом содержание этанола, как вещества хорошо растворимого в воде, гораздо больше поступает в кору головного мозга, по сравнению с другими отделами нервной системы.

Некоторые вещества избирательно накапливаются в том или ином органе, ткани, клетках определенного типа. Депонирование – накопление и длительное

сохранение химического вещества в относительно высокой концентрации в одном или нескольких органах (или тканях) является важным элементом распределения в организме некоторых ксенобиотиков.

Различные ксенбиотики могут образовывать с биомолекулами ковалентные связи и таким образом накапливаться в тканях, приводить к мутациям, например, афлатоксины. Толуол хорошо абсорбируется из желудочно-кишечного тракта и легких, быстро депонируется в мозге и в других тканях, богатых липидами. Стронций и свинец – металлы, в известном отношении близкие кальцию, при поступлении в организм они первоначально накапливаются в паренхиматозных органах. Однако поскольку кальций подвержен постоянному обмену, Sr и Pb постепенно замещают его в тканях и в соответствии с химическим сродством депонируются преимущественно в костях. Мышьяк вследствие высокого сродства к кератину депонируется в ногтях, волосах.

Многие ксенобиотики хорошо растворимы в липидах и могут накапливаться в биологических мембранах клеток органов и тканей, в жировых депо, например, полициклические ароматические углеводороды, пестициды, некоторые хлорорганические вещества.

Тканевые депо, собирая ксенобиотик в одной ткани, защищают от него внутреннюю среду организма и способствуют сохранению гомеостаза. Однако если ксенобиотик пролонгированно поступает и задерживается в депо надолго, его концентрация с течением времени значительно возрастает и отравляющее действие усиливается, и из хронического может перейти в острое. Ряд ксенобиотиков депонируются в тканях настолько прочно, что выведение их из организма существенно затруднено или практически невозможно. Например, период полуэлиминации кадмия из организма человека составляет 15-20 лет и более.

Таким образом, на процесс перехода ксенобиотика из крови в ткани (и наоборот) влияют следующие структурно-функциональные особенности органов:

- свойства стенок их капиллярного русла;
- степень васкуляризации и интенсивность кровоснабжения органов;
- свойства клеток, формирующих орган, и особенно клеточных мембран;
- кислотно-основные свойства тканей;
- степень сродства молекулярных элементов тканей к ксенобиотику.

На характер распределения ксенобиотиков в организме, кроме того, оказывают влияние вид животного, его пол, возраст и др.

1.6. Организация системы биотрансформации ксенобиотиков

Каждый организм обладает системой биотрансформации чужеродных соединений, которая лежит в основе обеспечения защитно-приспособительных

механизмов, переводящих химическое вещество в форму удобную для выведения из организма, и тем самым, сокращение времени его действия.

В основе биотрансформации, как правило, лежат ферментативные способы преобразования молекул.

Биотрансформация ксенобиотиков в животном организме осуществляется практически во всех тканях, однако основными органами являются печень, почки, эпителий желудочно-кишечного тракта, легкие, мозговая ткань.

После проникновения в организм ряд гидрофильных ксенобиотиков выводится из организма в неизменном виде, но большая их часть выделяется только после метаболических превращений, которые, в основном включают две фазы: фазу I – модификацию, и фазу II – конъюгацию. В первой фазе происходит превращение молекулы ксенобиотика, в результате которого образуются или освобождаются функциональные группы (-OH, -NH₂, -SH, -NO₂), и вещество становится полярным. Окислительные процессы, осуществляемые в I фазе, идут с потреблением кислорода и сопровождаются появлением активных форм кислорода, в обезвреживании которых принимает участие антиоксидантная система. Во второй фазе модифицированные ксенобиотики вступают в синтетические реакции с эндогенными субстратами с образованием конъюгатов, последние выводятся из организма (рисунок 1.14).



Рисунок 1.14 – Фазы биотрансформации.

Реакции конъюгации идут с затратой энергии, поэтому биотрансформация ксенобиотиков в клетке (организме) сопряжена с биоэнергетическими процессами.

Система обезвреживания липофильных ксенобиотиков можно представить следующим образом (рисунок 1.15).

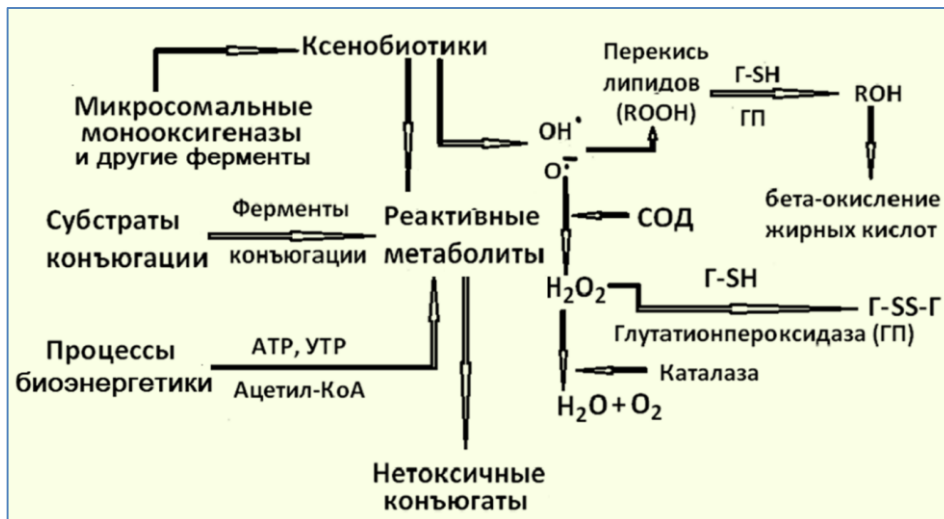


Рисунок 1.15 – Общая схема биотрансформации липофильных ксенобиотиков.

1.6. I Фаза биотрансформации

Многообразие ферментов, участвующих в I фазе биотрансформации, и их низкая субстратная специфичности способна подвергать метаболическим превращениям огромное разнообразие чужеродных химических веществ. Многие из ферментов существуют в нескольких формах (изоферменты), различающихся по своим физико-химическим свойствам (молекулярной массе, электрофоретической подвижности, абсорбции света с разными длинами волн), отношению к индукторам и ингибиторам, активностью в отношении субстратов различного строения.

Энзимы I фазы, участвующие в процессе биотрансформации ксенобиотиков, можно классифицировать в соответствии с типом активируемой ими реакции, например: оксидазы, монооксигеназы; простогландинсинтетазы, гидропероксидазы и др.; алкогольдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы; флавопротеинредуктазы; эпоксидгидролазы; эстеразы и амидазы и др.

В I фазе биотрансформации выделяют микросомальное и немикросомальное превращение веществ. По типу реакций это – *окисление, восстановление, гидролиз*.

Окисление

Важнейшим механизмом биотрансформации в I фазе метаболизма является окисление ксенобиотиков в микросомах при участии цит.Р-450. Так,

изоферменты цит.Р-450 способны осуществлять следующие реакции окисления:

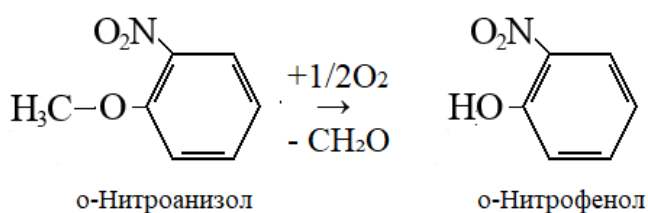
- деалкилирование гетероатомов (O-, S-, N-, Si-),
- гидроксилирование алифатических и ароматических углеводородов;
- эпексидирование двойной связи;
- окисление гетероатомов (O-, S-, N-, Si-)
- N-гидроксилирование;
- окислительный перенос группы;
- разрыв сложноэфирной связи;
- дегидрирование, дегалагенирование и др.

Реакции деалкилирования. N-деалкилирование, чаще всего деметилирование, является основным способом метаболизма вторичных и третичных аминов:

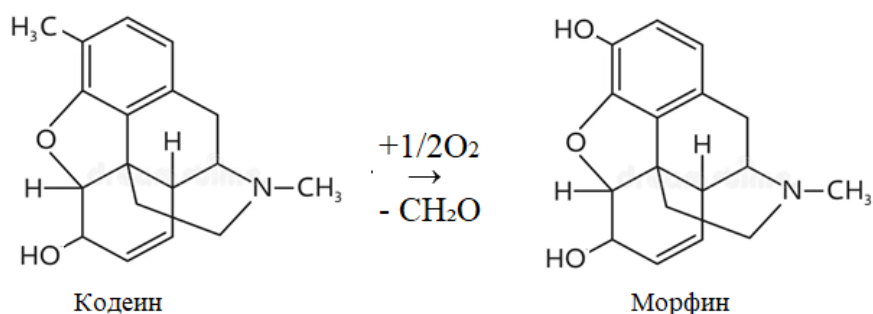


В результате реакции образуются очень токсичные продукты – формальдегид при деметилировании и ацетальдегид при дезетилировании.

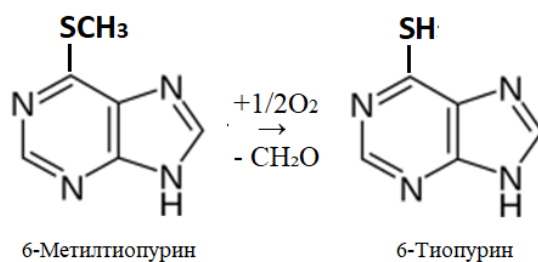
В результате O-деалкилирования из o-нитроанизола образуется o-нитрофенол:



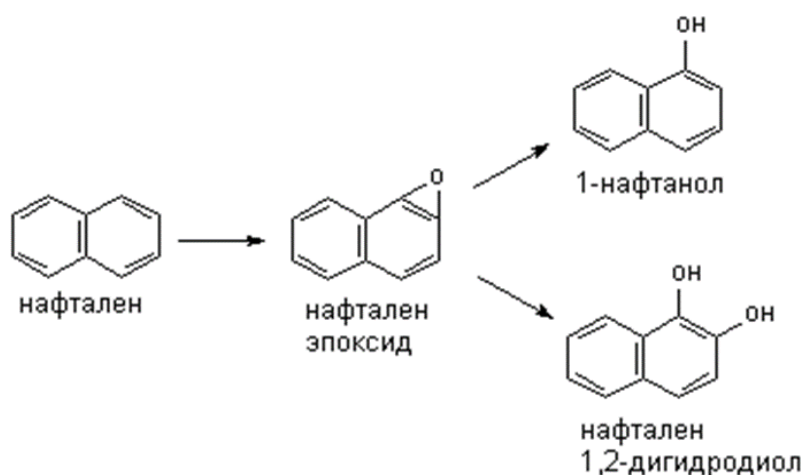
А из кодеина образуется морфин, на этом основано обезболивающее действие кодеина:



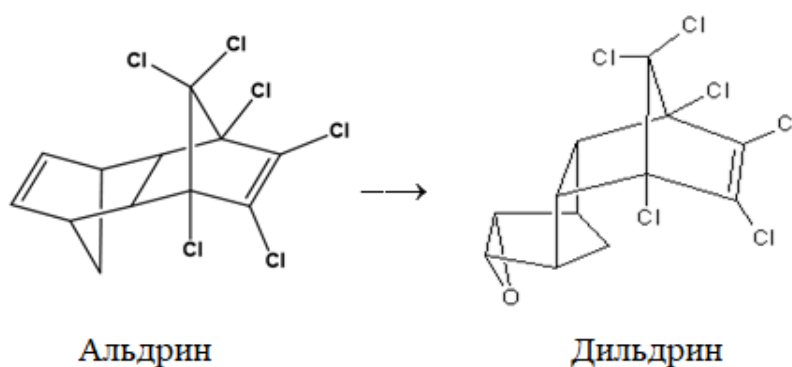
Примером S-деалкилирования является реакция деметилирования 6-метилтиопурина, в результате которой образуется 6-тиопурин:



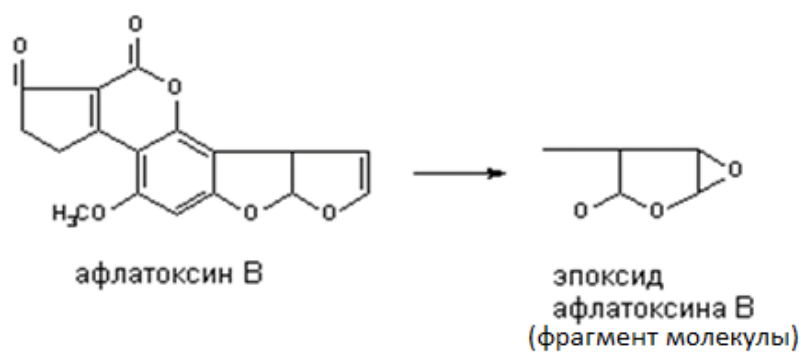
Эпоксидирование и гидроксилирование ароматических соединений. Такой способ биотрансформации характерен для полициклических и ароматических углеводородов. Процесс сопровождается образованием реакционно-активных промежуточных продуктов метаболизма, в частности ареноксидов, способных вызывать некроз клеток и являющихся канцерогенами. Таким образом осуществляется, в частности, превращение бенз(а)пирена или нафталена:



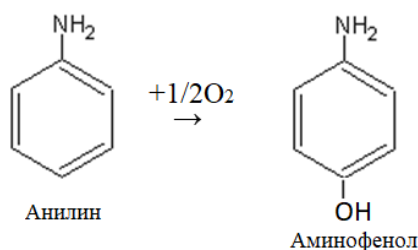
Эпоксидирование алифатических и алициклических соединений. Алифатические и алициклические соединения, содержащие в молекуле непредельные связи метаболизируют с образованием чрезвычайно стабильных эпексидов, например превращение альдрина в дильдрин:



Такое же превращение лежит в основе образования канцерогенных продуктов метаболизма афлатоксинов:



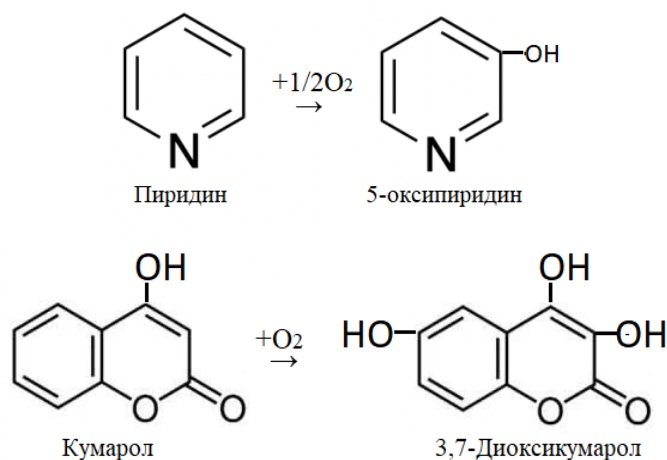
Реакции гидроксилирования. Гидроксилированию могут подвергаться циклические ароматические углеводороды – анилин окисляется до аминифенола:



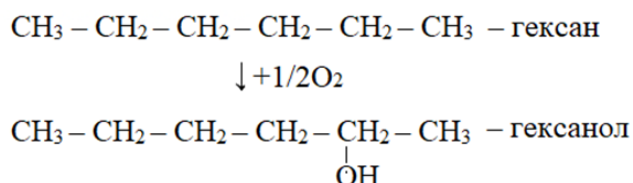
Гидроксилирование циклических предельных углеводородов можно рассмотреть в реакциях превращения циклогексана в циклогексанол, а, затем циклогексанола в циклогексан-1,2-диол:



Гетероциклические углеводороды пиридин и кумарол гидроксилируются в 5-оксипиридин и 3,7 диоксикумарол соответственно:

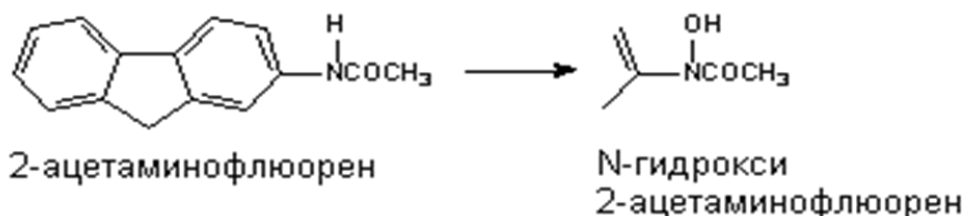


Гидроксилирование алифатических соединений. Гидроксилированию подвергаются предельные углеводороды. Особенностью этих реакций является то, что они не протекают по первому углеродному атому:

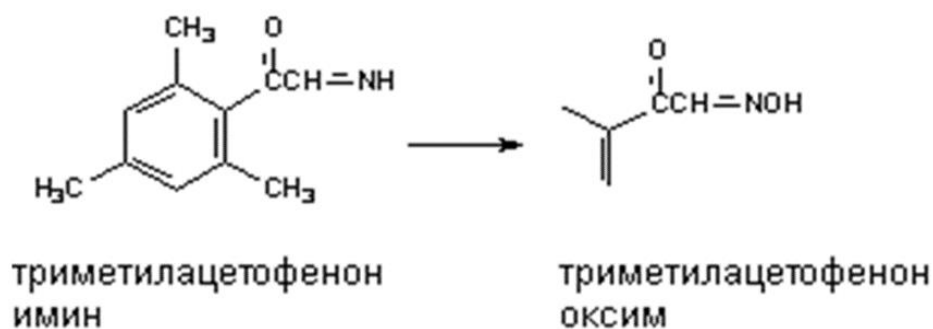


Аналогичная биотрансформация характерна для алкильных боковых цепей циклических и гетероциклических соединений. Так, гексобарбитал в зависимости от того, какой атом углерода окисляется в этильной боковой группе, образует либо α -, либо β -оксибарбитал.

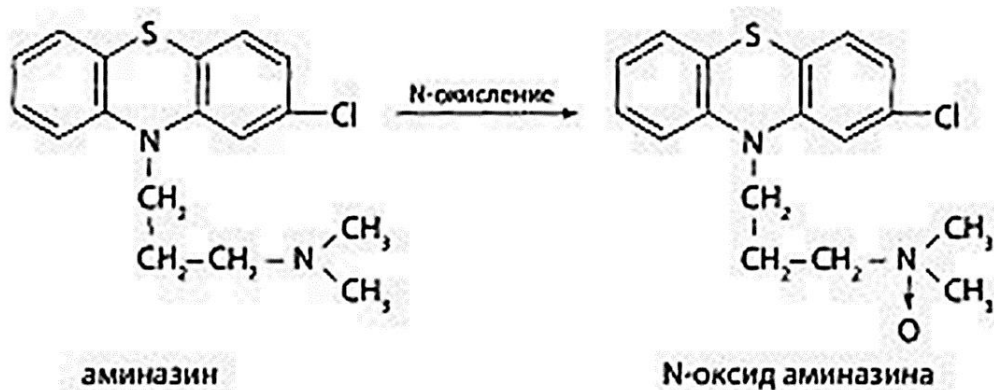
N-окисление, или N-гидроксилирование. Такому типу превращений могут подвергаться анилин и его производные, ацетаминофлюорен и др. В результате окисления атома азота могут образовываться гидроксиламины, оксимы и N-оксиды:



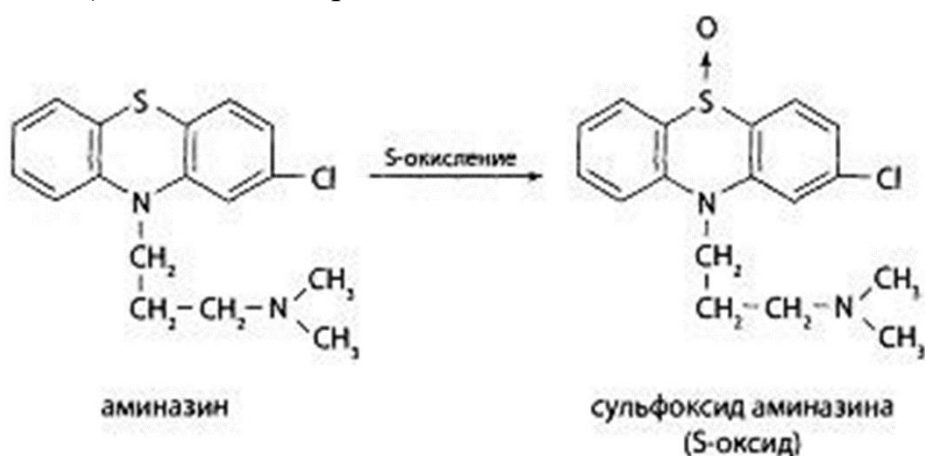
Оксимы образуются в процессе гидроксилирования иминов или первичных аминов:



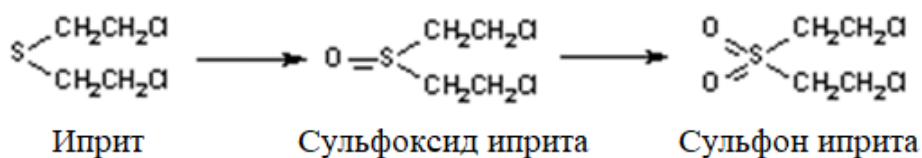
В результате N-окисления азота в боковой группе хлорпромазина (торговое название – аминазин), образуется N-оксид:



При участии цитохрома Р-450 и других монооксигеназ окисляются тиоэфирные связи в молекулах таких ксенобиотиков, как альдикарб, метиокарб (моллюскоциды), аминазин и др.:



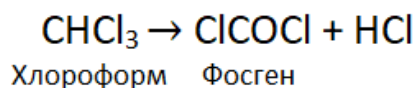
Этот тип модификации характерен также для сернистого иприта, в результате реакций образуются сульфоксид и сульфон иприта:



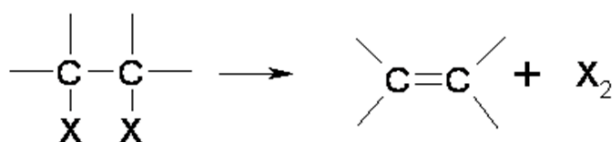
В природе сульфоны встречаются достаточно редко. В крови и надпочечниках некоторых животных обнаружен диметилсульфон.

В реакции элиминирования вступают галогенированные ксенобиотики. Дегалогенирование также осуществляется в микросомах и может протекать тремя путями:

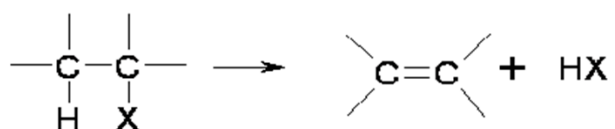
1) окислительное дегалогенирование:



2) двойное дегалогенирование:



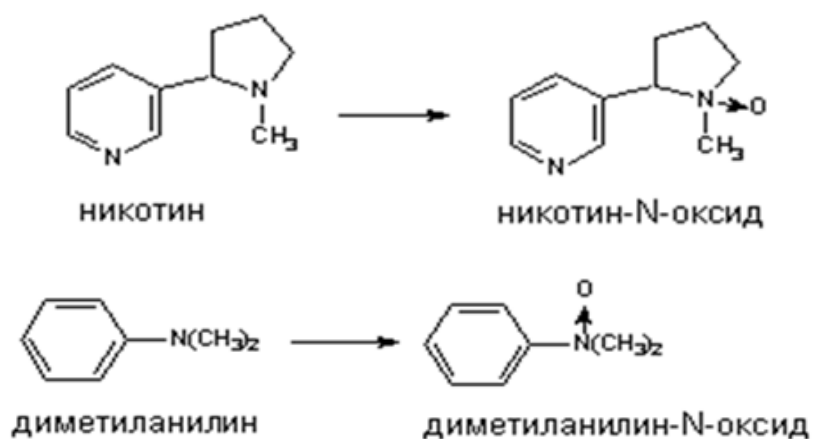
3) дегидрогалогенирование:

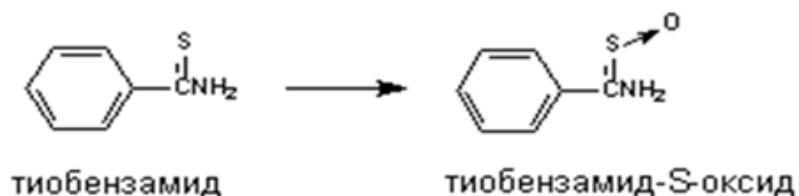


В реакциях окисления чужеродных соединений активное участие принимают флавиносодержащие монооксигеназы, они также локализируются в эндоплазматическом ретикулуме и окисляют молекулы, содержащие нуклеофильные гетероатомы азота, серы, фосфора или селена, но не физиологически эссенциальные нуклеофилы. Простетической группой флавиновых монооксигеназ является ФАД. Фермент использует НАДФН и молекулярный кислород, чаще всего катализируя образование монооксигенированных субстратов, и как побочных продуктов реакции – НАДФ⁺ и воды,

Многие из субстратов флавиномонооксигеназ одновременно являются субстратами цит. Р-450 и служат самой важной составляющей I фазы биотрансформации ксенобиотиков. В отличие от цит. Р-450 флавиносодержащие монооксигеназы обычно не индуцируются и не ингибируются ксенобиотиками, образуют различные метаболиты, отличающиеся по химическим и токсикологическим свойствам.

В качестве примера реакций, катализируемых флавиномонооксигеназами, можно привести следующие:





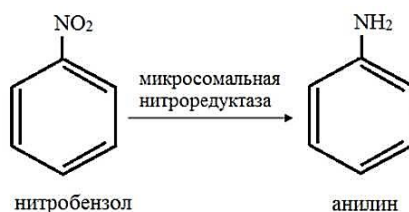
Большую роль в окислении чужеродных соединений играют реакции, катализируемые дегидрогеназами. Процесс дегидрирования ксенобиотиков в организме проходит в митохондриях и цитозоле. Такому превращению подвергаются многочисленные спирты и альдегиды при участии алкоголь- и альдегиддегидрогеназ, и др. (см. далее). Ферменты метаболизма спиртов наиболее активны в печени, почках, легких. Процесс дегидрирования лежит в основе превращений целого ряда ароматических соединений. Так, в ходе метаболизма бензойной кислоты образуется гипшуровая кислота, энзимы локализуются в митохондриях.

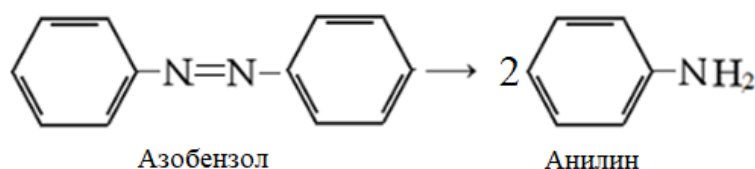
При окислительной биотрансформации ксенобиотиков могут образовываться более токсичные, канцерогенные или мутагенные соединения. Это, например, происходит при деградации некоторых азотсодержащих пестицидов, которые легко превращаются в высокомутагенные и канцерогенные соединения.

Восстановление

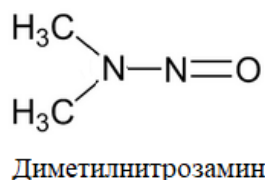
В тканях содержатся ферменты, восстанавливающие молекулы некоторых ксенобиотиков. К их числу относятся нитроредуктазы (восстанавливают нитраты до нитритов), нитрозоредуктазы (превращают нитрогруппы NO_2^- в аминогруппы), азоредуктазы (активируют восстановительное расщепление азогрупп с образованием первичных аминогрупп), дегалогеназы (контролируют восстановительное дегалогенирование, например гексахлорана, ДДТ и др.). Восстанавливаются также некоторые металлы, альдегиды, кетоны, дисульфиды, сульфоксиды, хиноны, алкены. Коферментами в этих реакциях выступают $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ и $\text{НАДФ}^+/\text{НАДФН}$; (ФАД/ФАДН₂).

Восстановление азо- и нитросоединений осуществляют цит.Р-450, НАДФН-хиноноксиредуктазы. Целый ряд ароматических нитросоединений, например нитробензол, паранитробензойная кислота и хлорамфеникол, восстанавливаются в соответствующие амины:



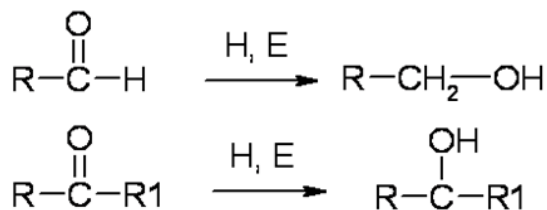


Также могут образовываться продукты, содержащие гидроксиамино- или нитрозогруппы:



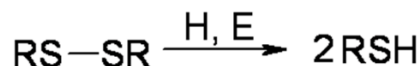
Образование нитрозосоединений представляет большую опасность как для организма, так и для биосферы. Эти соединения обладают сильным мутагенным и/или канцерогенным действием. Например, при биотрансформации гербицида трифлуралина получается нитрозосоединение, характеризующееся канцерогенным действием.

Восстановление альдегидов и кетонов в спирты осуществляется алкогольдегидрогеназой и карбонильными редуктазами:

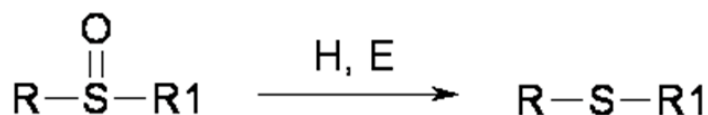


В тоже время ацетон может прямо вовлекаться в цикл аэробного метаболизма через ацетоацетат и ацетил-КоА;

Восстановление дисульфидов (R-S-S-Rj), например, под действием глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы или неферментативно происходит с образованием тиолов:



Восстановление сульфоксидов осуществляет цит.Р-450:



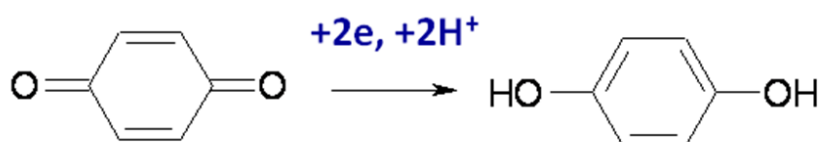
В восстановительных реакциях принимают участие флавопротеинредуктазы. Они катализируют реакции восстановления редоксинов, участвуют в метаболизме некоторых ксенобиотиков. В частности,

превращают хиноны, что приводит к генерации свободных радикалов в клетках. Продукты превращения хинонов могут переносить электроны на молекулярный кислород, это сопровождается регенерацией исходного субстрата и инициацией образования каскада кислородных радикалов:

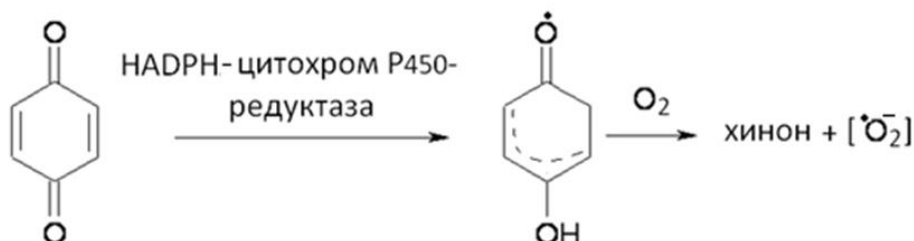


Помимо хинонов по такому механизму метаболизируют нитроароматические соединения, биспиридины и др.

Реакции восстановления хинонов осуществляет НАДФН-хиноноксидоредуктаза цитозоля, для ее работы в качестве кофермента необходим флавопротеин, фермент работает в отсутствие кислорода:



В результате функционирования микросомальной НАДФН-цитохром Р450 редуктазы происходит образование семихинона и далее хинона и супероксида:



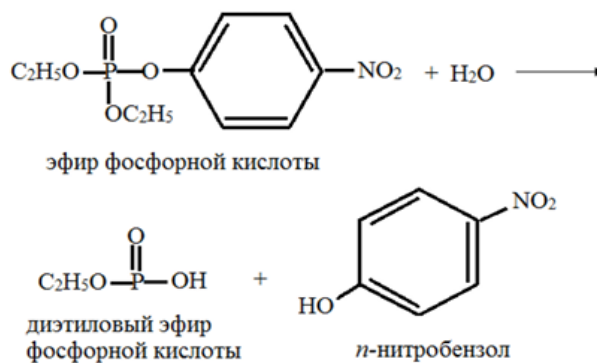
Восстановление чужеродных субстратов осуществляют также дегидроксилазы. В результате этих реакций от органического соединения отщепляется гидроксильная группа (-ОН). В более общем случае происходит процесс удаления гидроксильных групп из молекулы, приводящий к образованию H_2O и другого органического соединения.

Ферменты анаэробных микроорганизмов восстанавливают ароматические циклы.

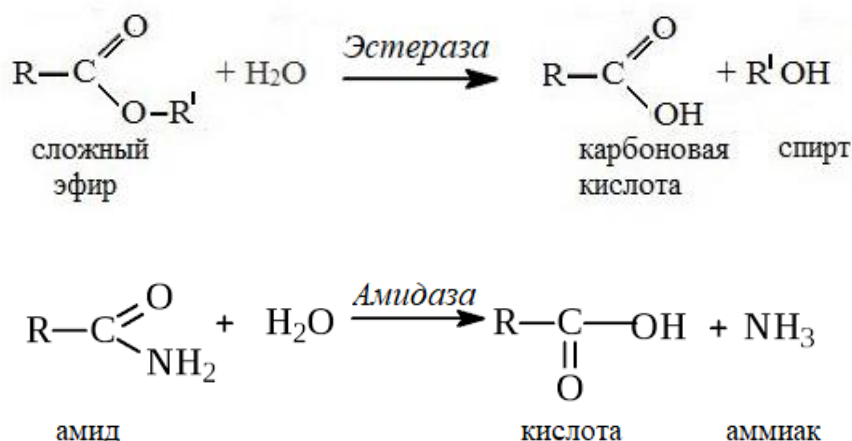
Гидролиз

Гидролиз эфиров карбоновых кислот катализируют эстеразы, они низкоспецифичны (исключение синаптическая ацетилхолинэстераза) и обеспечивают гидролиз эфиров различного строения. К ним относятся:

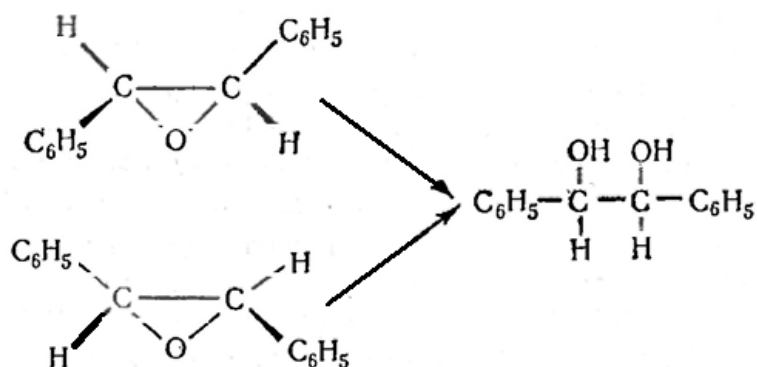
- арилэстеразы гидролизуют ароматические эфиры, например, эфиры фенолов и карбоновых кислот. Они также известны как А-эстеразы. Один из наиболее изученных представителей арилэстераз. – параоксоназа. Она гидролизует такие вещества, как фосфорорганические соединения (например, параоксон, используемый в офтальмологии), карбаматы и др. Реакция гидролиза эфира фосфорной кислоты проходит по следующей схеме:



- карбоксилэстеразы катализируют реакции гидролиза сложных эфиров, амидов и тиоэфиров:



Они играют важную роль в метаболизме лекарств, участвуют в метаболизме многочисленных фосфорорганических инсектицидов. Так, некоторые ткани (печень) содержат дезаминидазы, разрушающие амидные группировки. Однако активность этих ферментов в тканях млекопитающих низка, потому процесс метаболизма проходит медленно. Гидролиз амидной связи описан при изучении микробиологической деградации фениламидных пестицидов и происходит с участием амидаз:

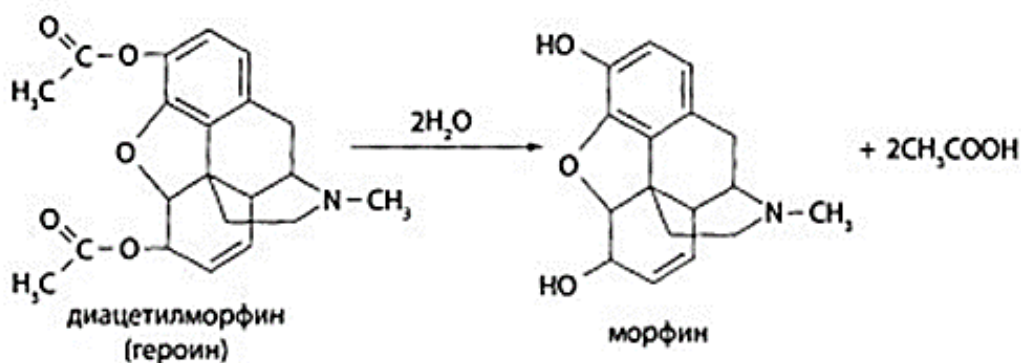
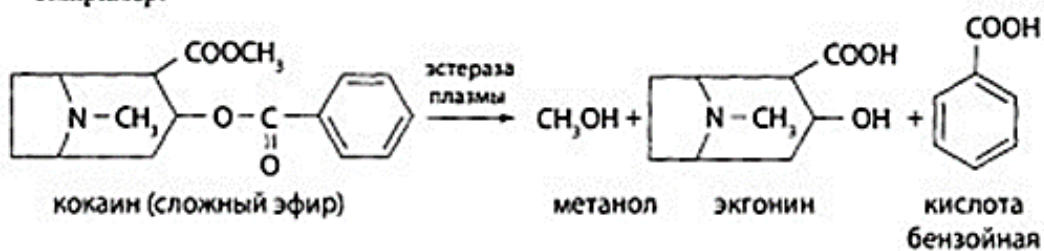


По сравнению с превращением *цис*-стильбеноксида последние реакции протекают очень медленно. Также механизм эпексидгидратазной реакции отличается от классических гидролитических процессов, катализируемых соответствующими гидролазами.

Рассмотрим еще несколько примеров гидролиза эфиров и амидов:

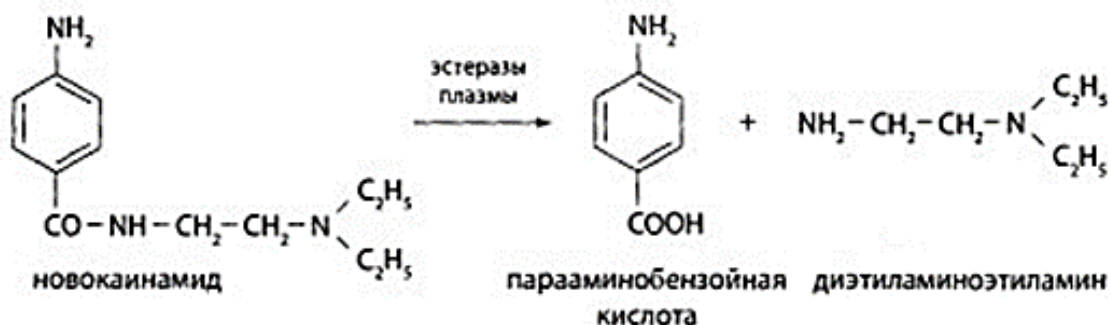
Гидролиз эфиров

Например:



Гидролиз амидов

Например:



1.8. Метаболизм спиртов и альдегидов

Рассмотрим процессы биотрансформации спиртов в организме человека на примере этанола и метанола.

Метаболизм этанола в организме человека

Поступивший в организм этанол кровью переносится во все органы и ткани организма. Его катаболизм осуществляется главным образом в печени (от 75 % до 98 % поступившего в организм этанола).

Превращение этанола в печени происходит тремя путями с образованием токсического метаболита – ацетальдегида.

1) Окисление этанола НАД-зависимой алкогольдегидрогеназой

Алкогольдегидрогеназа (АДГ) катализирует обратимую реакцию, направление которой зависит от концентрации ацетальдегида и соотношения НАДН/НАД⁺ в клетке. Алкогольдегидрогеназа – цитозольный фермент.



При хроническом алкоголизме количество фермента в печени не увеличивается, т.е. он не является индуцируемым ферментом.

Алкогольдегидрогеназы являются димерами, состоящими из субъединиц с молекулярной массой около 40 000 D и содержащими ион цинка Zn^{2+} . Оптимум действия фермента находится при pH 8,0. Цианиды, йодоацетат снижают активность АДГ. Изоферменты алкогольдегидрогеназы включают 4 класса.

Класс I АДГ – изоферменты: гены трех типов кодируют α -, β -, и γ -субъединицы, которые могут образовывать гомо- и гетеродимеры, ответственные за большую часть окислительной активности печени по отношению к этанолу), способны окислять этанол и другие алифатические спирты небольших размеров.

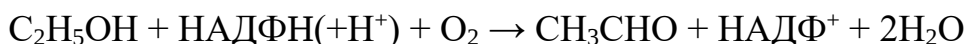
Класс II АДГ (π -АДГ, в печени), осуществляет окисление более крупных алифатических и ароматических спиртов.

Класса III АДГ (χ -АДГ) – высоко консервативны, активны по отношению к длинноцепочечным алифатическим спиртам (начиная от пентанола) и ароматическим спиртам, глутатион-конъюгированному формальдегиду, глутатион-NO, свободным гидроксильированным жирным кислотам и лейкотриенам.

Ферменты класса III участвуют в пути ликвидации формальдегида и имеют древнее происхождение.

Класс IV АДГ (σ - или μ -АДГ) – обладают ретинол-дегидрогеназной активностью, участвуют в формировании ретиноевой кислоты и, следовательно, в регуляции дифференцировки клеток позвоночных.

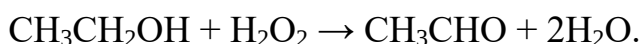
2. Окисление этанола при участии цит. P450–зависимой микросомальной этанолюкисляющей системы. Эта система локализована в мембране гладкого эндоплазматического ретикулума гепатоцитов. Окисление этанола происходит при участии изофермента P450IIЕ1. Она индуцируется этанолом, другими спиртами и приобретает существенное значение при поступлении больших доз этанола и при злоупотреблении алкоголем. При хроническом алкоголизме окисление этанола ускоряется на 50 – 70 % за счет гипертрофии ЭР и индукции цитохрома P450IIЕ1:



В реакции с участием цитохрома P450IIЕ1 могут также образоваться активные формы кислорода (O_2^- , H_2O_2), которые стимулируют ПОЛ в печени и других органах.

3. Окисление этанола каталазой

Второстепенную роль в окислении этанола играет каталаза, находящаяся в пероксисомах. Этот фермент расщепляет примерно 2 % этанола по пероксидазному пути, при этом одновременно разлагается пероксид водорода:

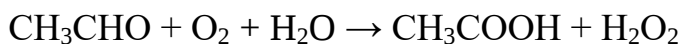


Частично этанол синтезируется в организме человека в результате процессов ферментации углеводной пищи в желудочно-кишечном тракте. Такой этанол принято называть физиологическим. Не являясь собственно эндогенной субстанцией, вырабатываемой клетками человеческого организма физиологический алкоголь проникает в них из крови, и метаболизирует так же, как это происходит в случае с алкоголем, поступившем в организм извне.

Образующийся при окислении этанола ацетальдегид очень токсичен, в 500 раз токсичнее этанола. Далее в тканях он метаболизирует в нетоксичный ацетат.

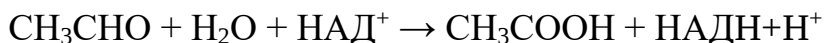
Работают два фермента:

1) ФАД-зависимая альдегидоксидаза:



Повышение концентрации ацетальдегида в клетке вызывает индукцию фермента альдегидоксидазы. В ходе реакции образуются уксусная кислота, H_2O_2 , другие активные формы кислорода, что приводит к усилению ПОЛ.

2) Ацетальдегиддегидрогеназа (АлДГ) – окисляет субстрат при участии кофермента НАД^+ :



В разных тканях организма человека встречаются полиморфные варианты АлДГ. Они характеризуются широкой субстратной специфичностью, разным распределением по клеткам тканей (почки, эпителий, слизистая оболочка желудка и кишечника) и в компартментах клетки – митохондриях и цитозоли.

Непереносимость алкоголя обусловлена разными факторами. К наиболее встречаемым можно отнести следующие.

АДГ превращает алкоголь в ацетальдегид. Именно ацетальдегид вызывает неприятные ощущения, которые испытывает человек, выпивший слишком много спиртного. Похмелье на следующий день тоже связано с действием продуктов окисления алкоголя. Другие ферменты, но, в большей степени АлДГ, окисляют ацетальдегид до уксусной кислоты. Активность ферментов, отвечающих за протекание этих двух реакций, определяется генетически.

Если первый этап – окисление алкоголя АДГ до токсичного ацетальдегида – идет быстро, то человек пьянеет мгновенно и физически не в состоянии много выпить, потому что токсичное вещество быстро накапливается и возникают связанные с ним эффекты: покраснение лица, потоотделение, сердцебиение, головокружение, тошнота и другие неприятные симптомы. Люди, у которых генетически детерминировано более быстрое превращение алкоголя в ацетальдегид (очень активна АДГ), потребляют алкоголя в среднем на 20 % меньше.

В Китае или Японии носителей такого варианта гена – 70%. Именно с этим связана неспособность населения Восточной Азии выпить большое количество алкоголя. Носителей такого варианта гена среди русского населения около 10 %.

Если синтезируется «медленный» вид АДГ, люди пьянеют намного позже – именно они любят алкоголь за «приятный» эффект эйфории, но и чаще страдают от алкоголизма.

Эффект отравления может наблюдаться при генетически обусловленном дефиците АлДГ. У организма проявляется непереносимость любых алкогольных напитков, поскольку практически сразу возникает тахикардия, головокружение, слабость в ногах, заторможенность мышления, ощущение дереализации и др. Люди с данной генетической особенностью также не могут быть алкоголиками.

Большое значение имеет также локализация и активность изоферментов АлДГ.

Например, митохондриальный изоформент АлДГ гепатоцитов, обладает более высоким сродством к ацетальдегиду (имеет низкую константу Михаэлиса K_M), по сравнению с цитозольным (K_M существенно выше).

У некоторых жителей Японии и Китая после употребления очень небольших доз алкоголя происходит расширение сосудов и увеличение частоты сердечных сокращений, проявляются все признаки интоксикации. Эти же дозы алкоголя у европейцев не вызывают такого действия. Наблюдаемый физиологический эффект обусловлен тем, что у вышеупомянутых жителей присутствует только цитозольная АлДГ, а митохондриальная форма отсутствует, поэтому ацетальдегид превращается в нетоксичный ацетат при накоплении его в более высоких концентрациях.

Вред алкоголя. Современные медицинские исследования установили, что печень человека способна переработать за один раз без повреждения клеточной структуры не более 20 грамм чистого этанола для женщин и 40 грамм этанола для мужчин, при условии последующего недельного воздержания от алкоголя. Масса тела человека и вид спиртного напитка (вино, пиво, водка, коньяк) значения не имеет, поскольку работа ферментов печени настроена непосредственно на переработку химически чистого этанола.

На рисунке 1.16 представлена схема нарушения метаболических процессов в тканях человека на примере печени. Под соответствующими номерами обозначены следующие процессы: $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3$ – окисление этанола до ацетата и превращение его в ацетил-КоА (1 – реакция катализируется АДГ, 2 – реакция катализируется АлДГ). Скорость образования ацетальдегида (1) часто при приеме большого количества алкоголя выше, чем скорость его окисления (2), поэтому ацетальдегид накапливается и оказывает влияние на синтез белков (4), ингибируя его, понижает концентрацию восстановленного глутатиона (5), в результате чего активируется ПОЛ. Скорость глюконеогенеза (6) снижается, так как высокая концентрация НАДН, образованного в реакциях окисления этанола (1, 2), ингибирует глюконеогенез (6). Лактат выделяется в кровь (7), и развивается лактоацидоз. Увеличение концентрации НАДН замедляет скорость цикла трикарбоновых кислот, накапливается ацетил-КоА, активируется синтез кетоновых тел, развивается кетоз (8). Окисление жирных кислот также замедляется (9), увеличивается синтез жира (10), что приводит к ожирению печени и гипертриацилглицеролемии.

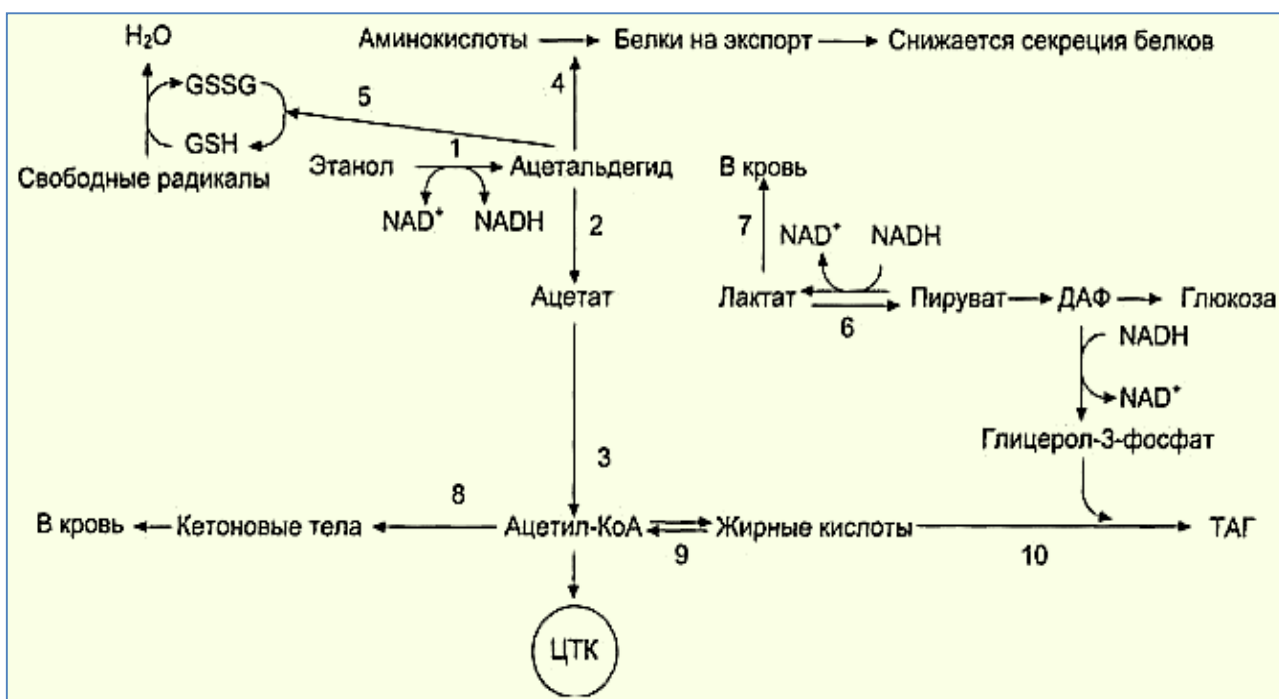


Рисунок 1.16 – Эффекты этанола в печени.

Алкоголь оказывает негативное воздействие практически на все органы и ткани организма. Основной вред обусловлен токсическим действием этанола, на все виды метаболизма. Наиболее уязвимы головной мозг, печень, сердце, поджелудочная железа, репродуктивная система.

Метаболизм метанола в организме человека

Метанол — опаснейший яд, прием внутрь 5 – 10 мл 40 % р-ра метанола приводит к тяжелому отравлению (одно из последствий – слепота), а в среднем 30 граммов и более – к смерти. Предельно допустимая концентрация метанола в воздухе рабочей зоны равна 0,05 мг/м³ (у изопропилового спирта 10 мг/м³, у этанола — 1000 мг/м³).

Метанол быстро и полностью всасывается в ЖКТ. Его сывороточная концентрация достигает максимума через 1-2 ч после приема. Он проникает во все жидкости и распределяется по тканям. Метанол легко проникает в организм при вдыхании, при длительном контакте – трансдермально.

Большая часть метанола метаболизируется в печени. До 10 % удаляется в неизменном виде с выдыхаемым воздухом и мочой. При низких концентрациях в сыворотке крови (меньше 9 ммоль/л, или 30 мг%) элиминация метанола подчиняется кинетике первого порядка, а T_{1/2} составляет около 3 ч. При более высоких концентрациях элиминация подчиняется кинетике нулевого порядка (постоянна во времени и не зависит от концентраций реагирующих веществ), кажущийся T_{1/2} достигает 30 ч.

Окисление метанола происходит при действии АДГ, микросомальной системы печени и каталазно-пероксидазной системы. Изоферменты АДГ I и IV

имеют невысокую способность к окислению метанола, АДГ II и III не окисляют метанол вовсе.

Метаболит метанола – очень токсичный формальдегид, часть его связывается с белками крови, большая часть очень быстро превращается в муравьиную кислоту, которая метаболизирует медленно. Дальнейший обмен метаболитов метанола осуществляется в цикле Кребса до конечных продуктов окисления – CO_2 и H_2O .

За счет образования формальдегида и муравьиной кислоты, а также медленного распада метанола обеспечивается тяжесть интоксикации.

Метанол и формальдегид являются ядами, оказывающими общетоксическое действие на организм. Они поражают нервную систему, дыхательные пути, печень, почки и органы зрения, обладают сильным раздражающим действием на слизистые оболочки дыхательных путей и глаз; сенсibiliзирующим, канцерогенным, тератогенным, эмбриотоксическим и мутагенным действием. Метанол и его метаболиты – сильные цитоплазматические яды, они нарушают окислительное фосфорилирование, вызывая дефицит АТФ – особенно в головном мозге и сетчатке глаз, способствуют демиелинизации и последующей атрофии зрительного нерва. Ингибирование многих важнейших метаболических процессов приводит к развитию ацидоза и кетоза, в плазме крови повышается концентрация лактата, кетокислот и других органических кислот.

Пороговая концентрация метанола (в сыворотке крови), действующего на головной мозг, составляет 0,00146 мг/л, что ниже, чем пороговый уровень обонятельных ощущений - 0,014-0,011 мг/л.

Для замедления метаболизма метанола и накопления формальдегида в организм вводят этанол. Этанол конкурирует с метанолом за АДГ, при этом скорость окисления метанола и выработки формальдегида снижается. При введении этанола $T_{1/2}$ метанола увеличивается до 30-60 ч. Концентрацию этанола поддерживают на уровне 20-30 ммоль/л (100- 150 мг%). Лечение продолжают, пока сывороточная концентрация метанола не станет ниже 3 ммоль/л (10 мг%) и не исчезнут все клинические проявления.

1.9. Электронтранспортные цепи эндоплазматического ретикулума

В окислении липофильных субстратов участвуют электронтранспортные цепи (ЭТЦ), локализованные на цитоплазматической поверхности эндоплазматического ретикулума (ЭПР).

Работают 2 цепи. Источником электронов и протонов в 1-й цепи является НАДФН+ H^+ , который образуется в реакциях пентозофосфатного пути окисления глюкозы. Промежуточным акцептором H^+ и e^- служит цитохром P450-редуктаза – флавопротеин, содержащий по 1 молю коферментов ФАД и ФМН. Конечное звено в цепи микросомального окисления – цитохром P-450 (P450), восстанавливающий O_2 до H_2O . P-450 имеет два активных центра: центр связывания кислорода – высокоспецифичен, центр связывания преобразуемого

субстрата – относительно специфичен. Редокс-потенциал P450-гемопротеина составляет 450 – 330 мВ

Работа системы P450 чаще всего сопряжена с работой 2-й цепи – системой цитохрома b-5 (b5), источником электронов и протонов в которой является НАДН+Н⁺, образующийся в гликолизе. Промежуточным акцептором Н⁺ и е⁻ служит цитохром b5-редуктаза – флавопротеин, содержащий кофермент ФАД. Следующее звено b5 – чаще, восстанавливающий P450, реже – O₂. Редокс-потенциал b5 составляет 20 мВ (рисунок).

Таким образом, P450 один атом O₂ включает в молекулу субстрата, а 2-й восстанавливает с образованием H₂O за счет переноса е⁻ и Н⁺ от НАДФН+Н⁺ при участии цитохром P450-редуктазы, или от НАДН+Н⁺ при участии цитохром b5-редуктазы и b5. b5 может окислять субстрат кислородом и без участия P450.

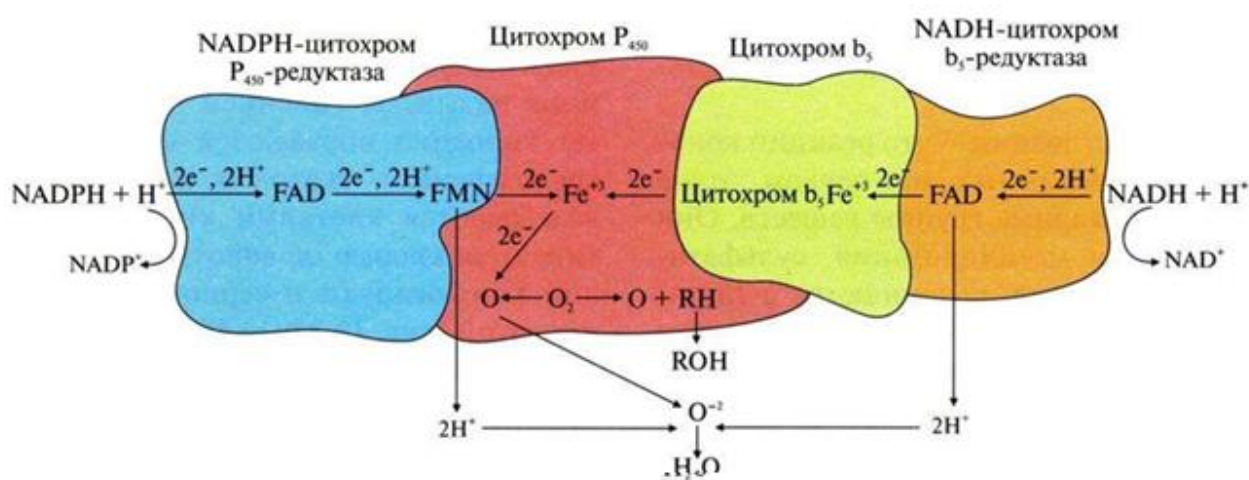


Рисунок 1.17 – Схема организации работы электрон-транспортных цепей эндоплазматического ретикула.

Реакции метаболизма различных эндогенных и экзогенных соединений с участием ферментов системы цитохрома P450 можно разделить на 6 стадий (рисунок 1.18).

1. связывание субстрата (S) с окисленной формой P450 (Fe³⁺). Метаболизируемое вещество не взаимодействует непосредственно с геминной группой P450. Оно присоединяется к белковой части цитохрома;
2. восстановление субстрат-ферментного комплекса – присоединение первого электрона от НАДФН при участии цитохром-P450-редуктазы (Fe³⁺);
3. присоединение молекулы кислорода с образованием фермент-субстратного оксикомплекса (возможно образование супероксиданиона);
4. присоединение второго электрона от НАДФН с восстановлением иона железа до Fe²⁺, работает цитохром-P450-редуктаза;
5. присоединение иона водорода к атому кислорода с окислением иона железа до Fe³⁺, образованием воды и, возможно, пероксида водорода;
6. расщепление фермент-субстратного комплекса с образованием окисленного метаболита.

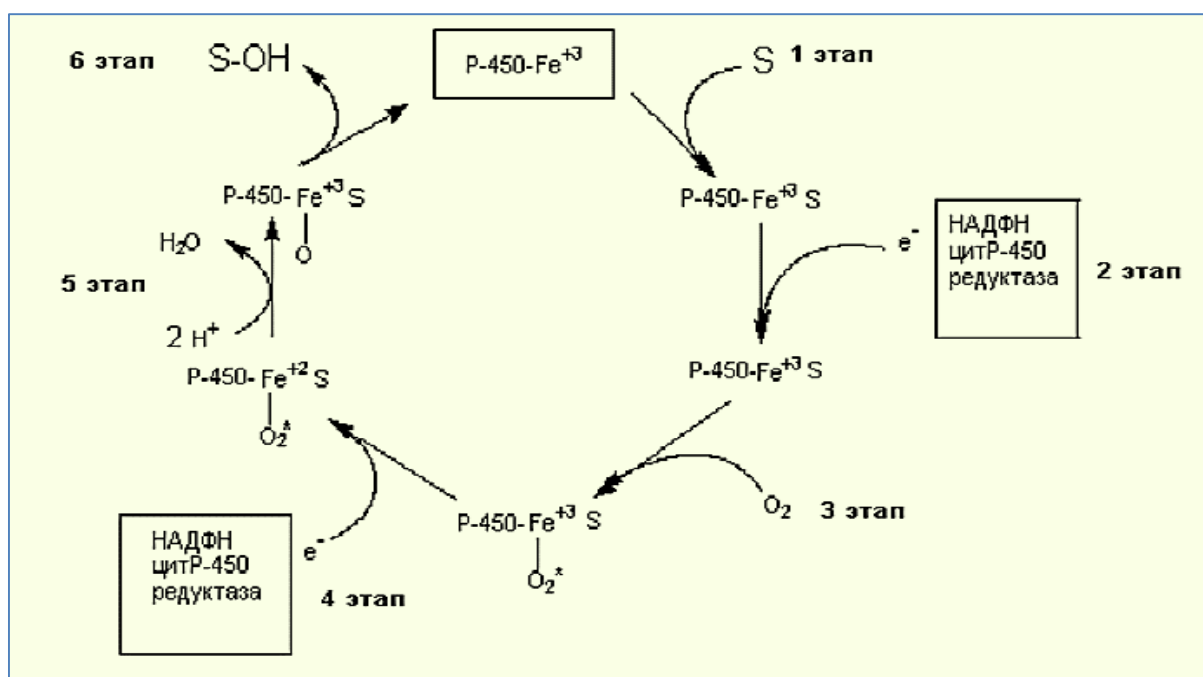


Рисунок 1.18 – Схема метаболических превращений субстрата (S) при участии ферментной системы цитохрома P450.

На 2-м и 4-м этапах монооксигеназного цикла донором электрона может быть цитохром b5.

Цитохром P450 (англ. *Cytochrome*, P450, CYP) – семейство гемсодержащих монооксигеназ, осуществляющих метаболизм ксенобиотиков, в том числе лекарственных препаратов, а также ряда эндогенных соединений. Цитохром P450 был открыт в 1958 г. Д. Гарфинкелем, М. Клингенбергом, название указывает на то, что он окрашен (P – от английского *Pigment*).

Т. Омура и Р. Сато (1964 г.) показали, что P450 в восстановленной форме, связанный с монооксидом углерода, имеет максимум поглощения света при длине волны λ -450 нм, что было включено в его название. СО не имеет никакого отношения к функции P450, он добавляется для того, чтобы облегчить определение содержания P450 по интенсивности спектра поглощения. Максимумы поглощения окисленной и восстановленной форм цитохрома P450 различаются. Окисленная форма имеет максимум поглощения в области 410-420 нм. В дополнение к основному максимуму в области 450 нм, восстановленная форма, связанная с СО, может также иметь максимумы в областях 550 и 570 нм. Эти максимумы обусловлены колебаниями электронной плотности в молекуле гема и могут варьировать в зависимости от конкретного цитохрома P450 и условий эксперимента. Отдельные цитохромы имеют максимумы поглощения при других длинах волн, например P448 (максимум при λ -448 нм). Эти различия в спектрах поглощения являются важным инструментом для идентификации и изучения разных P450, особенно при исследовании их взаимодействия с субстратами и ингибиторами.

P450 представляет собой комплекс белка с ковалентно связанным гемом (металлопротеином), обеспечивающим присоединение кислорода. Гем, в свою очередь, является комплексом протопорфирина IX и двувалентного атома железа. Железо гема может переходить из окисленной (Fe_3^+) в восстановленную (Fe_2^+) форму, что позволяет ему участвовать в переносе электронов в реакциях окисления.

Использование термина «цитохром» применительно к белкам-ферментам – гемопротеинам класса P450, не является удачным, так как функция цитохромов – перенос электронов, а не катализ монооксигеназных реакций, однако такое название укоренилось и применяется для названия этих ферментов.

P450 встречаются у всех живых организмов, включая животных, растения, грибы, бактерии и археи. У облигатных анаэробных бактерий гемопротеин отсутствует. Прокариоты содержат растворимый P450 в цитоплазме. Переход к эукариотам сопровождался встраиванием P450 в мембрану. В эволюционном плане наиболее древней является бактериальная монооксигеназа. Все P450 высших организмов – мембранные ферменты, которые преимущественно локализованы в эндоплазматическом ретикулуме, определенные формы функционируют в митохондриях и на ядерной мембране. На самой высокой ступени эволюционной лестницы стоит монооксигеназная система микросом печени. В настоящее время описано около 12000 белков системы P450.

У различных P450 М.м. колеблется от 44 до 60 кДа. Мономеры гемопротеина состоят из одной полипептидной цепи, состоящей на 45–55% из неполярных аминокислотных остатков. Цитохром образует агрегаты с М.м. от 300 до 700 кДа. Полная аминокислотная последовательность установлена для более чем 150 цитохромов P450 (рисунок 1.19).

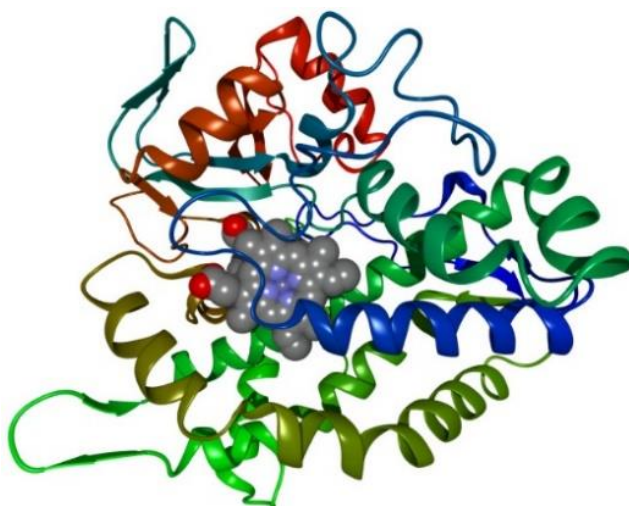


Рисунок 1.19 – Молекула цитохрома *P450eryF*.

Например, наиболее хорошо исследованы глобины P450-2B4 и P450-1A2 изоферментов, выделенных из микросом печени кроликов. Молекула P450 2B4 состоит из 491, а P450-1A2 - из 516 аминокислотных остатков соответственно.

Д. Озолс и др. в 1981 г. и О. Гото и др. в 1983 г. обнаружили наличие консервативных и переменных участков в структуре цитохромов разных семейств. Так в первичной структуре гемопротеинов семейств P4502 и P4501 – два консервативных участка: пролиновый кластер (остатки 30-38) и треонин-сериновый кластер (остатки 296-307). Подобные кластеры найдены и в других P450. Участки цепей 88-120, 160-183, 195-251, 270-295 и С-концевой фрагмент отличаются выраженной переменностью. Переменные участки определяют специфику каждого гемопротеина. Вероятнее всего, что консервативные области отвечают за проявление общих для гемопротеинов спектральных и каталитических свойств, а также за взаимодействие белка с мембраной. У различных форм гемопротеинов также обнаруживается высокая степень гомологии гем-связывающего участка.

Все мембранные цитохромы P450 на N-концевом фрагменте пептидной цепи имеют короткий гидрофобный пептид, содержащий от 12 до 21 аминокислотных остатков, который выполняет роль якоря и содержит сигнальную последовательность, ответственную за встраивание белка в мембрану. За ним расположена стоп-сигнальная последовательность, останавливающая встраивание пептида в фосфолипидный бислой в процессе трансляции.

Д. Нельсоном и Х.Стробелом предложена модель локализации P450 в мембране, согласно которой большая часть белка находится вне липидного бислоя, субстрат-связывающий участок контактирует с липидным бислоем, а гем расположен параллельно плоскости мембраны. В некоторых случаях обнаружено, что плоскость гема ориентирована под углом 40-50°. Различия в ориентации гема характерны для P450 разных семейств. Неизвестно, погружен ли активный центр гемопротеина в фосфолипидный бислой или находится на поверхности бислоя.

Гомология вторичной структуры P450, как правило, выше, чем гомология соответствующих первичных структур. Для многих форм P450, несмотря на низкую степень гомологии первичной структуры, получены близкие профили гидрофобности.

Трехмерная структура белка была детально изучена у P450 (101), выделенного из *Pseudomonas Putida* с помощью рентгеновской кристаллографии. Белок содержит 414 аминокислотных остатков, М.м. – 47 кДа и представляет собой асимметричную призму с основанием 3,0 нм и сторонами по 5,5 и 6,0 нм. Белок содержит 3 вида структур: 4 антипараллельных спиральных участка, смесь спиралей и неупорядоченных структур, перемежающихся параллельными бета-структурами. Гем расположен между двумя параллельными спиральями, остатки Arg-112, Arg-229 и His-335 связаны с его пропионовыми группами, другие аминокислоты, окружающие гем, неполярны. Гем не выходит на поверхность молекулы. Наименьшее расстояние от поверхности до гема составляет около 0,8 нм. В связывании субстрата (камфоры) принимает участие гидроксильная группа остатка Tyr-96. Молекула

субстрата располагается на расстоянии 0,4 нм над пиррольным кольцом А протопорфирина IX, в непосредственной близости от места связывания с СО. Кроме водородной связи камфоры с Туг-96 ее правильной ориентации в активном центре способствуют гидрофобные аминокислоты.

P450-зависимые монооксигеназы катализируют окисление многочисленных соединений, как эндогенных, так и экзогенных, с участием донора электронов и молекулярного кислорода и имеют два активных центра: центр связывания кислорода – высокоспецифичный, и центр связывания преобразуемого субстрата – относительно специфичный. В этой реакции один атом кислорода присоединяется к субстрату, а второй НАДФН+Н⁺ восстанавливается до воды. Активность P450 может варьировать в зависимости от генетических факторов, возраста, пола, наличия заболеваний и воздействия внешних факторов, например курения и употребления алкоголя.

Ферменты семейства P450 различаются:

- по функциями,
- типами ферментативной активности,
- регуляторами активности (ингибиторами, индукторами).
- максимумами поглощения и др.

Отдельные изоферменты (изоформы) P450 отличаются определенной специфичностью и каждый из них участвует в метаболизме относительно небольшого количества веществ.

P450, наряду с монооксигеназной активностью, могут проявлять оксидазную (А.И. Арчаков с сотр., 1979–981 гг.), т.е. катализировать удаление водорода из субстрата, используя при этом в качестве акцептора водорода кислород и восстанавливать его до воды, или генерировать активные формы кислорода в виде супероксидного и гидроксильного радикалов, пероксида водорода. P450 обладают пероксидазной активностью, используя в реакциях окисления в качестве косубстратов вместо НАДФН органические пероксиды или пероксид водорода. Также показано, что ряд данных гемопротеинов способны катализировать диоксигеназные реакции, вводить в окисляемое вещество два атома кислорода.

P450 кодируются суперсемейством генов. У человека в системе P450 выявлено 57 генов и более 59 псевдогенов. Paul D. N. Hebert (1987 г.) была разработана классификация P450, основанная на дивергентной эволюции и нуклеотид/аминокислотной гомологии последовательностей. Суперсемейство подразделяется на 18 семейств и 43 подсемейства. Номенклатура генов P450 человека описана подробно.

Изоферменты, имеющие более 40 % общего аминокислотного состава, объединены в семейства и обозначаются арабскими (иногда римскими) цифрами (P450-1, P450-2, P450-3 и т.д.). Семейства разделены на подсемейства, обозначаются латинскими буквами и объединяют изоферменты семейства с идентичностью аминокислотного состава более 55 % (P450-2D, P450-3A и т.д.).

В подсемействе отдельные изоферменты обозначаются арабскими цифрами, следующими за латинскими буквами (P450-1A2, P450-2D6, P450-3A4).

Ксенобиотик может быть субстратом двух и более изоферментов, так как разные изоферменты способны метаболизировать одно вещество в различных участках его молекулы.

P450 участвует в реакциях метаболизма эндогенных субстратов; катализируют ω -окисление насыщенных жирных кислот, перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот, гидроксилирование стероидных гормонов, желчных кислот и холестерина, биосинтез простагландинов, превращение гемоглобина и билирубина, эти P450 локализованы в митохондриях, на ядерной мембране. Микросомальные ферменты осуществляют биотрансформацию ксенобиотиков (лекарств, ядов, наркотиков), а также некоторых эндогенных веществ.

Активность систем биотрансформации не является строго постоянной и интенсивность ее работы зависит от ряда факторов. Некоторые химические вещества, в том числе лекарственные препараты, способны воздействовать на ферменты 1-й и 2-й фаз биотрансформации. Эти вещества условно можно разделить на две группы: индукторы и ингибиторы цитохром P450-зависимых монооксигеназ. Индукторы P450 увеличивают скорость синтеза и количество ферментов в организме, что ускоряет метаболизм ксенобиотиков, лекарственных средств и др. Общие индукторы некоторых ферментов, участвующих в биотрансформации веществ представлены в таблице 1.6.

Фенобарбитал активизирует синтез P450, УДФ-глюкуронилтрансферазы и эпоксидгидролазы. Он также увеличивает площадь мембран ЭПР (гипертрофия), которая достигает 90 % всех мембранных структур клетки и, как следствие, –повышает концентрацию ферментов, участвующих в обезвреживании ксенобиотиков или токсических веществ эндогенного происхождения. Метилхолантрен является индуктором системы цитохромов P448.

В настоящее время описано несколько сотен химических соединений, вызывающих индукцию микросомальных ферментов. Индукторы монооксигеназных систем разделяются на два класса:

1 класс (например, инсектициды, этанол и др.) – вызывают индукцию и выраженную пролиферацию гладкого ЭПР, увеличение общей активности цитохрома P450 в клетке (гепатоцитах).

2 класс (например, полициклические ароматические углеводороды: бензпирен, тетрахлордibenзодиоксин, 3-метилхолантрен и др.), не вызывают пролиферацию гладкого ЭПР, но существенно повышают активность многих ферментов биотрансформации за счет интенсификации биосинтеза и увеличения их концентрации.

Таблица 1.6 – Общие индукторы некоторых ферментов системы биотрансформации ксенобиотиков.

Ферменты	Индуктор	Индуктор	Индуктор	Индуктор
	Фенобарбитал	Тяжелые металлы	Противо-опухолевые лекарства	Метил-холантрен
Система цитохрома P ₄₅₀	↑			
Система цитохрома P ₄₄₈				↑
Эпоксид-гидролазы	↑			
Глутатион и УДФ-глюкуронил-трансферазы	↑			
Синтез GSH		↑	↑	
P-гликопротеин			↑	

В настоящее время описано несколько сотен химических соединений, вызывающих индукцию микросомальных ферментов. Индукторы монооксигеназных систем разделяются на два класса:

1 класс (например, инсектициды, этанол и др.) – вызывают индукцию и выраженную пролиферацию гладкого ЭПР, увеличение общей активности цитохрома P₄₅₀ в клетке (гепатоцитах).

2 класс (например, полициклические ароматические углеводороды: бензпирен, тетрахлордibenзодиоксин, 3-метилхолантрен и др.), не вызывают пролиферацию гладкого ЭПР, но существенно повышают активность многих ферментов биотрансформации за счет интенсификации биосинтеза и увеличения их концентрации.

Было показано, что в процессе индукции, обусловленной воздействием некоторых ксенобиотиков, участвуют генетические факторы. Наиболее изучен тип индукции, осуществляемый через цитоплазматический рецептор к полиароматическим углеводородам (исследовано на диоксинах) – Ah-рецептор (AhR). После проникновения диоксина в цитоплазму клетки он связывается с AhR. Комплекс диоксин-AhR присоединяется к ядерному белку-импортеру – Arnt, который переносит комплекс диоксин-AhR в клеточное ядро. В ядре комплекс диоксина и рецептора связывается с определенным локусом ДНК и работает как фактор транскрипции, стимулируя экспрессию генов, кодирующих

структуру около 20 типов белков. Ускоряется синтез молекул, среди которых P450-1A1, P450-1A2 и P450-1B1 изоферменты, в результате ускоряется биотрансформация соответствующих ксенобиотиков.

Ускорение метаболизма большинства ксенобиотиков приводит к снижению токсичности. Вместе с тем токсичность некоторых ксенобиотиков под воздействием индукторов существенно возрастает (например, тетрахлорметана, бромбензола, иприта и др.), так как ускорение метаболизма приводит к быстрому образованию продуктов деградации более токсичных, чем исходный субстрат.

Известны химические вещества, способные угнетать скорость 1-й и 2-й фазы биотрансформации. К ингибиторам отдельных изоферментов P450 относятся соединения различной природы (например, хлорамфеникол, ципрофлоксацин, кодеин, верапамил и др.).

Ингибиторы P450 можно классифицировать по механизму их действия на микросомные монооксигеназы. Выделяют следующие группы:

- ингибиторы прямого действия (СО, антиоксиданты и др.);
- обратимые ингибиторы непрямого действия, оказывающие влияние на микросомальные ферменты через промежуточные продукты своего метаболизма, которые образуют комплексы с P450 (гидразины и др.);
- ингибиторы, разрушающие цитохром P450 (четырёххлористый углерод и др.);
- ингибиторы, тормозящие синтез и (или) ускоряющие распад цитохрома P450 (тяжелые металлы, интерфероны и др.).

Собственно, к истинным ингибиторам можно отнести только инактиваторы P450, так как в других случаях механизм ингибирования связан с конкуренцией за субстрат. Некоторые реакции 2-й фазы биотрансформации также могут стимулироваться под действием индукторов микросомальных монооксигеназ. В зависимости от концентрации химические вещества могут выступать в роли, как индукторов, так и в роли ингибиторов P450. Основываясь на представлении о функциональном сопряжении двух фаз биотрансформации ксенобиотиков, как индукторы, так и ингибиторы системы используются для того, чтобы ускорить образование малотоксичных продуктов биотрансформации или задержать образование высокотоксичных метаболитов.

Цитохром b5 (b5), как и P450, является белком, содержащим гем, который является ключевым в переносе электронов в различных ферментативных окислительно-восстановительных процессах. Он функционирует как электронный переносчик в нескольких метаболических путях, включая метаболизм жирных кислот, стероидов, в том числе чужеродных соединений (микросомальные изоферменты). В настоящее время все известные изоферменты b5 можно разделить на две группы – растворимые и мембрансвязанные. К растворимым формам относятся локализованные в эритроцитах и цитозоли различных клеток. Эритроцитарная форма фермента участвует в реакциях восстановления метгемоглобина. Цитозольная является,

например, незаменимым компонентом в цикле синтеза метионина из гомоцистеина.

В группе мембрансвязанных изоферментов цитохрома b5 выделяют митохондриальную и микросомальную формы. Апопротеины этих изоформ цитохрома b5 кодируются двумя различными генами. Молекула микросомального цитохрома b5 состоит из двух доменов – гидрофильного и гидрофобного (рисунок 1.20).

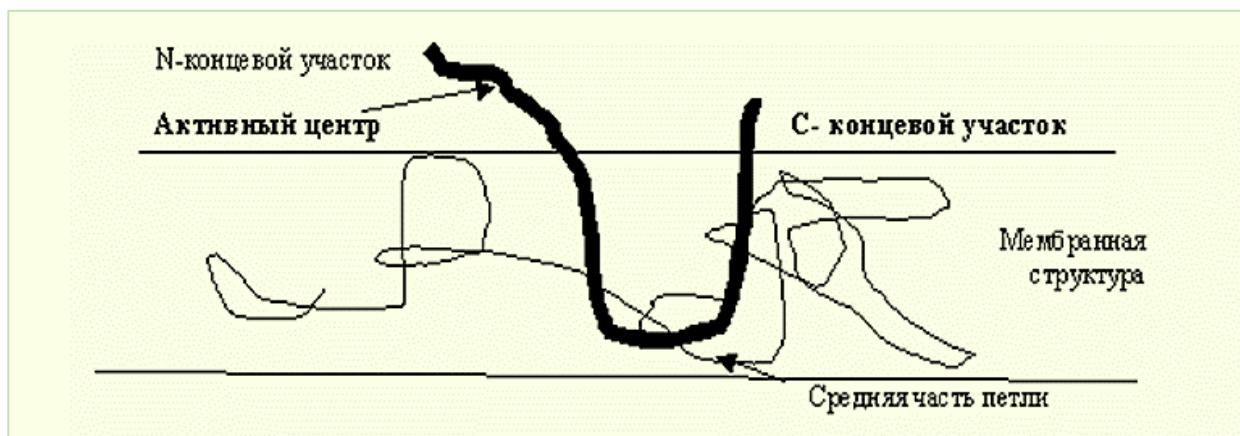


Рисунок 1.20 – Схематичное изображение расположения молекулы цитохрома b5 в мембране.

Гидрофильный участок фермента образован аминокислотными остатками с 1-88 и содержит гем, входящий в состав активного центра. Гидрофобный домен b5 образован остатками аминокислот С конца белковой молекулы (остатки аминокислот 89-133). Эта часть молекулы отвечает за встраивание белка в мембрану. Посредством компьютерного моделирования установлено, что С-концевой участок b5 образует петлю, которая пронизывает бислой насквозь, играет важную роль во встраивании и ориентации белка в мембране, обеспечивая функциональную активность фермента. Активный центр расположен на N-концевом участке молекулы и имеет гидрофильное окружение.

Цитохром b5, локализованный в наружной мембране митохондрий, по сравнению с микросомальным обладает более низким редокс-потенциалом, молекула стабильнее при химических и термических воздействиях, связь между апопротеином и гемом значительно прочнее. В конформации b5 выявлено два гидрофобных участка. Так, например, у митохондриального гемопротеина первый гидрофобный участок трехмерной структуры формируют остатки аланина-18, изолейцина-32, лейцина-36 и лейцина-47, а второго – изолейцин-25, фенилаланин-58, лейцин-71 и гем. На мутантных формах молекулы показано, что оба гидрофобных участка имеют большое значение в поддержании стабильности молекулы. В случае отсутствия или замены в них аминокислотных остатков взаимодействие апопротеина с гемом снижается.

Роль цитохрома b5 в реакциях, катализируемых изоформами системы цитохрома P450. Выделяют несколько возможных механизмов стимулирующего влияния b5 на изоферменты P450:

- прямая передача электрона с b5 на P450 без участия НАДФ цитохром-P450 редуктазы;
- при использовании P450 второго электрона от b5 в монооксигеназном цикле чаще всего происходит образование более активных радикалов кислорода, (но меньшее количество);
- b5 может взаимодействовать с P450 с образованием комплекса двух гемопротеинов и последующей передачей двух электронов от НАДФН-цитохром-P450-редуктазы. Это повышает скорость образования активного кислорода и устраняет необходимость повторного взаимодействия P-450 с НАДФН-цитохром-P450-редуктазой;
- b5 может осуществлять аллостерическую стимуляцию цит. P450 без переноса электронов;
- b5 может оказывать защитное действие на молекулы терминальной оксигеназы, которое не связано с реакциями окислительно-восстановительного цикла, что предотвращает ее разрушение.

Цитохром b5 может влиять на изменение скорости реакции, спектра метаболитов и образование активных форм кислорода в реакциях системы P-450:

- в присутствии b5 скорость метаболизма большинства эндогенных соединений и ксенобиотиков чаще всего повышается;
- влияние b5 на скорость биотрансформации одного и того же соединения у разных видов животных неодинаково. Например, у кроликов в присутствии b5 скорость метаболизма андростендиона P4502B5 изоферментом повышается, а у собак – P4502B11 снижается;
- у разных видов (человек и хомячок) b5 может не изменять скорости окисления соединения (нитрозамин) или оказывать стимулирующее действие;
- присутствие в среде b5 способно изменять спектр метаболитов, образующихся при биотрансформации соединения одной и той же изоферментной формой P450. Например, в присутствии b5 меняется спектр продуктов тетрахлорбифенила, образуемых под действием P450 2B1;
- метаболизм биологически активных соединений (арахидоновая кислота, лейкотриены) происходит только в присутствии цит. b5.

1.10. Методы исследования цитохрома P450

Для определения P450 используются методы генотипирования и фенотипирования. Исследования осуществляют *in vivo*, *in vitro*, *in electrode*, *in silico*.

Так, для выявления конкретных генетических вариантов (мутаций) в генах, кодирующих P450 проводят полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в режиме реального времени. С целью обнаружения генетических полиморфизмов,

влияющих на активность ферментов, проводят анализ образцов ДНК, полученных из крови, слюны или буккального эпителия и др. источников.

Для определения концентрации и активности Р450 в образцах тканей применяют методы электрохимического анализа; электрофореза, высокоэффективной жидкостной хроматографии, позволяющие измерить спектр и уровни метаболитов ксенобиотиков (лекарственных веществ), метаболизируемых цитохромами Р450, после введения препарата.

Спектральные методы дают возможность определить концентрацию цитохрома Р450 путем измерения поглощения света в области *Soret*-полосы (интенсивный пик поглощения в синей области видимого спектра, характерный для порфириновых соединений).

Используются методы измерения восстановительной активности НАДФН-цитохрома с: использованием НАДФН-цитохром-Р450-редуктазы.

Электрохимический метод исследования Р450-монооксигеназной системы. Для исследования каталитической активности Р450 требуется сложное реконструирование монооксигеназной системы с использованием редокс-партнеров и фосфолипидов. Изоферменты цит. Р-450 быстро инактивируются. В 70–80-х годах прошлого века был разработан метод, позволяющий в качестве донора электронов для катализа Р450, применять электрод. Для этого используются электрохимические биосенсорные системы на основе цитохромов Р-450, иммобилизованные на электроде, в результате:

- электрокаталитическая реакция инициируется электронами с электрода;
- активность иммобилизованного цит. Р-450 осуществляется с помощью регистрации каталитического тока, возникающего при внесении в электрохимическую систему субстрата;
- регистрация каталитического тока осуществляется методами вольтамперметрии или амперметрии.

Метод позволяет рассчитать многие характеристики ферментативного процесса, например электрохимическую каталитическую константу Михаэлиса-Ментен (рисунок 1.21).

Разработка биосенсоров на основе электрохимических Р450-содержащих систем позволяет выявлять субстраты (ксенобиотики) изоферментов Р450, исследовать эффекты лекарственных препаратов на каталитическую активность конкретных изоферментов цитохрома.

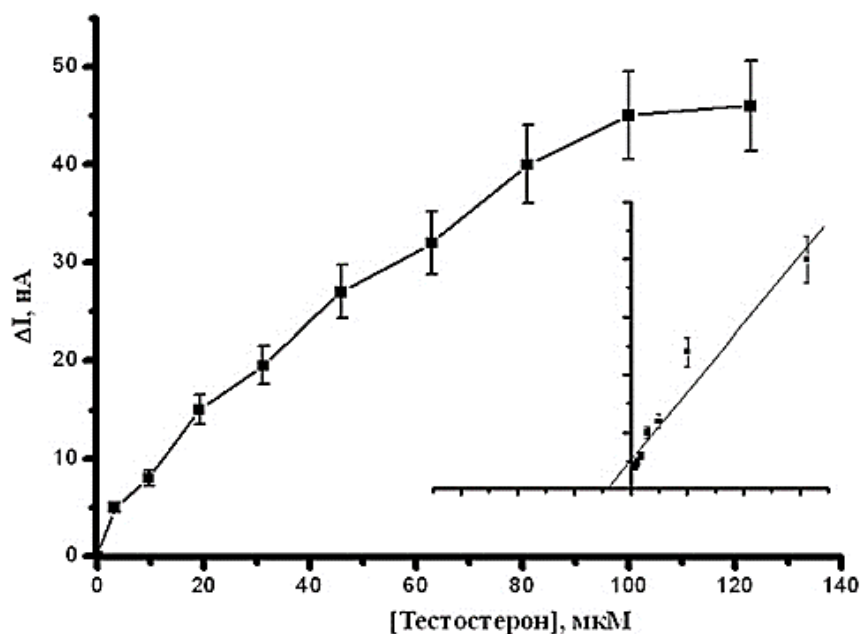


Рисунок 1.21 – Зависимость изменения каталитического тока при амперметрическом титровании Р450-3А4 тестостероном при контролируемом напряжении $E = -0,5 \text{ В (vs. Ag/AgCl)}$. На вставке – расчет электрохимической K_m [тестостерон].

Преимущества электрохимического метода исследования Р450-монооксигеназной системы:

1) электрохимическая система не требует использования дорогостоящих и неустойчивых восстановительных эквивалентов НАДРН и НАДН, т.к. применяется альтернативный источник электронов – электрод;

2) не требует полного реконструирования монооксигеназной системы (использования всех компонентов микросомальной системы и белков редокс-партнеров каталитического цикла цитохрома Р450);

3) метод обладает высокой чувствительностью и позволяет использовать минимальное количество дорогостоящего фермента (до 10-12 мкмоль белка/электрод);

4) электрокатализ и контролируемость ферментативного процесса с помощью электрического тока обладает высокой эффективностью;

5) можно предотвращать инактивацию интактных изоформ Р450 на электроде путем использования различных синтетических модификаторов поверхности электрода.

Высокоэффективная жидкостная хроматография дает возможность исследовать показатели в биологическом материале после введения ксенобиотика (лекарственного вещества). Можно проводить кинетический анализ, позволяющий определить, например:

- период полувыведения тестового препарата,
- объем кажущегося распределения,
- клиренс элиминации и другие параметры.

ПЦР-ПДРФ анализ полиморфизма и мутантных форм генов P450.

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ, англ. *Restriction fragment length polymorphism*, RFLP) — способ исследования геномной ДНК путём разрезания ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции и дальнейшего анализа размеров образующихся фрагментов (рестриктов) путем геле-электрофореза ДНК.

Полное расщепление анализируемой геномной ДНК отдельными рестриктазами приводит к образованию определенного набора фрагментов ДНК, число и размеры которых соответствуют расположению сайтов рестрикции. Гибридизация по Саузерну позволяет определять размеры и взаимное расположение рестрикционных фрагментов ДНК после их электрофоретического разделения.

Мутационная изменчивость в сайтах рестрикции может быть легко обнаружена по изменению длины рестрикционных фрагментов ДНК, гибридизующихся со специфическими ДНК-зондами. При наличии мутации в одном из сайтов рестрикции этот сайт остается нерасщепленным после завершения рестрикции, что приводит к слиянию соседних рестрикционных фрагментов ДНК, разделяемых мутантным сайтом, и образованию фрагмента ДНК большего размера.

В результате длина рестрикционных фрагментов ДНК, содержащих мутантные сайты, становится полиморфной, что выявляется при сравнении ДНК из разных источников методом ПДРФ (рисунок 1.22).

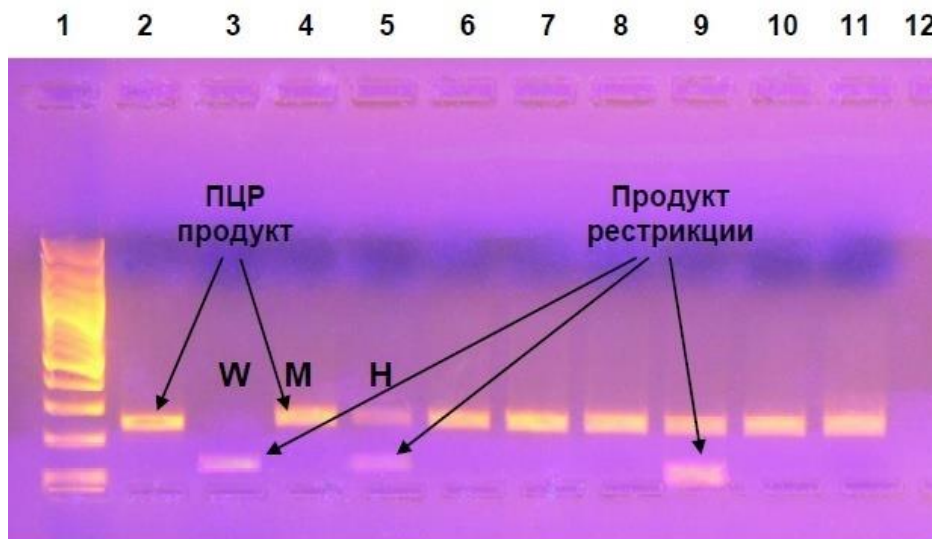


Рисунок 1.22 – Результаты анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ) гена P450-1A2: 1 – маркер молекулярных масс; 2, 4, 6, 7, 8, 10 и 11 – мутантный генотип – М (мутация в сайте рестрикции – рестрикция не происходит); 3 – мутация отсутствует – генотип дикого типа – W; 5 и 9 – гетерозиготный генотип – имеются все фрагменты – H; 12 – отрицательный контроль.

ПЦР можно проводить в реальном времени. Метод позволяет проводить реакцию с флуоресцентной регистрацией накопления продуктов амплификации непосредственно в ходе реакции. При этом избирательно регистрируется амплификация лишь определенных фрагментов ДНК (за счет использования трех праймеров, один из которых обеспечивает увеличение флуоресцентного сигнала).

ДНК-чипы позволяют одновременно определять очень большое количество полиморфизмов генов P450 в одной пробе.

На твердом чипе очень небольшого размера в виде отдельных пятен размещается большое количество олигонуклеотидных зондов, каждый из которых обеспечивает специфическую гибридизацию с нормальными и мутантными аллелями множества различных генов.

Перед проведением гибридизации проводят неспецифическое флуоресцентное мечение исследуемой ДНК. В случае связывания ДНК образца с зондом на чипе выявляется флуоресцентный сигнал соответствующего участка чипа. Зная, какая аллель отвечает за синтез того или иного изофермента P450, можно определить какие ксенобиотики и каким путем будут биотрансформированы.

Компьютерное моделирование взаимодействия лигандов с P450 (исследования *in silico*).

Для изучения взаимодействия субстрата и фермента используются методы молекулярного докинга и молекулярной динамики.

Молекулярный докинг (или молекулярная стыковка) – это метод молекулярного моделирования, который позволяет предсказать наиболее выгодную ориентацию и положение одной молекулы (субстрат) по отношению к другой (активный центр) для образования устойчивого комплекса. При помощи скоринговых функций (англ. *Score* – счет), рассчитывают наиболее энергетически выгодные конформации лиганда в активном центре.

Молекулярная динамика – метод, в котором интегрирование уравнений движения взаимодействующих атомов или частиц позволяет отслеживать эволюцию системы во времени. Играет важную роль (наряду с кристаллографией и ЯМР) в определении структуры белка и уточнении его свойств.

QSAR модели. Количественные взаимоотношения структура-активность (QSAR - англ. сокр. от Quantitative Structure-Activity Relationships) позволяют по описанию структуры химических соединений предсказывать их свойства, в том числе устанавливать взаимодействие соединения с отдельными цитохромами и его биотрансформацию, например:

- 1) для классификации субстратов различных цитохромов применяются:
 - метод построения опорных векторов,
 - метод К-ближайших соседей,
 - метод дерева принятия решений и др.

2) для оценки взаимодействия лигандов, (субстратов и ингибиторов) с активным центром цитохрома используются трехмерные QSAR (3-D QSAR) методы.

Суперсеме́йство P450 катализирует большое количество реакций, проходящих по разным механизмам, поэтому классические QSAR методы не могут быть применены корректно для веществ, принадлежащих к различным классам. Для каждого отдельного цитохрома, метаболизирующего ксенобиотик, нужно строить специальную QSAR модель с использованием различных числовых характеристик (дескрипторов) и разных математических методов.

1.11. II фаза биотрансформации ксенобиотиков. Реакции конъюгации

превращение молекул в первой фазе биотрансформации усиливает их полярность, уменьшает способность растворяться в липидах. Уже только благодаря этому многие чужеродные соединения лучше выделяется с мочой. Эффект усиливается ходе реакций конъюгации (2-я фаза), когда происходит присоединение к функциональным группам ксенобиотиков, поступивших в клетку или преобразовавшихся в реакциях 1-й фазы, молекул или групп эндогенного происхождения.

Все реакции конъюгации осуществляются ферментами класса трансфераз, Как и энзимы I фазы метаболизма ксенобиотиков, энзимы II фазы обладают слабой субстратной специфичностью и участвуют в превращениях определенной группы химических веществ. Это реакции биосинтеза и на их осуществление организм тратит энергию (таблица 1.7).

Таблица 1.7 – Основные ферменты и метаболиты, участвующие в реакциях конъюгации.

Тип конъюгации Фермент	Метаболит, используемый для конъюгации	Активная форма метаболитов	Локализация процесса
<u>Глутатионовая</u> Глутатион- трансфераза	Глутатион (GSH)	Глутатион (GSH)	Цитозоль, гл.ЭПР
<u>Глюкуронидная</u> УДФ-глюкуронил- трансфераза	Глюкуронат	УДФ-глюкуронат	Гл.ЭПР
<u>Сульфатная</u> Сульфотрансфераза	Сульфат	3'-фосфоаденозин- 5'-фосфосульфат	Цитозоль

<u>Аминокислотная</u> Ацил-КоА- синтетаза, ацилтрансфераза	Аминокислоты	Ацил-КоА (АТФ)	Митохондрии, цитозоль, ЭПР, лизосомы
<u>Метилирование</u> Метилтрансфераза	Метил	S-аденозилцистеин	Цитозоль, ЭПР
<u>Ацетилирование</u> Ацетилтрансфераза	Ацетил	Ацетил-КоА	Цитозоль

Реакции конъюгации протекают в разных компартментах, это позволяет связывать появляющиеся токсичные продукты и вне ЭПР.

Конъюгация включает реакции двух типов:

I тип реакций – активируется конъюгирующее эндогенное вещество, которое взаимодействует с ксенобиотиком. Происходит во всех тканях.

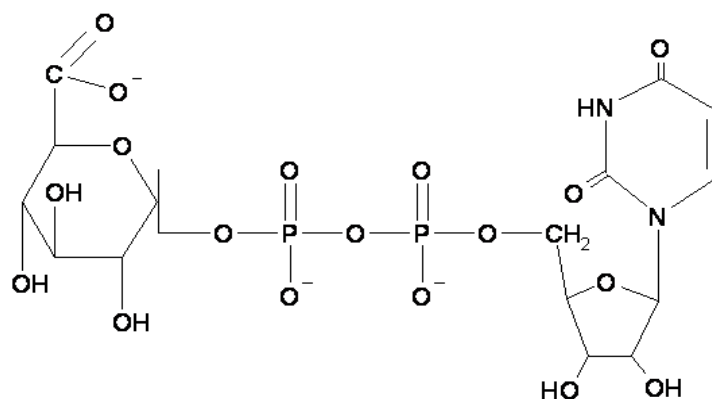
II тип реакций – активируется ксенобиотик, который взаимодействует с конъюгирующим веществом. Происходит в печени и почках. Встречается реже.

Глюкуронидная конъюгация

Глюкуронидная конъюгация – наиболее важный вид конъюгации в организме животных и человека. Катализируют конъюгацию УДФ-глюкуронозилтрансферазы, относящиеся к 4 семействам: UGT1, UGT2, UGT3 и UGT8. У человека в семействах UGT1 и UGT2 насчитывается 22 УДФ-глюкуронозилтрансферазы. Ферменты работают в печени, коже, легких, селезенке, тимусе, почках, отсутствуют в крови. 90 % активности сосредоточено в ЭПР, присутствуют на ядерной мембране (защищают ядерный аппарат от реактивных липофильных ксенобиотиков, не успевших связаться в других местах клетки). Глюкуронилтрансферазы являются важной составляющей обмена веществ в бактериях, растениях, животных, присутствуют в вирусах,

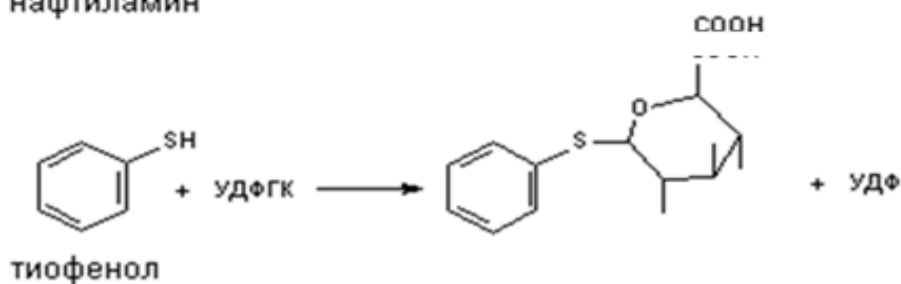
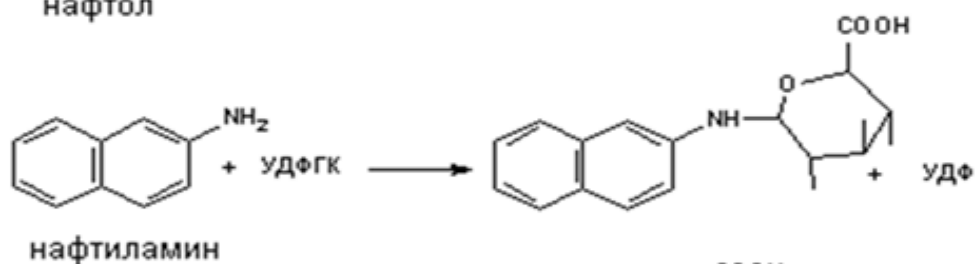
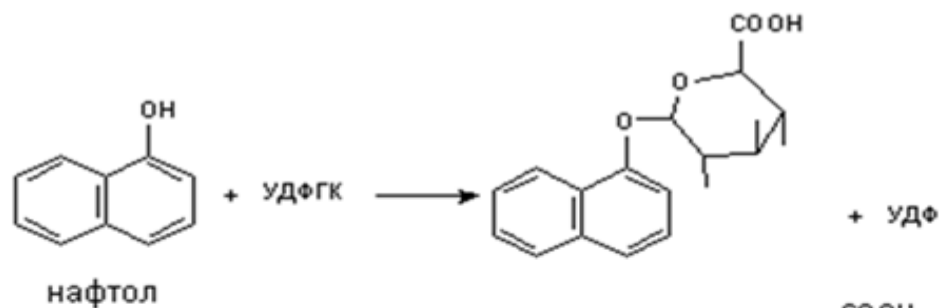
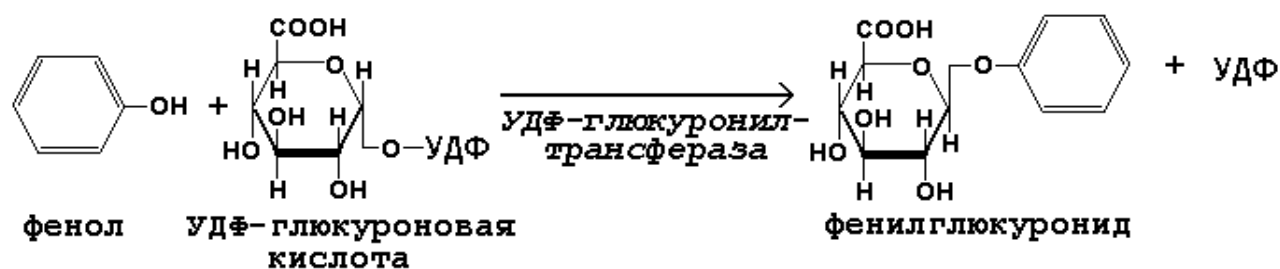
Физиологическая функция УДФ-глюкуронилтрансфераз – глюкуронирование эндогенных соединений: билирубина, тироксина и трийодтиронина в печени и др., участвуют в метаболизме стероидных гормонов, желчных кислот, ретиноидов.

В реакцию с глюкуроновой кислотой способны вступать 4 группы химических веществ, в результате образуются О-, N-, S-, С-глюкурониды. Активной формой глюкуроновой кислоты является уридин-5'-дифосфо-αD-глюкуроновая кислота:



При глюкуронировании образуются относительно индифферентные и хорошо растворимые в воде глюкурониды, которые могут выделяться в кишечник с желчью.

Примерами образования O-, N-, S- глюкуронидных конъюгатов являются следующие:



Ткани нуждаются в интенсивно работающих глюкуронидтрансферазах. значимая роль в печени принадлежит изоферменту УДФ-ГТ1-А1, который участвует в распаде билирубина и порфиринов и является маркером нарушений метаболизма билирубина.

Достаточно редкая мутация гена, ответственного за синтез УДФ-ГТ1-А1, приводит к почти полному дефекту фермента и вызывает очень тяжело переносимое заболевание – синдром Криглера-Найяра, патология сопровождается желтухой и серьезным поражением нервной системы.

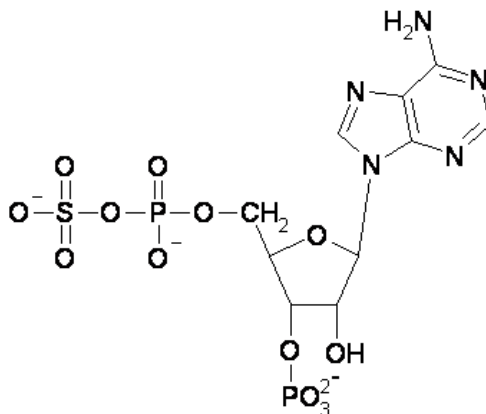
Хорошо известен синдром Жильбера – наследственное заболевание человека, связанное со снижением активности УДФ-глюкуронилтрансферазы в печени, которое приводит к повышению уровня непрямого (свободного) билирубина в сыворотке крови. Проявляется желтушностью склер и кожных покровов, неврологическими симптомами. Распространенность синдрома в популяции около 5 %.

Сульфатная конъюгация

Сульфатирование – наиболее древняя и относительно простая форма детоксикации. Является общей реакцией для большинства млекопитающих. В реакцию вступают 6 классов органических веществ (алкоголи, ароматические амины, фенолы, ариламины, гидроксиламины, некоторые стероиды). Сульфатные конъюгаты представляют собой хорошо водорастворимые эфиры серной кислоты.

Источником неорганического сульфата для сульфатной конъюгации является сера из пищи и процессы окислительного превращения цистеина.

Активной формой серной кислоты является 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат (ФАФС):

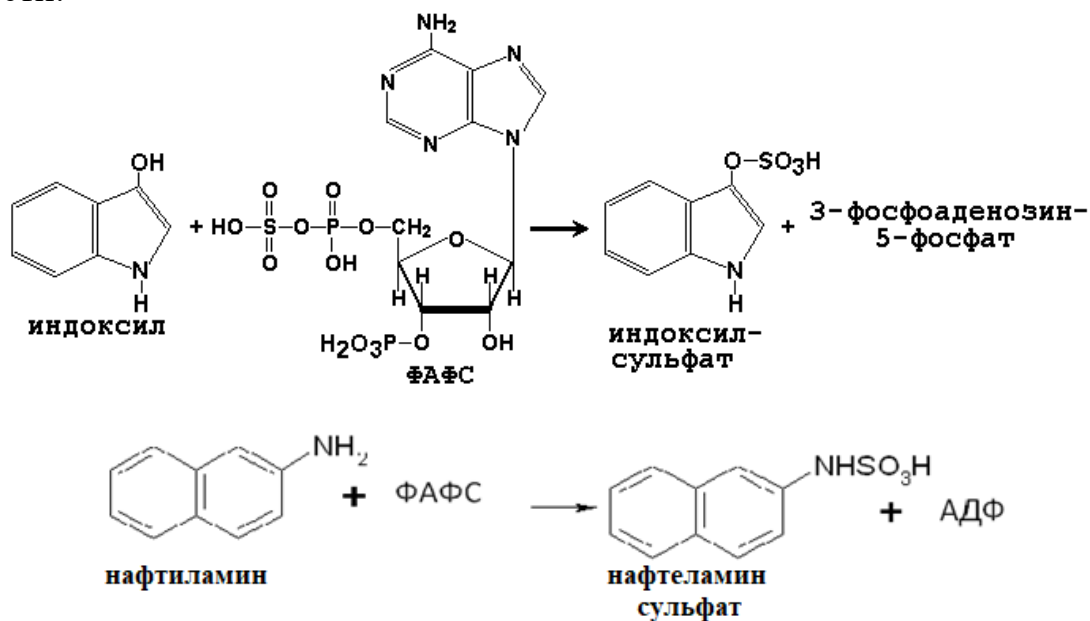


Катализируют конъюгацию локализованные в цитозоле сульфотрансферазы.

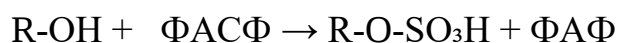
В организме человека сульфотрансферазы кодируются ≈ 10 генами, и разделены на три семейства: SULT1, SULT2 и SULT3. Идентифицировано около 40 изоферментов, которые локализованы в печени, толстой и тонкой кишке, легких, головном мозге, селезенке, плаценте, лейкоцитах. Изоферменты SULT1 имеют молекулярную массу около 34 кДа и состоят из 295 аминокислотных остатков. Например, изофермент SULT1A1 является термостабильным, катализирует сульфатирование некоторых фенолов (чаще с

одним бензольным кольцом и одной или несколькими гидроксильными группами), а также лекарственных веществ фенольной структуры (миноксидил, ацетаминофен, морфин, салициламид, изопреналин и др.).

В качестве примеров образования сульфатных конъюгатов можно привести:



Сульфатная конъюгация подвергаются и алифатические спирты, реакция протекает по следующей схеме:

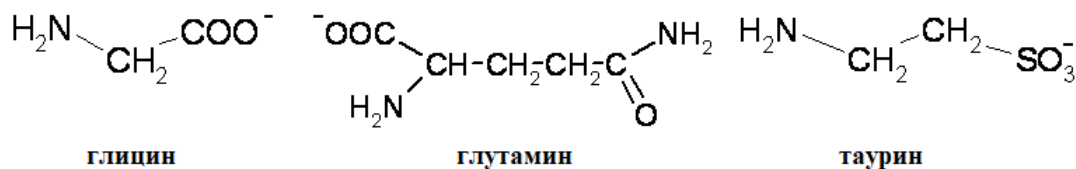


Субстраты для реакции часто являются продуктами реакции 1-й фазы. К ксенобиотикам, не требующим предварительной активации ферментами 1-й фазы, относятся первичные и вторичные спирты, желчные кислоты, катехолы, определенные ароматические амины, например, анилин, нафтиламин, конъюгирующие с ФАСФ с образованием соответствующих сульфатов.

В ряде случаев сульфатная конъюгация несовершенна, например, непрямой канцероген N-гидроксиацетиламинофлуорен после связывания с сульфатом спонтанно взаимодействует с белками и нуклеиновыми кислотами, оказывая канцерогенный эффект. Связывание этого же вещества с глюкуроновой кислотой ведет к образованию практически нетоксичного глюкуронидного конъюгата. Сульфатная и глюкуронидная конъюгации конкурируют за субстрат. Выбор пути метаболизма – индивидуально специфичен и может зависеть от концентрации субстрата, доступности кофакторов и т.д. Например, относительное содержание продуктов метаболизма ацетаминофена (парацетамол) зависит от дозы препарата и при низких дозах преобладают сульфатные конъюгаты, а с увеличением дозы происходит насыщение метаболического пути (возможно за счет ингибирования активности сульфотрансфераз) и снижение относительного количества сульфатных конъюгатов по сравнению с глюкуронидными.

Аминокислотная конъюгация

Пептидная конъюгация характерна для соединений, содержащих карбоксильные группы. Она осуществляет взаимодействие ксенобиотиков или их метаболитов с аминокислотами – глицином, глутамином, таурином, реже с другими:

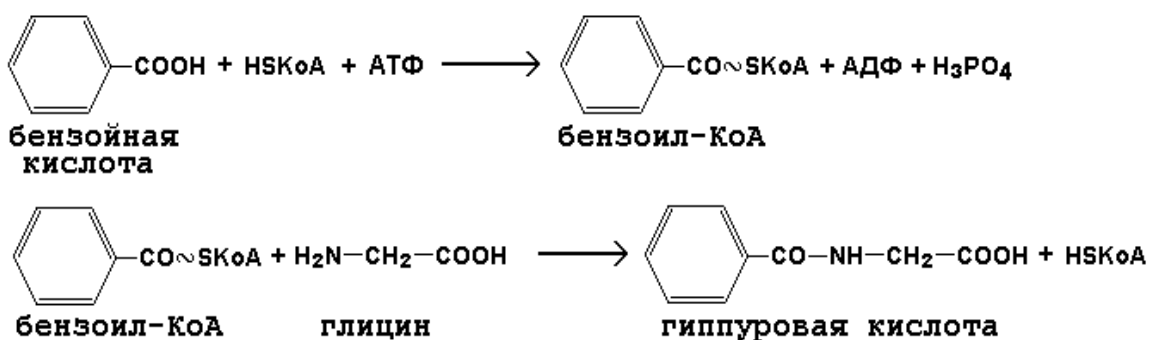


Особенность этой конъюгации заключается в том, что ксенобиотик вступает в реакцию в активной форме, в других типах конъюгации активируется эндогенная биомолекула.

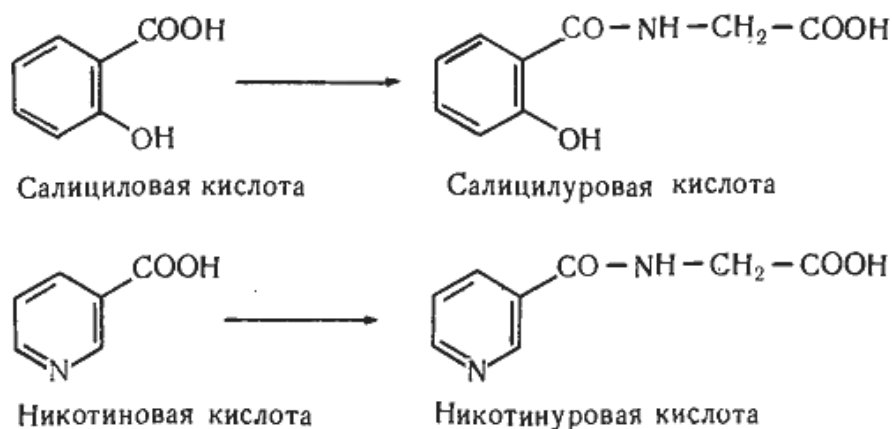
Глициновые конъюгаты бензойной, салициловой, никотиновой и других кислот имеют общее название гиппуровые кислоты.

Активация ксенобиотика осуществляется путем взаимодействия с HS-KoA. Катализируют аминокислотную конъюгацию:

- ацил-SKoA-синтетаза – синтезирует ацил-SKoA-производное ксенобиотика с затратой АТФ,
- ацилтрансфераза – переносит активированный ксенобиотик на соответствующую аминокислоту:



В конъюгацию с глицином вступают ароматические карбоновые кислоты, замещенные бензойной кислотой, и гетероциклические карбоновые кислоты. Примеры реакций конъюгации ксенобиотиков, содержащих карбоксильные группы, с глицином:

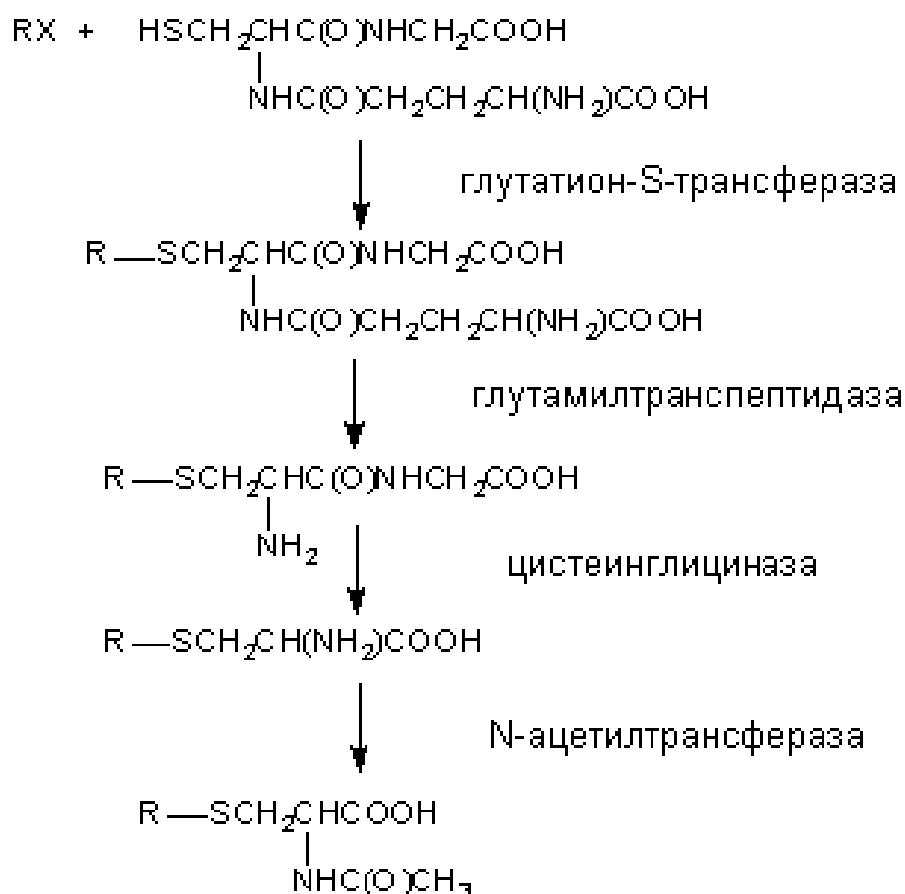


Конъюгация с глутатионом

Этот вид конъюгации широко распространен и многообразен. С глутатионом метаболизируют тысячи ксенобиотиков и ряд эндогенных метаболитов. Глутатион (γ-глутамилцистеинилглицин) ковалентно связывается с чужеродными соединениями, часто токсичными, в том числе, обладающими канцерогенным действием (эпоксидами, ареноксидами, гидроксиламинами, тяжелыми металлами). Среди лекарственных препаратов с пептидом конъюгируют этакриновая кислота (урегит), гепатотоксичный метаболит ацетаминофена – N-ацетилбензохинонимин, в результате образуется нетоксичный конъюгат.

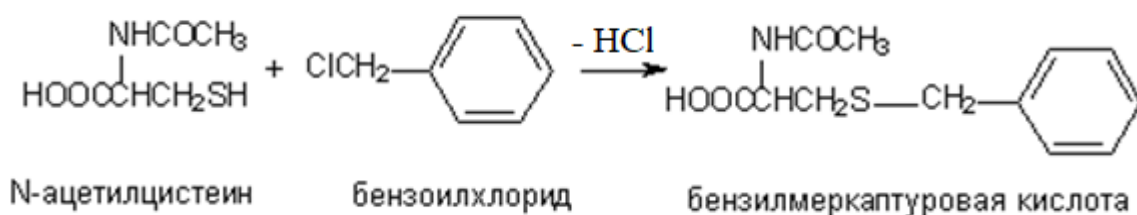
Процесс конъюгации катализируется глутатион-S-трансферазами. Основная реакция конъюгации идет с восстановленным глутатионом. Различные ксенобиотики (алкены и эпоксиды) присоединяются к тиольной (SH) группе остатка цистеина полной молекулы пептида своими электрофильными центрами: $R + GSH \rightarrow HRS\dot{G}$.

В дальнейшем конъюгат глутатиона с веществом подвергается ферментативному расщеплению. Вначале глутаминтранспептидаза отщепляет от комплекса глутамин, затем цистеинглиценаза отделяет глицин. В результате образуются конечные продукты – цистеиновые производные ксенобиотика, называемые меркаптуровыми кислотами, или тиоэстерами. Часто цистеиновые конъюгаты подвергаются ацетилированию при участии ацетил-SKоА:



Может также осуществляться нуклеофильное замещение по электрофильным атомам С (галоген и нитроалканы), N(тринитроглицерин), S (тиоцианаты и дисульфиды) или Р (метилпаратион): $\text{RX} + \text{GSH} \rightarrow \text{RSG} + \text{HX}$.

Органические вещества, содержащие в молекуле лабильные атомы водорода, галогенов и др., в организме могут взаимодействовать с SH-содержащими эндогенными молекулами: цистеином, ацетилцистеином:



Глутатион-S-трансферазы в основном локализируются в цитоплазме клеток, но также присутствуют в ядрах, митохондриях и ЭПР. Конкретное распределение может варьировать в зависимости от типа клетки, ткани и вида организма. Например, активность фермента в эритроцитах человека у различных индивидуумов различается в 6 раз, но не зависит от пола.

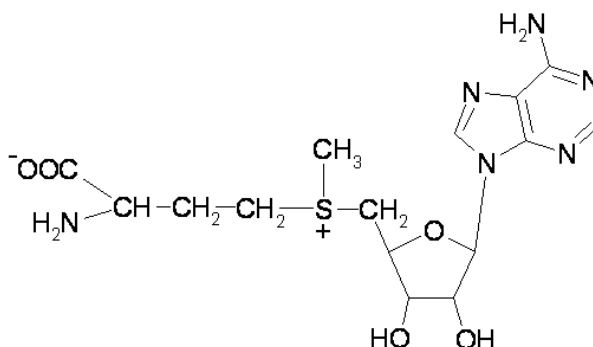
По идентичности аминокислотного состава у млекопитающих выделяют 6 классов глутатионтрансфераз (GST): α- (альфа-), μ- (мю-), κ- (каппа-), θ- (тета-), π- (пи-) и σ- (сигма-). В организме человека, в основном, экспрессируются ферменты классов μ (GSTM), θ (GSTT) и π (GSTP). Среди них наибольшее

значение в метаболизме ксенобиотиков играет класс GSTM, включающий 5 изоферментов. Так, GSTM1 экспрессируется в печени, почках, надпочечниках, желудке; слабая экспрессия найдена в скелетных мышцах и миокарде, не экспрессируется в печени плода, фибробластах, эритроцитах, лимфоцитах и тромбоцитах.

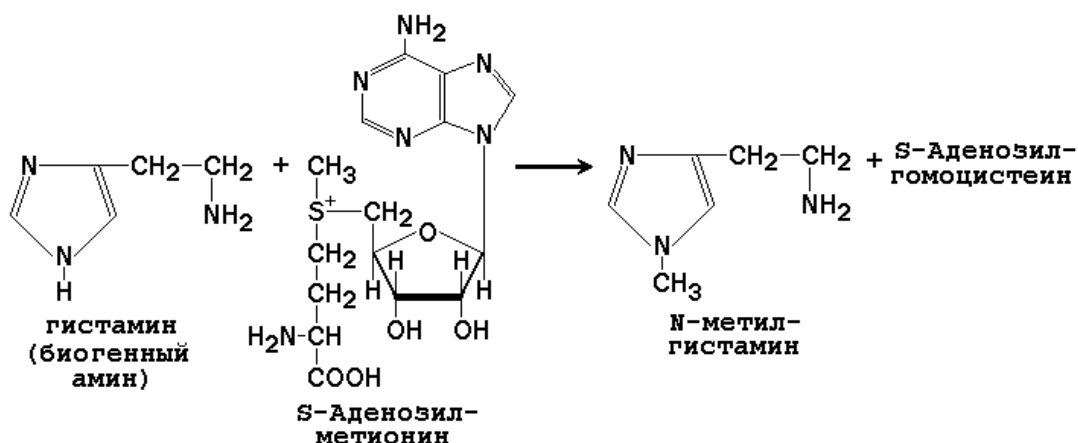
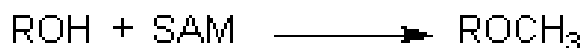
Метилирование

Метильная конъюгация ксенобиотиков выполняет важную роль, так как в результате связываются чрезвычайно реакционноспособные OH-, SH- и NH-группы. Однако после присоединения метильной группы продукт реакции не становится более гидрофильным.

В качестве донора метильной группы выступает метионин в форме S-аденозилметионина (SAM).



Перенос группы осуществляют соответствующие O-, S-, N-метилтрансферазы:



Реакции катализируются метилтрансферазами, которые метилируют как ксенобиотики, так и многие эндогенные молекулы, в частности ДНК, фосфатидилэтаноламин с образованием фосфатидилхолина и др. При участии КОМТ метаболизируют адреналин, норадреналин, дофамин, в результате образуются малоактивные 3-метоксипроизводные катехоламинов.

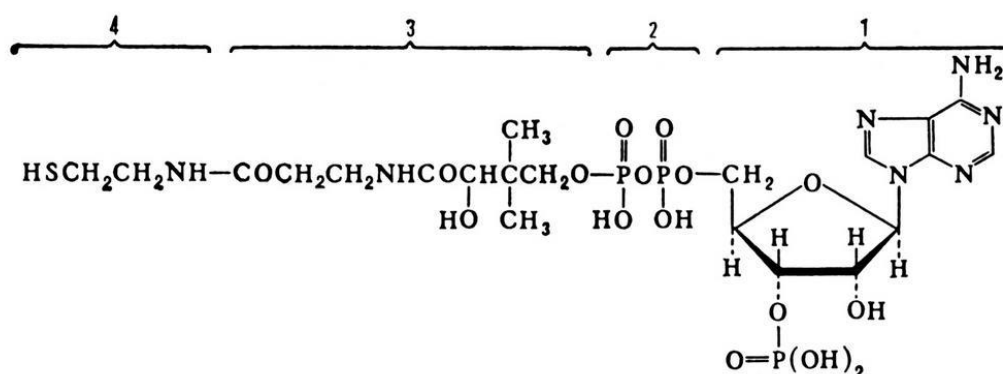
Для медицины наиболее важны реакции, катализируемые тиопурин-S-метилтрансферазой, которая S-метирует производные тиопурина,

образующегося в основном пути метаболизма цитостатических веществ из группы антагонистов пурина: 6-меркаптопурина, 6-тиогуанина, азатиоприна.

6-Меркаптопурин используют в составе комбинированной химиотерапии миелобластного и лимфобластного лейкоза, хронического миелолейкоза, лимфосаркомы, саркомы мягких тканей.

Ацетилирование

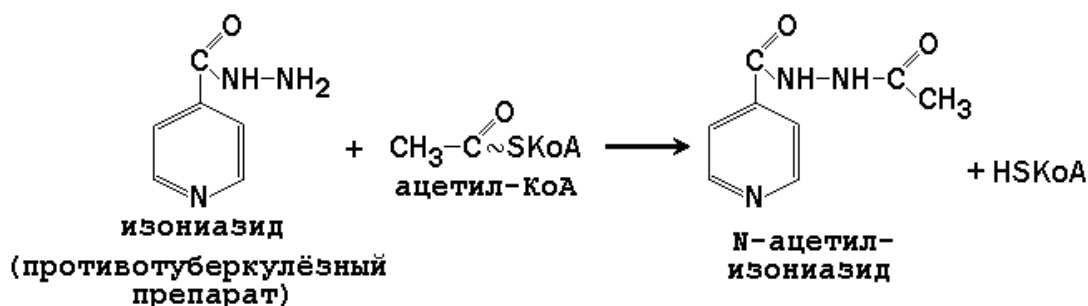
Аминогруппы ароматических соединений часто подвергаются ацетилированию. Уксусная кислота с помощью соответствующих ацетил-SКоА-трансфераз переносится на аминогруппу в форме ацетил-КоА, который включает: 1 – остаток адениловой кислоты; 2 – пиродифосфатную группу; 3 – остаток пантотеновой кислоты; 4 – остаток β-меркаптоэтанолamina:



Это также древний механизм адаптации. Ацетилированию подвергаются лекарства, бытовые и промышленные яды, имеющие ариламингруппы, сульфамидные группы, группы гидразина, алифатические амины. Многие ацетилированные ксенобиотики плохо растворимы в воде (например, сульфаниламиды).

Известны два семейства ацетилтрансфераз: NAT1 и NAT2:

- NAT1 ацетилируют небольшое количество ариламинов и не обладают генетическим полиморфизмом;
- NAT2 являются основными, имеют широкую субстратную специфичность, ацетилируют различные лекарственные вещества, в том числе изониазид и сульфаниламиды:



NAT1 и NAT2 синтезируются в различных органах, включая печень, кишечник и другие. Активность NAT1 наиболее высока в тканях мочевого пузыря, прямой кишки и легких.

Для персонализированной медицины важно изучение полиморфизма NAT, что позволяет предсказывать реакцию человека на лекарственный препарат и адаптировать схему лечения.

В зависимости от скорости протекания N-ацетилирования в человеческой популяции выделяются 2 группы:

1 – относятся лица, метаболизирующие тест-препараты с высокой скоростью (быстрое ацетилирование),

2 – относятся лица с низкой скоростью процесса (медленное ацетилирование).

Установлено генетическое наследование фенотипа. Медленный тип – простой менделевский рецессивный признак, быстрый тип – доминантный.

Лица с медленным типом ацетилирования (медленные ацетиляторы) являются гомозиготами (gg) по аутосомному рецессивному гену (g), а быстрые ацетиляторы – гомозиготами (RR) или гетерозиготами (Rr) по доминантному гену.

В разных этнических группах частота фенотипов ацетилирования различна. У представителей монголоидной расы преобладают лица с быстрым типом ацетилирования. Среди европейцев быстрый и медленный типы встречаются примерно с одинаковой частотой. В российской популяции соотношение примерно 40 % и 60 % соответственно.

Превалирование медленного типа ацетилирования описано у пациентов с туберкулезом, острым вирусным гепатитом, ревматоидным артритом, системными заболеваниями соединительной ткани, в частности, для лекарственной или системной красной волчанки.

1.12. Биотрансформация лекарственных веществ

Лекарственные препараты – это химические вещества естественного происхождения или разработанные фармакологами и используемые для лечения, остановки или предотвращения заболеваний, облегчения симптомов, течения болезни, помощи в диагностике заболеваний. Достижения в области медицины позволили врачам излечивать многие заболевания и спасать жизни.

Лекарственные вещества могут оказывать:

- местное действие. Проявляется непосредственно в месте применения, например, на коже или слизистых оболочках;

- резорбтивное действие. Лекарство всасывается в кровь и распространяется по всему организму, оказывая эффект на различные органы и системы;

- прямое действие. Происходит в органах, с которыми лекарство непосредственно контактирует;

- косвенное действие. Ответ организма на изменения, вызванные лекарством;

- тонизирующее действие. Нормализация сниженной функции органа;

- возбуждающее действие. Увеличение функции органа выше нормы;

- успокаивающее действие. Снижение повышенной функции органа до нормы;
- угнетающее действие. Снижение функции органа ниже нормы;
- парализующее действие. Полное прекращение функции органа.

Лекарства различаются по направленности действия:

- этиотропное – направлено на устранение причины болезни;
- патогенетическое – направлено на устранение механизмов развития болезни;
- симптоматическое – направлено на устранение симптомов болезни;
- заместительное – направлено на восполнение дефицита естественных веществ;
- профилактическое действие – направлено на предупреждение болезни.

Лекарственные вещества, как и другие ксенобиотики, всасываются, поступают в органы и ткани, взаимодействуют с клеточными мембранами, внутриклеточными структурами, эндогенными веществами, реализуют свое действие, подвергаются метаболизму, удаляются из организма.

В фармакологии выделяют два раздела: фармакодинамика и фармакокинетика.

Фармакодинамика изучает биохимические, генетические и физиологические механизмы действия лекарственного вещества, локализацию процесса в организме. Другими словами – это то, как вещество влияет на организм.

Механизмы действия лекарственных веществ включают взаимодействие с рецепторами, изменение проницаемости клеточных мембран, влияние на ферменты и другие процессы в организме. Лекарства:

- могут действовать как агонисты, имитируя эффекты естественных веществ, или как антагонисты, блокируя рецепторы и предотвращая действие этих веществ;
- могут влиять на транспорт веществ через клеточные мембраны, изменяя проницаемость для ионов и других молекул, что влияет на процессы внутри клетки;
- способны активировать или ингибировать ферменты, что приводит к изменению метаболических процессов в клетках и тканях.
- могут влиять на всасывание, распределение, метаболизм и выведение друг друга, что может изменять их эффективность и токсичность;
- противоопухолевые препараты способны взаимодействовать с ДНК, вызывая повреждения, которые приводят к гибели опухолевых клеток.

Фармакокинетика изучает всасывание, распределение в организме, депонирование, метаболизм и выведение лекарственного вещества. Иначе говоря – это то, как организм действует на вещество.

Всасывание, распределение, биотрансформация лекарственных веществ, их выведение протекает по тем же механизмам, как и других ксенобиотиков. В биотрансформации лекарств также выделяют 1-й и 2-й фазы.

Общая теория метаболизма лекарственных веществ в организме основывается:

- на взаимодействии лекарственных веществ с естественными процессами метаболизма и регуляции;

на функционировании ферментных систем, участвующих в их биотрансформации, на разных этапах контакта с организмом.

При изучении метаболизма лекарственных веществ учитывают следующие факторы:

- индивидуальную чувствительность организма к лекарственным средствам и эффективность фармакотерапии;

- взаимодействие лекарственных препаратов друг с другом и эндогенными метаболитами;

- экзо-и эндогенное влияние различных факторов на синтез ферментов биотрансформации лекарств.

Путь биотрансформации определяется наличием в организме того или иного фермента и зависит от его активности.

При увеличении активности ферментов биотрансформации метаболизм лекарств может ускоряться или степень и продолжительность фармакологического действия может снижаться.

Вещества, угнетающие синтез и активность ферментов биотрансформации (в том числе и некоторые лекарственные вещества), могут снижать интенсивность метаболизма лекарств, что приводит к росту их фармакологической активности и, в большинстве случаев, повышению токсичности.

В процессе метаболизма может происходить:

Активация эффекта лекарственного препарата:

- при освобождении в ходе метаболизма функциональных групп (от которых зависит, в основном, биологическая активность), заблокированных в исходном препарате. Например, деметилирование имипрамина с образованием деметилиимипрамина. Именно деалкилированный продукт обладает выраженной способностью ослаблять депрессивное состояние при психических расстройствах;

- при приобретении в ходе метаболизма функциональных групп, необходимых для проявления активности вещества.

Модификация основного эффекта:

- например, ипразид – антидепрессант, в результате деалкилирования превращается в изониазид, обладающий противотуберкулезным действием;

- кодеин (метилморфин) проявляет противокашлевый эффект, при деметилировании в организме превращается в морфин, который обладает болеутоляющим и наркотическим действием.

Дезинтоксикация – является защитной реакцией на токсическое влияние веществ. Например, фенол – токсическое вещество, а продукт его конъюгации в фенолсульфат – нетоксическое;

Токсификация – проявляется в виде усиления побочного действия вещества. Иногда токсификация происходит вследствие синтеза из вводимых веществ в ходе биотрансформации очень токсических соединений. Летальный (смертельный) синтез из чужеродного вещества приводит к блоку в обмене веществ и гибели организма. Например, вводимый фторацетат в тканях поступает в цикл Кребса и из него образуется токсический фторцитрат, который блокирует аконитатгидратазу и работу цикла Кребса. Жаропонижающее, болеутоляющее, противовоспалительное средство – фенацетин превращается в парафенетидин, вызывающий гипоксию за счет образования метгемоглобина.

Явление токсификации используется при создании препаратов для борьбы с грызунами и другими вредителями.

Одно и то же лекарственное вещество на разные организмы действует по-разному и может:

- вызывать необходимый фармакологический эффект;
- вызывать слабую фармакологическую реакцию или даже полное ее отсутствие, что обусловлено быстрым метаболизмом вещества и необходимая эффективная концентрация не достигается;
- приводить к необычно сильной фармакологической реакции, связанной с накоплением лекарственного средства, если оно очень медленно метаболизирует, а больной продолжает его принимать. Это может привести к возникновению так называемых лекарственных болезней (аллергические реакции, отравление).

Действие любого фармпрепарата принято выражать определенными показателями, например, периодом его полувыведения из организма. Показатель определяется после однократного приема лекарственного вещества в стандартной дозе и выражается количеством часов, за которые из организма выводится половина поступившей дозы ($T_{1/2}$).

Периоды полувыведения разных лекарственных веществ колеблются в широких пределах в зависимости от их химической структуры, липофильности, способности связываться с белками, скорости биотрансформации и выведения из организма, и т.д. Имеются таблицы с данными $T_{1/2}$ для основных фармпрепаратов.

Например, для дикумарола $T_{1/2}$ = от 25 до 72 ч, антипирина – от 6,9 до 14,9 ч, сульфаметоксазола – 8–10 ч, сульфалена – 65–94 ч, бутадиона – от 1,9 до 4,1 суток, неомидина – 6–8 ч, ацетилсалициловой кислоты – 4 ч, фенobarбитала – 8 ч, тиазидов – 12–18 ч, бутаимидов – 8–12 ч и т.д.

В зависимости от места превращения выделяют полостной (энтеральный), внеклеточный (гуморальный) и клеточный (тканевый) метаболизм лекарств.

Полостной, или энтеральный, метаболизм лекарств осуществляется гидролитическими ферментами, поступающими в полость желудочно-кишечного тракта. Ксенобиотики, имеющие в молекуле пептидные, карбоксиэфирные, гликозидные, амидные, фосфамидные связи подвергаются

гидролизу под действием протеолитических и липолитических ферментов, эстераз, фосфамидаз, ферментов, гидролизующих гликозидные связи, др. В результате превращений могут открыться группы, необходимые для проявления активности, или произойдет инактивация лекарственного вещества. В этом случае лекарство вводят в организм, минуя желудочно-кишечный тракт.

Внеклеточный, или гуморальный метаболизм лекарств имеет место во внеклеточных жидкостях (после всасывания препарата и во время циркуляции его в организме): в крови, лимфе, спинномозговой и собственно межклеточной жидкостях. В этом случае превращения ограничиваются гидролизом поступивших препаратов. В крови и других жидкостях эту роль выполняют протеиназы, различные эстеразы (например, псевдохолинэстераза, фосфатазы и др.), аминоксидазы, алкогольдегидрогеназа и др. Роль гуморального звена метаболизма в общем объеме превращений препарата не очень велика, однако если метаболизм приводит к инактивации лекарственного вещества, то это звено приходится учитывать.

Клеточный (тканевый) метаболизм лекарств. В клетках осуществляется все многообразие реакций биотрансформации лекарственных препаратов. Прежде чем подвергнуться действию ферментных систем, вещество транспортируется от места введения к клеткам и проникает внутрь через клеточные мембраны. Лекарства, как и другие ксенобиотики, транспортируются с помощью тех же механизмов, что и биогенные вещества. Низкомолекулярные незаряженные лекарственные препараты проникают внутрь клеток главным образом путем простой и облегченной диффузии, а крупные молекулы – посредством эндоцитоза. Если ксенобиотики являются синтетическими производными биогенных веществ, то возможен активный транспорт с использованием систем транспорта природных соединений.

Биотрансформация лекарств зависит от многих факторов. К их числу относятся:

- 1) генетические и внутривидовые различия;
- 2) физиологические, биохимические (возраст; наличие, активность и соотношение ферментных систем; половые различия; гормональный фон; беременность; питание; патологические состояния, заболевания; длительное применение лекарств);
- 3) окружающей среды (стресс; ионизирующая радиация, ультрафиолетовое излучение; стимулирование метаболизма чужеродными соединениями; ингибирование метаболизма чужеродными соединениями).

Большую роль играют также органоспецифические и нейроэндокринные факторы, способы поступления (введения) и др.

Генетические факторы. Генетические дефекты ферментов биотрансформации лекарственных препаратов приводят к снижению скорости метаболизма лекарств и повышению их активности и токсических свойств. Например, врожденный дефект фермента ариламин-N-ацетилтрансферазы, инактивирующей изониазид на этапе образования ацетильного конъюгата,

приводит к усилению токсичности этого препарата. Это необходимо учитывать при назначении изониазида больным туберкулезом. Индивидуальные различия в метаболизме ряда препаратов и в реакциях организма на препараты могут объясняться полиморфизмом генов, т.е. существованием в популяции изоформ ферментов, что приводит к разной скорости биотрансформации лекарственных веществ.

В ряде исследований была показана связь между полиморфизмом генов ферментов биотрансформации и риском развития и тяжестью протекания широкого спектра онкологических заболеваний, ряда многофакторных патологий, таких как бронхиальная астма, болезнь Паркинсона, хронический панкреатит и др. В результате изучения полиморфизма генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков выявляются генетические маркеры риска, ассоциированные с предрасположенностью к токсическому гепатиту, и др. маркеры, позволяющие предопределить специализацию спортсменов, маркеры устойчивости рабочих к влиянию полициклических ароматических углеводородов и других проканцерогенов.

Изучение предрасположенности к развитию профессиональных заболеваний на основе молекулярно-генетического анализа генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков позволяет установить причинную связь действующего производственного химического фактора с возникающими патологическими изменениями в организме рабочих. В этой связи варианты генетического полиморфизма ферментов биотрансформации ксенобиотиков, ассоциированные с предрасположенностью к развитию профессиональной и производственно обусловленной патологией, являются основанием для выделения группы работающих лиц, обладающих повышенной чувствительностью к воздействию производственных химических факторов.

Возрастные факторы. Чувствительность к лекарственным средствам зависит от возраста. У эмбриона и новорожденного ребенка ферментные системы обезвреживания лекарственных веществ функционируют слабо, так как клетки печени вырабатывают малое количество ферментов, недостаточно функционируют почки, повышена проницаемость гематоэнцефалического барьера, недостаточно развита ЦНС. Например, низкая скорость глюкуронидной конъюгации у новорожденных приводит к нарушению обезвреживания билирубина и вызывает развитие физиологической желтухи. Очень токсичен левомецитин, так как в печени малоактивны ферменты его биотрансформации.

В пожилом возрасте понижается активность ферментных систем, катализирующих метаболизм экзогенных химических соединений. Снижается функциональная активность печени, нарушается скорость экскреции препаратов почками. В целом чувствительность к большинству лекарственных средств в пожилом возрасте повышена, в связи с чем их доза должна быть снижена.

Половые факторы. В опытах на животных показано, что биотрансформация чужеродных соединений более интенсивно протекает у самцов, чем у самок. Вероятно, это связано с тем, что андрогены являются индукторами многих ферментов монооксигеназной цепи окисления и конъюгации ксенобиотиков, а эстрогены угнетают активность этих ферментов.

Диетические факторы. Белковое голодание приводит к нарушению синтеза ферментов эндоплазматического ретикулума и снижению скорости микросомального окисления и конъюгации ксенобиотиков. При недостатке белка в питании могут наблюдаться признаки лекарственной интоксикации. Дефицит липотропных факторов также может быть причиной нарушения процессов биотрансформации ксенобиотиков.

Способ введения. При парентеральном способе поступления скорость метаболизма лекарств, чаще всего, значительно ниже, чем при энтеральном. В случае парентерального введения лекарство поступает в общий кровоток минуя печень. Поэтому для оказания терапевтического эффекта при парентеральном введении требуется меньшее количество лекарственного препарата, а эффект наступает быстрее. При сублингвальном и трансбуккальном способах введения вещество также сразу поступает в кровоток минуя печень. Эффект наступает быстрее и используется меньшая концентрация препарата.

Скорость и степень всасывания лекарственных соединений в желудочно-кишечном тракте зависит:

- от величины pH среды. По этой причине антацидные препараты уменьшают всасывание витамина А, хинидина, антикоагулянтов непрямого действия и некоторых других лекарственных средств.

- изменения перистальтики:

- ускорение опорожнения желудка под влиянием метоклопрамида (противорвотное средство) повышает скорость всасывания дигитоксина и других хорошо всасывающихся в кишечнике веществ;

- стимуляция перистальтики кишечника антихолинэстеразными, холиномиметическими или слабительными средствами уменьшает всасывание большинства лекарственных средств, особенно медленно всасывающихся из кишечника (кортикостероидов, дигоксина и др.);

- угнетение перистальтики кишечника, например под влиянием м-холиноблокаторов, способствует улучшению всасывания перечисленных выше лекарственных средств.

Факторы окружающей среды. Существенное влияние на метаболизм лекарственных веществ в организме оказывают факторы окружающей среды, такие как температура, состав пищи, ионизирующая радиация, различные химические вещества (ксенобиотики), в том числе и сами лекарственные вещества.

Обязательные требования к лекарственному препарату обеспечиваются путем проведения верификации и валидации.

Верификация лекарственного препарата – это процесс подтверждения соответствия препарата установленным требованиям, в том числе, требованиям к его качеству, эффективности и безопасности. Проще говоря, это проверка того, что препарат является именно тем, за что он себя выдает, и что он соответствует всем необходимым стандартам качества.

Валидация лекарственного препарата – это процесс, который доказывает, что определенный процесс производства или процедура, используемые в фармацевтической промышленности, последовательно приводят к результатам, соответствующим заранее установленным критериям качества, безопасности и эффективности, и что лекарственный препарат пригоден для предполагаемого использования. Это не просто формальность, а фундаментальный процесс, обеспечивающий стабильность и эффективность производственных операций.

Простой способ запомнить разницу между валидацией и верификацией заключается в том, что валидация подтверждает, что «вы создали правильный продукт», а верификация подтверждает, что «вы создали продукт таким, каким и намеревались его сделать».

Виды несовместимости лекарственных препаратов

Фармацевтическая несовместимость лекарственных средств – полная или частичная потеря терапевтического действия лекарства, происходящая при его изготовлении или хранении в результате взаимодействия ингредиентов, входящих в состав лекарства. К фармацевтической несовместимости лекарственных средств относят также утрату фармакопейного вида лекарства, затрудняющие или делающие невозможной точную дозировку его действующих веществ.

Фармацевтическую несовместимость делят на физическую и химическую.

Физическая несовместимость лекарственных средств обуславливается физическими свойствами ингредиентов, входящих в состав лекарства. Она может вызываться нерастворимостью, отсыреванием ингредиентов и другими процессами.

Химическая несовместимость обусловлена химическим взаимодействием компонентов лекарства, приводящим к снижению или полной утрате терапевтической активности лекарства. Это взаимодействие часто заметно визуально, так как сопровождается изменениями внешнего вида лекарств (появление или изменение окраски, помутнение или выпадение осадка, выделение газообразных продуктов, воспламенение или даже взрыв). Указанные явления свидетельствуют о глубоких химических превращениях ингредиентов лекарства.

Фармакологическая несовместимость проявляется при сочетании лекарственных веществ, действующих антагонистически, либо взаимно ослабляющих действие друг друга или усиливающих побочное или токсическое действие друг друга. Фармакологическая несовместимость лекарственных веществ во многих случаях исключает возможность их одновременного применения.

Фармакологическая несовместимость может возникать:

- а) при физическом или химическом взаимодействии лекарственных веществ друг с другом в желудочно-кишечном тракте, а также с составными частями пищи, пищеварительных соков и кишечной микрофлоры;
- б) в результате влияния одних препаратов на всасывание, распределение в тканях и элиминацию других препаратов;
- в) при полном антагонизме – ослаблении или полном устранении всех эффектов лекарственного препарата под влиянием других препаратов;
- г) под влиянием одновременного или последовательного применения нескольких лекарственных средств, метаболизирующих одинаковыми путями – биотрансформационная несовместимость;
- д) при взаимодействии на этапе выведения.

Фармакологическая несовместимость может возникнуть на этапе транспорта лекарственных средств кровью и лимфой. Чаще всего она обусловлена конкурентным вытеснением одного лекарственного препарата другим из комплексов с транспортными белками плазмы крови. Это приводит к повышению концентрации свободной (активной) фракции вытесняемого препарата и вследствие этого – усилению его эффектов. Имеет место при комбинированном применении препаратов, которые почти полностью связываются с транспортными белками. Такой вид несовместимости наблюдается при применении антикоагулянтов непрямого действия с сульфаниламидными препаратами длительного действия; синтетических противодиабетических средств с бутадioneм, клофибратом или производными салициловой кислоты, и т. д.

Биотрансформационная несовместимость лекарственных веществ может проявляться как в ускорении, так и в замедлении процессов биотрансформации.

Ускорение биотрансформации лекарств под действием индукторов микросомальных ферментов установлена, например для:

- а) лекарственных препаратов (фенобарбитал, бутадione, реопирин, амидопирин и др.);
- б) мужских половых гормонов (тестостерон);
- в) полициклических ароматических углеводородов (3,4-бензпирен, 3-метилхолантрен);
- г) хлорированных инсектицидов;
- д) этанола и никотина (при длительном употреблении).

Например, при одновременном назначении фенобарбитала и варфарина требуется использование более высоких доз антикоагулянта, так как он в этих условиях быстро инактивируется. Если резко прекратить введение фенобарбитала, то противосвертывающий эффект варфарина быстро нарастает и приводит к развитию кровотечений. Поэтому достаточно опасно применять барбитураты в сочетании с антикоагулянтами типа варфарина.

Замедление биотрансформации лекарств под действием ингибиторов ферментов, участвующих в метаболизме ксенобиотиков. В этом случае концентрация лекарственных веществ в крови возрастает. Примеры веществ – ингибиторов биотрансформации:

- а) тетрахлорметан (CCl_4), трихлорметан (CHCl_3), фторотан (1,1,1-трифтор, 2-хлор, 2-бромэтан);
- б) фосфорорганические инсектициды;
- в) монооксид углерода (CO), озон, азиды, фосфины;
- г) антигистаминный препарат циметидин.

Замедление биотрансформации могут вызывать продуктами реакции. Например, в результате P450-3A4-зависимого N-деметиличивания и последующего неферментативного окисления некоторых препаратов образуются нитрозо-метаболиты, ингибирующие изофермент P4503A4, который осуществляет N-деметиличивание.

Замедление биотрансформации может быть связано со снижением концентрации ферментов, метаболизирующих лекарственные средства. Ее вызывают вещества, тормозящие синтез ДНК и РНК. Например, антибиотики – пурамицины, актиномицины Д.

Некоторые препараты способны ингибировать немикросомальное окисление ксенобиотиков. К ним относятся, в частности, ингибиторы моноаминоксидазы (ипразид, ниламид и др.), обладающие свойством тормозить разрушение катехоламинов, тирамина, серотонина и их синтетических аналогов. Больным, принимающим ингибиторы моноаминоксидазы, не рекомендуют одновременно применять симпатомиметики, трициклические антидепрессанты, употреблять в пищу сыры, пиво, печень птиц и другие продукты, содержащие тирамин.

Ингибитор ксантиноксидазы – аллопуринол (назначают при подагре) тормозит метаболизм синтетических производных ксантина, например, 6-меркаптопурина, усиливая их активность и токсичность.

Фуранокумарины, содержащиеся в соках цитрусовых, прежде всего в грейпфрутовом, подавляют активность изоформы P450-3A, тем самым могут оказывать влияние на эффективность принимаемых одновременно с соками лекарственных препаратов. К несовместимым с грейпфрутом веществам относятся многие лекарства от рака, противозачаточные средства, антибиотики, препараты от давления, статины, обезболивающие нестероидные препараты, антидепрессанты.

Иммунологически активные белки, такие как интерфероны, интерлейкины (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-10), различные лиганды (например, фактор некроза опухоли-альфа), вырабатываемые в организме млекопитающих в ответ на инфекционные или воспалительные процессы, способны ингибировать активность ферментов P450, что может привести к увеличению концентрации в крови лекарственных средств, являющихся субстратами цитохрома, и развитию токсических эффектов.

На активность Р450 оказывают влияние витамины-антиоксиданты, в частности, аскорбиновая кислота. Витамин увеличивает восстановительный ток Р450 в присутствии маркерных субстратов (рисунок 1.23а). Активирующее влияние носит концентрационно-зависимый характер. Избыточное количество антиоксиданта снижает активность Р-450 (рисунок 1.23б).

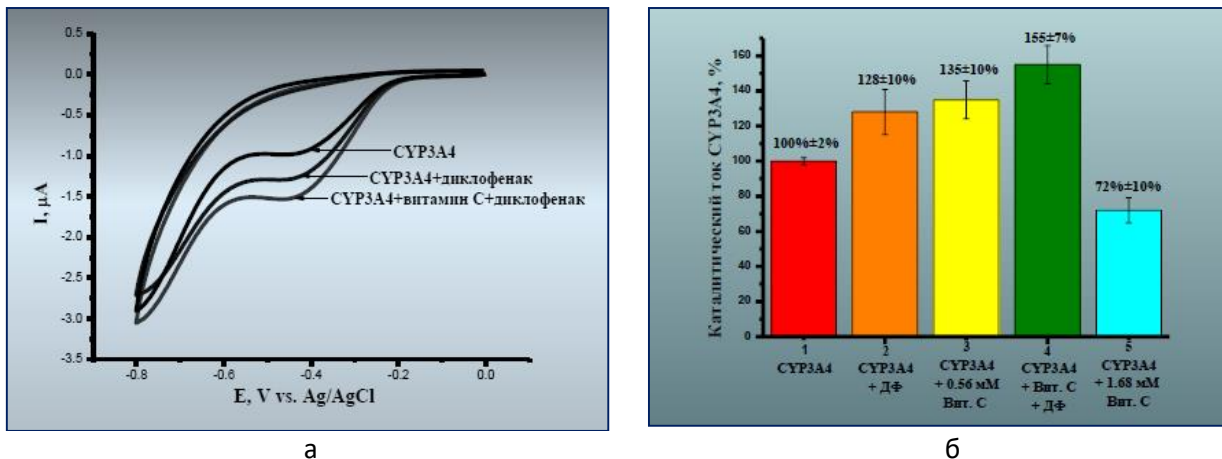


Рисунок 1.23 – Циклические вольтамперограммы взаимодействия витамина С и диклофенака– а. Концентрационно-зависимые эффекты витамина С – б.

Несовместимость лекарственных веществ можно также разделить на фармакокинетический и фармакодинамический типы.

Фармакокинетический тип несовместимости лекарственных веществ наблюдается при сдвиге рН мочи в кислую сторону под влиянием аммония хлорида или больших доз аскорбиновой кислоты, при этом ускоряется выведение с мочой слабощелочных препаратов (хинидина, аймалина и др.) и их фармакологическое действие укорачивается. Сдвиг рН мочи в щелочную сторону, например, при приеме натрия гидрокарбоната или диакарба, приводит к тому, что реабсорбция и фармакологическое действие слабощелочных препаратов пролонгируются.

Фармакодинамический тип несовместимости лекарственных веществ может возникнуть в результате взаимодействия на уровне рецепторов при одновременном назначении агонистов и антагонистов одного типа рецепторов (например, м-холиноблокаторы предупреждают или ослабляют эффекты м-холиномиметиков), или являться результатом влияния лекарственных веществ на разные этапы синаптической передачи, что приводит к нежелательному ее усилению, например, при взаимодействии ингибиторов моноаминоксидазы (ниаламида и др.) с симпатомиметиком эфедрином.

Фармакологами разработаны таблицы несовместимости лекарств. Они предназначены для выявления возможных неблагоприятных взаимодействий между различными лекарственными препаратами, а также между лекарствами и другими веществами, поступающими в организм (например, пища, алкоголь, биологически активные добавки). Использование таких таблиц помогает

предотвратить снижение эффективности лечения, усиление побочных эффектов или появление новых нежелательных реакций, повысить эффективность лечения.

1.13. Выведение ксенобиотиков из организма

Удаление ксенобиотиков из клетки

Фаза эвакуации. В этой фазе участвуют все виды пассивного и активного транспорта через плазматическую мембрану, которые обеспечивают поступление и выведение из клетки эндогенных метаболитов и продуктов их деградации, так и ксенобиотиков. Важная роль в транспорте чужеродных соединений отводится суперсемейству мембранных транспортных систем – АВС-белкам (у человека открыто ≈ 50 АВС-белков, разделенных на 7 семейств). В суперсемейство входят белки, переносящие через мембрану весьма разные субстраты – от неорганических ионов до полисахаридов и белков. Так, в регуляции абсорбции, распределении и экскреции ксенобиотиков участвуют мультиспецифичный переносчик органических анионов (*MRP*) и *P*-гликопротеины (*P-gp* белки),

MRP способны переносить лиганды, конъюгированные с глутатионом, глюкуроновой кислотой, сульфатом. Таким образом, 2-я фаза метаболизма не только превращает вещества в более растворимые в воде, но и «подготавливает» к активному транспорту за пределы клетки с участием определенных транспортных систем.

Транспортеры органических анионов и катионов осуществляют выведение (элиминацию) гидрофильных ксенобиотиков и их метаболитов печенью – в желчь, почками – в мочу.

P-gp транспортируют в основном жирорастворимые ароматические соединения с молекулярной массой 300 - 500 дальтон и амфифильные молекулы, содержащие катионную аминогруппу.

Активация или ингибирование транспортеров может существенно отразиться на метаболизме ксенобиотиков. Индукция транспортеров может приводить к повышению концентрации химического вещества в плазме крови и снижению в клетке в зависимости от функций данного транспортера. Один и тот же индуктор может повышать активность фермента или транспортера у различных индивидуумов в 15-100 раз.

P-gp белок (транспортная Р-АТФ-аза) – фосфогликопротеин с молекулярной массой 170 кД присутствует в плазматической мембране клеток многих тканей, в частности печени, почек и кишечника. Было установлено, что при химиотерапии злокачественных процессов начальная эффективность лекарства часто постепенно снижается, развивается множественная лекарственная устойчивость, т.е. устойчивость не только к данному лечебному препарату, но и целому ряду других лекарств. Это происходит потому, что

противоопухолевые лекарства индуцируют синтез *P*-гликопротеина, глутатионтрансферазы и глутатиона, и быстрее выводятся из клетки. Уменьшение количества лекарства естественно снижает эффективность его применения при химиотерапии онкологических заболеваний (рисунок 1.24).

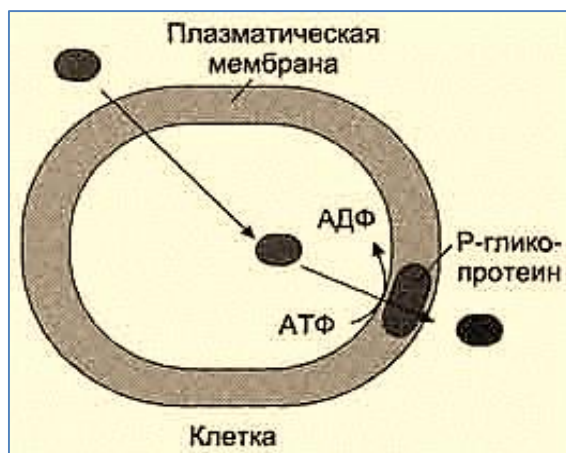


Рисунок 1.24 – Функционирование *P*-гликопротеина. Черный овал – противоопухолевое лекарство (гидрофобное вещество).

Получены и используются вещества, регулирующие синтез *P-gp* белков, что повышает эффективность химиотерапии.

Удаление ксенобиотиков из организма

Основными органами экскреции являются легкие (для летучих соединений), почки, печень, в меньшей степени слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта, кожа и ее придатки (потовые, сальные железы), молочные железы.

Легочная экскреция. Газы и пары летучих веществ выделяются через легкие в соответствии с градиентом их парциального давления между кровью и альвеолярным воздухом. Закономерности экскреции газообразных (парообразных) веществ полностью идентичны закономерностям их поступления через легкие.

С выдыхаемым воздухом из организма в неизмененном виде выделяются оксиды углерода, сероводород, этанол, диэтиловый эфир, ацетон, бензол, бензин, некоторые хлорпроизводные углеводородов, а также летучие метаболиты бензола, тетрахлорметана, метанола, этиленгликоля и др.

Почечная экскреция. Почки – важнейший орган выделения. Через этот орган выводятся продукты обмена веществ, многие ксенобиотики и продукты их метаболизма. Благодаря хорошему кровоснабжению, находящиеся в крови вещества, подлежащие выведению, быстро поступают в почки, а затем и выделяются с мочой. В основе процесса лежат три механизма: фильтрация через гломерулярно-капиллярный барьер; секреция эпителием почечных канальцев; • реабсорбция клетками эпителия.

Через почки протекает около 700 мл плазмы крови в минуту, из которых 20% (125—130 мл/мин) отфильтровывается через гломерулярно-капиллярный барьер. Более 99% отфильтрованной жидкости реабсорбируется в почечных канальцах. При этом концентрация растворенных в моче веществ возрастает в 100 раз. Хорошо растворимые в липидах соединения практически полностью реабсорбируются в кровь и из организма с мочой не выводятся.

Экскреция через почки слабых кислот и оснований во многом определяется рН первичной мочи. Так, выведение слабых оснований усиливается при подкислении мочи (преобладает ионизированная форма оснований – затруднена реабсорбция их в канальцах); выведение слабых кислот усиливается при подщелачивании мочи (преобладает ионизированная форма кислот).

О механизмах, лежащих в основе выведения ксенобиотиков через почки, можно судить и по соотношению их концентраций в моче и плазме крови. Если это соотношение = 1, в % близко к 100 (по другим данным – 130) – в основе процесса лежит фильтрация; если существенно меньше – фильтрации сопутствует реабсорбция значительной части ксенобиотика; если больше – превалируют механизмы фильтрации и секреции ксенобиотика (рисунок 1.25).

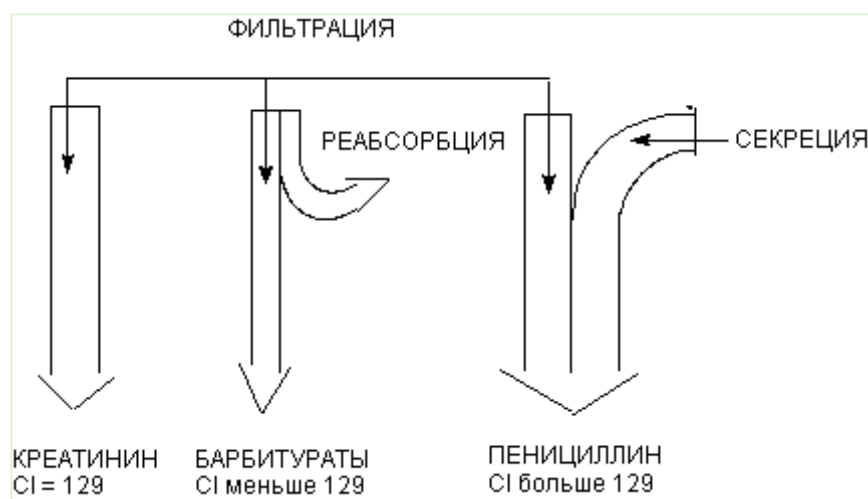


Рисунок 1.25 – Схема, иллюстрирующая совместное действие механизмов, влияющих на почечную экскрецию.

Печеночная экскреция. Печень выделяет химические вещества в желчь, причем не только экзогенные, но и эндогенные, такие как желчные кислоты, желчные пигменты, электролиты. Выделяющиеся вещества должны проходить через барьер, образуемый эндотелием печеночных синусов, базальной мембраной и гепатоцитами. Процесс экскреции ксенобиотиков происходит в два этапа: 1) захват базальной (васкулярной) стороной гепатоцита вещества из кровотока; 2) выделение апикальной (билиарной) стороной гепатоцита вещества в желчь. Оба этапа могут проходить либо в форме простой диффузии, либо активного транспорта. Механизм транспорта определяется строением вещества:

1. Процесс захвата ксенобиотика гепатоцитом осуществляется:

а) диффузией (липофильные низкомолекулярные молекулы);

б) системой активного транспорта [желчные кислоты и соединения с близким строением (афлатоксин); непрямой билирубин; органические анионы (варфарин, оротовая кислота, рифампицин); органические катионы (четвертичные соединения азота, прокаинамид); нейтральные органические молекулы (оубаин, стероидные гормоны); металлы (железо, кадмий)];

в) эндоцитозом (макромолекулы, протеины).

Процесс экскреции ксенобиотика из гепатоцита осуществляется:

а) диффузией (неорганические ионы);

б) системой активного транспорта (желчные кислоты, органические анионы). Например, без биотрансформации – хлортиозид; после конъюгации [прямой билирубин, стероиды, гексахлорфенол; органические анионы (тубокурарин); нейтральные органические соединения (оубаин, моносахариды)];

в) экзоцитозом (макромолекулы, белки).

Почечная и печеночная элиминация веществ приводит к снижению содержания ксенобиотика в организме и включает экскрецию поступившего ксенобиотика из организма или вначале его биотрансформацию, а затем выведение продуктов биотрансформации.

Для элиминации препарата с быстрым метаболизмом в печени – лидокаина (местного анестетика) – основное значение имеет скорость печеночного кровотока. Для элиминации антипсихотических средств группы фенотиазина основное значение – активность ферментных систем детоксикации в печени, но выводятся почками и частично через кишечник.

Важнейшим фактором, определяющим путь элиминации является Молекулярная масса соединения. Существует порог, ниже которого располагаются вещества, выделяющиеся преимущественно через почки, выше – через печень. Значение порога достаточно условно, поскольку неодинаково у представителей различных видов: у крыс – 325 дальтон, у морских свинок – 400, у кроликов – 475, у человека – 500–700. Кроме того, преимущественно через почки выделяются вещества, хорошо растворимые в воде, даже с молекулярной массой выше «пороговых» значений.

Элиминацию ксенобиотиков характеризует ряд фармакокинетических параметров:

- константа скорости элиминации – часть от концентрации в крови, удаляемая за единицу времени (вычисляется в %);

- период полуэлиминации – время, за которое концентрация в крови снижается наполовину ($T_{1/2}$);

- клиренс (англ. Clearance – очищение) – объем жидких сред организма, освобождающихся от лекарственных средств в результате биотрансформации, выведения с желчью и мочой (вычисляется в мл/мин/кг).

Скорость выведения веществ существенно различается. Так, элиминация из жировой ткани после отравления животных бензолом происходит в течение 30–48 ч, а ДДТ – в течение многих месяцев.

Период полувыведения бензпирена печенью крыс после внутривенного введения составляет около 1,7 минуты. Однако это совсем не означает, что с такой же скоростью вещество выводится из организма. Если с желчью выделяется липофильное соединение, то в просвете кишечника оно подвергается быстрой обратной резорбции и по системе портальной вены вновь поступает в печень – развивается «внутрипеченочная циркуляция» ксенобиотика. Поэтому жирорастворимые вещества (в том числе и бензпирен) надолго задерживаются в организме. Их элиминация возможна лишь в результате биотрансформации в той же печени и/или других органах.

Путем билиарной экскреции быстрее из организма могут выделяться, в основном, плохо растворимые в жирах соединения.

При элиминации ксенобиотика почечный и печеночный клиренсы различаются. Например, у циметидина (противогистаминное средство, блокатор H_2 -гистаминовых рецепторов) почечный клиренс равен 600 мл/мин/кг, желчный – 10 мл/мин/кг.

Удаление ксенобиотиков через кожу. Ряд лекарственных и ядовитых веществ выводится из организма через кожу, главным образом через потовые железы. Таким путем выводятся соединения мышьяка и некоторых тяжелых металлов, бромиды, иодиды, хинин, камфора, ацетон, фенол, хлорпроизводные углеводородов и др. Выделяемое трансдермально количество указанных веществ относительно незначительно. При отравлении этот путь выведения не имеет практического значения.

Удаление ксенобиотиков с молоком. Некоторые лекарственные и ядовитые вещества выводятся из организма с молоком кормящих матерей. С молоком матери они могут попадать к ребенку: этиловый спирт, ацетилсалициловая кислота, барбитураты, кофеин, морфин (наркотики), никотин, антибиотики, гормональные препараты и др.

Коровье молоко может содержать отдельные пестициды и некоторые токсические вещества, которыми обрабатывают растения, поедаемые животными.

Некоторые ксенобиотики и их метаболиты выделяются из организма не одним, а несколькими путями. Однако один из путей выделения является преобладающим. Это можно показать на примере выделения этанола. Большая его часть метаболизируется. Около 10 % выводится в неизменном виде с выдыхаемым воздухом. Небольшие количества с мочой, калом, слюной, молоком. Хинин удаляется из организма с мочой и через кожу. Некоторые барбитураты – с мочой и молоком кормящих матерей.

Выделение через кишечник. С экскрементами вещество или его метаболит выделяются в следующих случаях:

- в результате неполного всасывания в желудочно-кишечном тракте;

- в результате билиарной экскреции без последующей реабсорбции в кишечнике;

- в результате выделения слизистой желудочно-кишечного тракта.

Выделение ксенобиотиков через желудочно-кишечный тракт начинается уже во рту со слюной. В слюне обнаруживаются некоторые неэлектролиты и тяжелые металлы, например ртуть, свинец и др. Заглатывание слюны возвращает соединения в желудок.

Некоторые вещества выделяются в значительном количестве уже в желудке (морфин, некоторые другие алкалоиды). Это наблюдается даже при парентеральном способе введения указанных соединений и является следствием значительного различия рН крови и содержимого желудка.

Выделение с калом характерно для тяжелых металлов. Показано, что экскретируются элементы в связанной с белками форме. Выведение свинца, например, существенно увеличивается при увеличении в рационе белковых продуктов.

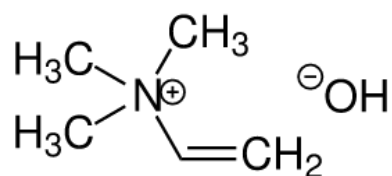
1.14. Биотрансформация веществ в кишечнике под действием микрофлоры

Рассмотрим микробную биотрансформацию веществ в кишечнике на примере аминокислот.

Аминокислоты, не всосавшиеся в клетки кишечника, не переваренные белки, используются микрофлорой толстой кишки в качестве питательных веществ. Ферменты бактерий расщепляют белки и аминокислоты и превращают их в амины, фенолы, индол, скатол, сероводород и другие ядовитые для организма соединения. Этот процесс иначе называют гниением белков в кишечнике. В основе гниения лежат реакции декарбоксилирования и дезаминирования аминокислот. В процессе постепенного и глубокого распада серосодержащих аминокислот (цистина, цистеина и метионина) в кишечнике образуются дигидросульфид (сероводород) – H_2S и метантиол (метилмеркаптан) – CH_3SH .

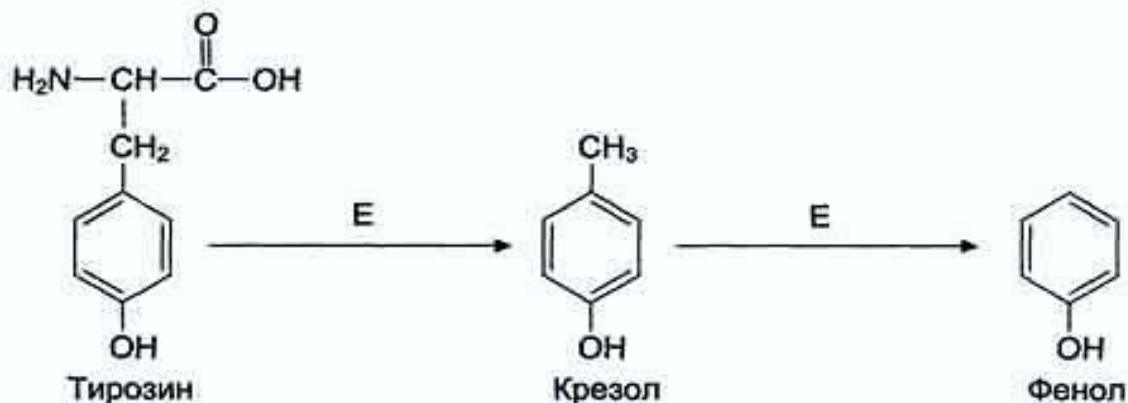
Под действием ферментов микроорганизмов аминокислоты, в частности орнитин и лизин, подвергаются процессу декарбоксилирования с образованием соответствующих аминов (птомаинов, или трупных ядов, поскольку они получаются также при гнилом разложении трупов). Из орнитина образуется путресцин (4-бутандиамин – органическое соединение, с формулой $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, название произошло от лат. *Puter* – гнилой, гниющий,). Лизин превращается в кадаверин (1,5-пентандиамин – химическое соединение, имеющее формулу $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$, название от лат. *Cadaver* – труп). Оба амина обладают очень неприятным запахом.

При дегидратации холина в процессе гниения образуется нейрин, или гидроксид триметилвиниламмония – очень токсичное вещество с формулой:



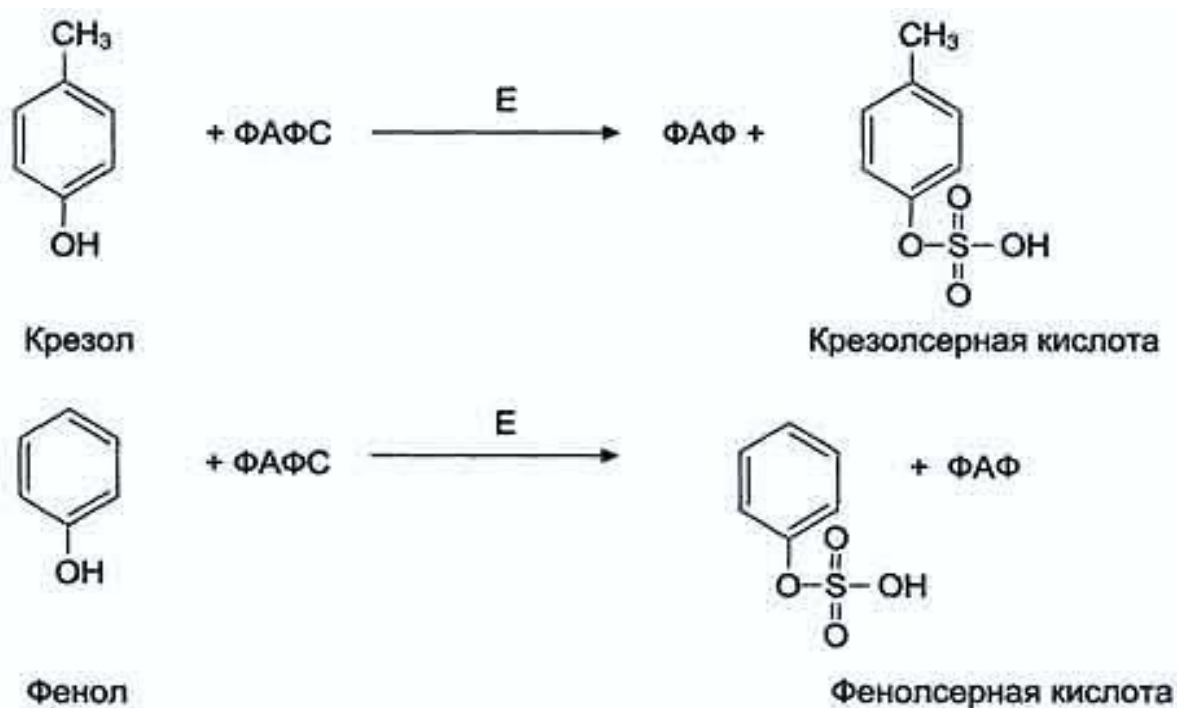
Содержится в трупном яде, гниющем мясе.

Под действием ферментов бактерий путем разрушения боковых цепей тирозина могут образовываться крезол и фенол:

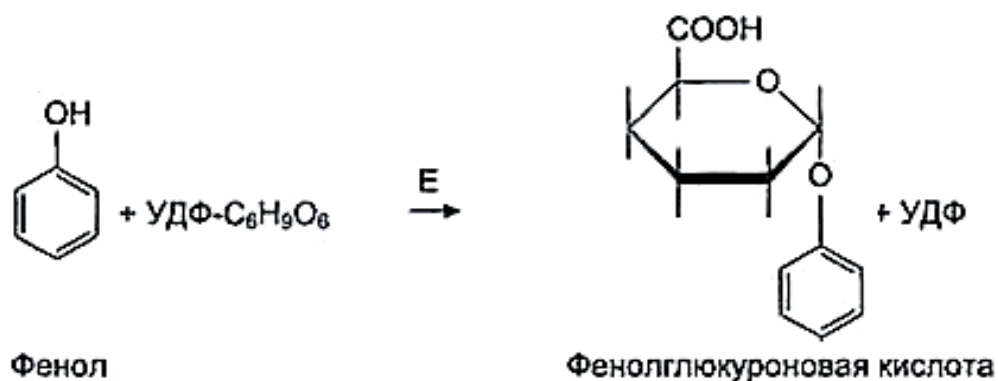
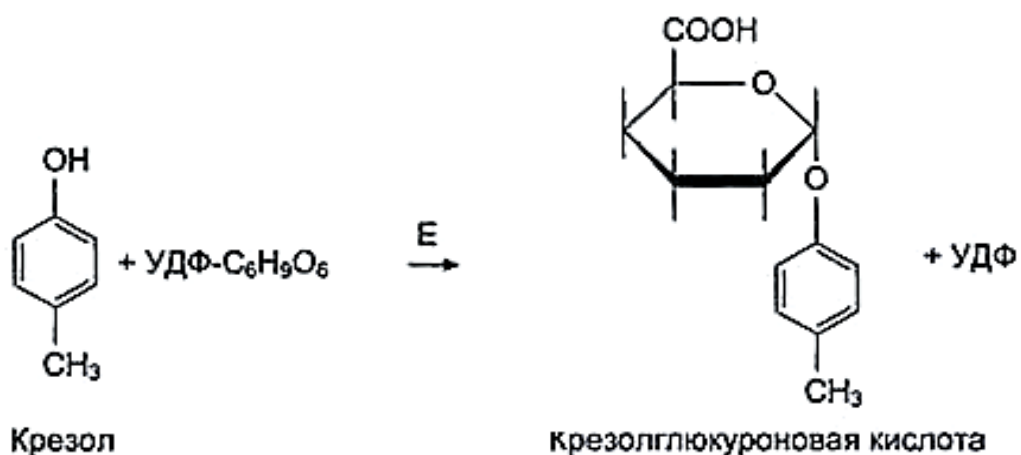


Эти продукты всасываются, по воротной вене поступают в печень и подвергаются конъюгации с сернокислотным остатком (ФАФС) или с глюкуроновой кислотой. Продукты конъюгации хорошо растворимы в воде и выводятся с мочой через почки.

Образование конъюгатов крезола и фенола с серной кислотой:

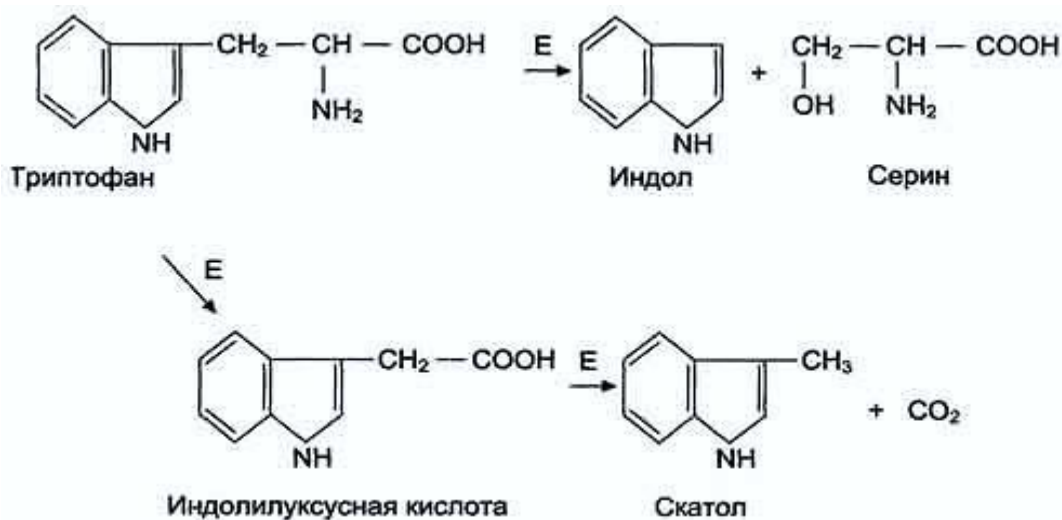


Образование конъюгатов крезола и фенола с глюкуроновой кислотой:



В кишечнике из триптофана микроорганизмы образуют индол и скатол. У скатола частично разрушается боковая цепь, индол полностью ее лишен. Промежуточным продуктом этой биотрансформации может быть индолилуксусная кислота (гетероауксин).

Скатол и индол – ядовитые вещества, определяют специфический запах каловых масс. Они также обезвреживаются в печени образуя, конъюгаты с серной или глюкуроновой кислотами, и выводятся с мочой:



Гниение белков в кишечнике – это естественный процесс, однако избыточное гниение может привести к интоксикации организма и развитию различных заболеваний, в частности гнилостной диспепсии, проявляющейся вздутием живота, диареей, болями. Токсичные вещества, образующиеся при избыточном гниении, могут всасываться в кровь и вызывать общее отравление организма, проявляющееся слабостью, головной болью и другими симптомами.

1.15. Биотрансформация свободных радикалов

Свободно-радикальные процессы в биологических системах – причина многочисленных нарушений, приводящих к возникновению целого ряда заболеваний, их концентрация в организме (клетке) должна строго контролироваться и поддерживаться на определенном уровне.

Свободный радикал – это молекулярная частица (атом или молекула), имеющая на внешней электронной оболочке один или несколько неспаренных электронов. Радикалы обладают высокой реакционной способностью, они стремятся вернуть себе недостающий электрон, отняв его от окружающих молекул или избавляются от «лишнего» электрона, отдавая его другим молекулам. Молекула кислорода (диоксиген) содержит на внешней оболочке два неспаренных электрона и является бирадикалом, подобно другим радикалам также обладает высокой реакционной способностью.

Все радикалы, образующиеся в организме, можно разделить на природные и чужеродные; первичные (могут быть полезными), вторичные (чаще повреждающие) и третичные (радикалы антиоксидантов). Для биологических систем наиболее важны свободные радикалы кислорода (гидроксильный – $\text{HO}^\cdot$, пероксида водорода – $\text{HOO}^\cdot$, супероксидный – $(\text{O}_2^\cdot)$ и реактивные молекулы (пероксиды, пероксинитрит и гипохлорит).

Около 95% всего потребляемого кислорода в клетке восстанавливается до H_2O (в первую очередь в митохондриях в процессе окислительного фосфорилирования). Остальные 5% процентов в результате различных реакций превращаются в активные формы кислорода (АФК). По оценке Гельмута Эстербауэра, человек за 70 лет жизни потребляет 17 000 кг кислорода; за это время в организме нарабатывается 800-1700 кг кислородных радикалов.

АФК, образующиеся в процессе нормальной жизнедеятельности животной клетки, индуцируют в ДНК около 10 000 повреждений за сутки. При этом генерация АФК, есть не эволюционная ошибка (неудача), а, напротив – характерный физиологический процесс, результат отбора.

У всех аэробных организмов супероксидный анион-радикал кислорода, гидроксильный радикал, пероксид водорода, монооксид азота и другие являются обычными метаболитами, образующимися в нормально функционирующих клетках. Радикалы взаимодействуют между собой и с другими молекулами и ионами, это продуцирует новые токсические продукты.

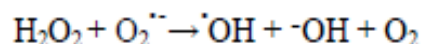
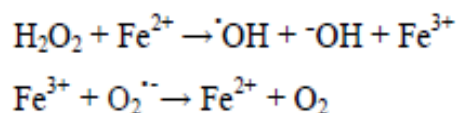
Образование биорадикалов в организме можно условно разделить на физиологически значимые (относительно полезные) пути; нефизиологические пути, а также природные и чужеродные. Деление относительное.

1.15.1. Пути образования свободных радикалов, активных форм кислорода, азота, хлора и их значение

Процесс повышения синтеза АФК, так называемый «дыхательный взрыв», происходит в фагоцитирующих клетках, таких как нейтрофилы и макрофаги, при внедрении в организм патогенов. В результате этого клетки начинают активно потреблять кислород, синтезируются и высвобождаются супероксид-анион, пероксид водорода, гидроксильный радикал. Обладающие бактерицидным действием, что приводит к уничтожению поглощенных микроорганизмов.

Образование свободных радикалов и реактивных молекул происходит в следующих реакциях или процессах:

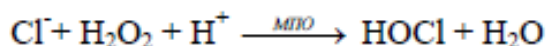
1) небольшой вклад в образование активных оксидантов вносит реакция Хабера-Вейса:



2) в процессе активации НАДФН-оксидазы, экспрессия фермента характерна для фагоцитирующих клеток крови (нейтрофилы, эозинофилы, макрофаги), эндотелиальных клеток крови, хондроцитов и астроцитов. Реакция, катализируемая НАДФН-оксидазой, заключается в окислении НАДФН до НАДФ⁺ внутри клетки с переносом электронов на другую сторону клеточной мембраны и образованию на наружной стороне клетки супероксидного радикала из O₂ среды.

НАДФН-оксидаза — мембрано-связанный мультимолекулярный ферментный комплекс, локализованный в плазматической мембране и в некоторых органеллах. Существует целая группа НАДФН-оксидаз, которые различаются по составу субъединиц, клеточной специфичности, регуляции и другим параметрам. Эти оксидазы участвуют в клеточной противомикробной защитной системе, а также в клеточной пролиферации, дифференцировке и регуляции экспрессии генов.

3) вовлечение пероксида водорода в реакции, катализируемые миелопероксидазой (МПО), в результате образуются активные формы хлора, в первую очередь, гипохлорит:

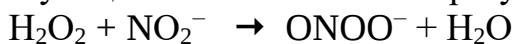


Гипохлорит является чрезвычайно эффективным бактерицидным агентом, способным разрушить бактериальные стенки, основным бактерицидный агент нейтрофилов. Образование гипохлорита под действием МПО играет важную роль в процессах неспецифического иммунитета и, в частности, фагоцитоза.

Миелопероксидаза (H_2O_2 -оксиредуктаза) является одной из самых изученных эндогенных пероксидаз млекопитающих. В основном этот фермент содержится в гранулах нейтрофилов ($\approx 5\%$ сухой массы клетки), моноцитах и некоторых типах тканевых макрофагов. Биосинтез фермента происходит во время дифференциации миелоцитов в костном мозге и заканчивается ко времени выхода зрелых гранулоцитов и моноцитов в кровеносное русло. Основным субстратом реакции является пероксид водорода, кроме того, физиологическим субстратом может служить также оксид азота (NO).

МПО инактивирует пероксид водорода, но при этом продуктами реакций являются сильные окислители: кроме гипохлорита – это реактивные производные азота и свободные радикалы, инициирующие перекисное окисление липидов, вызывающие модификацию белков, включая галогенирование, нитрирование, окисление и образование сшивок. Таким образом, за реализацию защитного эффекта от патогенов приходится платить последствиями эффектов образующихся окислителей и затратой ресурсов клетки на механизмы их обезвреживания.

4) реакция взаимодействия супероксидного радикала или пероксида водорода с монооксидом азота и образование пероксинитрита. Пероксинитрит является важным цитотоксическим агентом, продуцируемым макрофагами и действующим на патоген. Он образуется в реакции:



Образование *in vivo* чаще происходит в результате реакции:



Пероксинитрит является сильным окислителем. ONOO^- реагирует с CO_2 с образованием нитрозопероксикарбоната (ONOOOCO_2^-). Это преобладающий путь катаболизма пероксинитрита. Нитрозопероксикарбонат подвергается деградации с образованием карбоната и диоксида азота. Приблизительно в 2/3 случаев эти вещества эндогенно превращаются в диоксид углерода и нитрат. Однако, в 1/3 случаев, вышеупомянутая реакция не происходит, что ведет к образованию свободных радикалов, инициирующих пероксинитрит-индуцированное повреждение широкого спектра молекул в клетке, в том числе ДНК и белков.

5) во время синтеза $\text{NO} \cdot$, образуемого из гуанидинового атома азота L-аргинина синтазой оксида азота, которая присоединяет O_2 к терминальному атому азота в гуанидиновой группе L-аргинина.

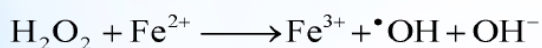
6) при спонтанном или катализируемом МАО окислении допамина и адреналина. При спонтанном окислении образуется $\text{O}_2^{\cdot -}$, а при катализируемом МАО – H_2O_2 .

7) в дыхательной цепи митохондрий в небольшом количестве (до 100 пмоль) вследствие «утечки» 5-10 % электронов. В этом случае генерируется, в основном, супероксид анион. Ферментативные комплексы, которые генерируют O_2^- могут активироваться при физиологических нагрузках – мышечное сокращение, энергозависимые процессы в почках, трансмембранные процессы и др., что увеличивает образование активных форм кислорода.

8) в результате «утечки» электрона в электронтранспортной системе мембран эндоплазматического ретикулума и ядра, включающие в себя цитохромы P-450 и b5, а также НАДФН- и НАДН-зависимые редуктазы.

9) при синтезе простагландинов как по циклооксигеназному пути – в процессе превращения PgG_2 в PgH_2 , так и по липооксигеназному пути – в процессе превращения гидропероксида арахидоновой кислоты в оксикислоту. Этот процесс контролируется рядом пептидных гормонов (ангиотензин), некоторых цитокинов и ростовых факторов.

10) в присутствии ионов Fe^{2+} (а также ионов других металлов переменной валентности Cu^{2+} , Co^{2+}), способствующих образованию гидроксильных радикалов посредством реакции Фентона: (образуются очень токсический гидроксильный радикал):

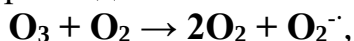


11) при автоокислении гемоглобина $Hb(Fe^{2+})$:



Образование АФК в организме происходит под действием таких факторов, как ионизирующая радиация; ультрафиолетовое излучение; озон; магнитное и электрическое поле; гипероксия и гипоксия; гипо- и гипертермия, и др.

В генерации АФК значительную роль играет озон, образующийся в результате фотодиссоциации молекулярного кислорода под влиянием солнечной энергии. При взаимодействии озона с кислородом возникает супероксид-анион:



а затем – пероксид водорода, синглетный кислород и гидроксильный радикал.

Функции АФК. Кроме бактерицидного действия $\cdot OH$, как уже упоминалось, участвует в запуске апоптоза, сборке и разборке биологических мембран, запуске митогенеза, процессах клеточной пролиферации и дифференцировки, деградации белков. H_2O_2 принимает участие в действии инсулина и сам обладает инсулиноподобным действием. H_2O_2 является вторичным посредником в передаче регуляторных сигналов. АФК нужны для протекания ПОЛ в стационарном режиме, выполняют сигнальную и адаптационную функции.

Окислительный стресс

Поддержание концентрации АФК в организме поддерживает антиоксидантная система. Если равновесие между свободнорадикальными

(окислительными) и антиоксидантными реакциями в организме смещается в сторону активации свободнорадикального окисления, а собственные антиоксиданты не могут его компенсировать, развивается окислительный стресс (оксидативный стресс, от англ. *oxidative stress*)

Окислительный стресс – это нарушение обмена веществ и энергии, накопление активных повреждающих агентов (свободных радикалов, прооксидантов, АФК), инициирующих повреждение клеток и ведущих к развитию различных патологических состояний, как правило, вызывается и сопровождается массированным образованием свободных радикалов.

В результате окислительного стресса происходит повреждение клеточных мембран, инактивация или трансформация ферментов, подавление деления клеток и накопление инертных полимеров типа липофусцина. Деструктивное воздействие окислительного стресса вызывает образование внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей в белках, окисление функциональных SH-групп с образованием сульфоновой кислоты и последующей протеасомной деградации белка, интенсифицирует перекисное окисление липидов.

Перекисное окисление липидов приводит к повреждению макромолекул и мембран, это влечет за собой нарушение их барьерной функции, разбалансировку процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях. Дефицит энергии отражается на всех процессах, включая пролиферацию, дифференцировку клеток, синтез различных веществ.

Комплексная оценка оксидативного стресса осуществляется на основании количественного определения содержания в крови 7 маркеров: коэнзима Q10, витамина Е, витамина С, бета-каротина (транс-форма), глутатиона (окисленного и восстановленного), малонового диальдегида, 8-ОН-дезоксигуанозина. Анализ используется для оценки оксидативного стресса и для прогноза развития системных заболеваний – метаболических нарушений, воспалительных процессов, патологий органов.

Оксидативный стресс является причиной или важной составляющей многих серьезных заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца и мозга, атеросклероз, гипертензия, болезнь Альцгеймера, диабет, хронические заболевания печени и легких и др. Он является одной из составляющих процесса старения. Потеря контроля над АФК способствует появлению более 100 различных заболеваний. Ученые предполагают, что начальной стадией многих заболеваний – от простого кашля до онкозаболевания – является именно большое количество свободных радикалов в организме и снижение антиоксидантной защиты.

АФК) могут вызывать модификацию ДНК, приводя к повреждению оснований, разрывам цепей ДНК и хромосомным aberrациям. Эти изменения могут приводить к мутациям и, в конечном итоге, к развитию различных заболеваний (рисунок 1.26).

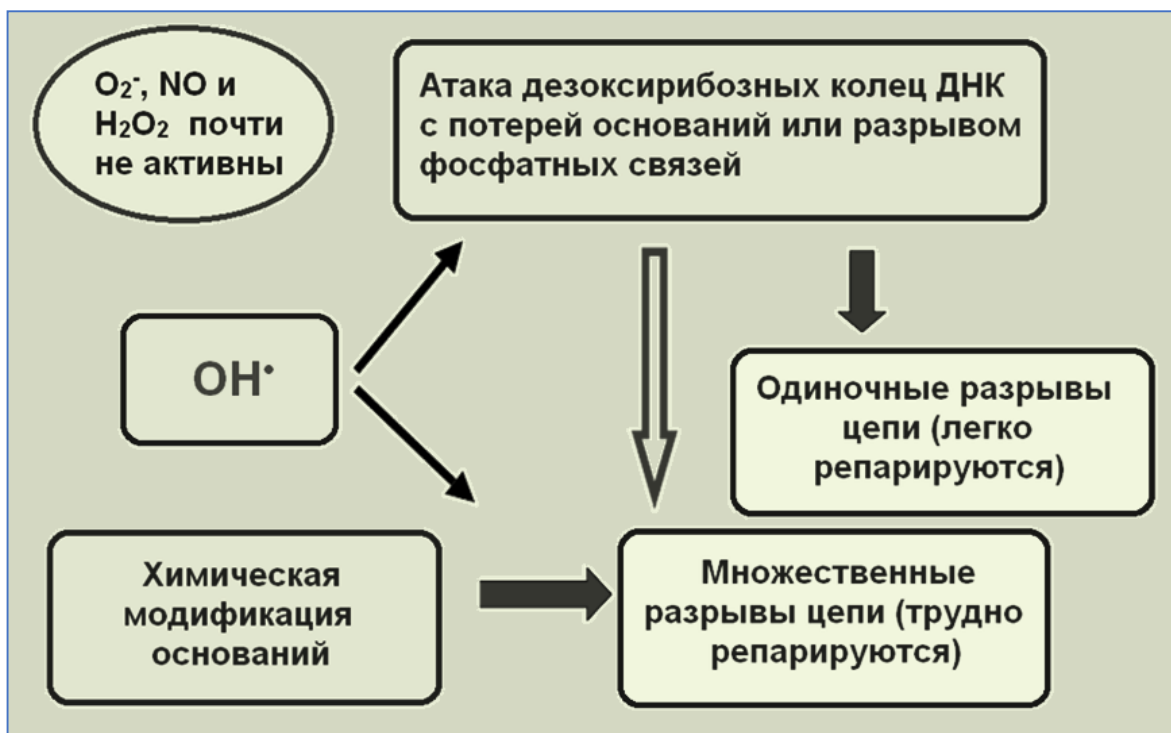


Рисунок 1.26 – Модификация нуклеиновых кислот под действием АФК.

Гидроксильные радикалы, образующиеся в непосредственной близости от молекулы ДНК из H_2O_2 и катионов Cu и Fe , осуществляют разрыв цепи нуклеиновой кислоты, фрагментацию и модификацию оснований. На рисунке 1.27 показано образование под действием $\text{HO}^\bullet$ окисленного гуанозина, наименее репарируемого основания. Продукт окисления – 7,8-дигидро-8-гидроксигуанозин, который служит маркером окислительного стресса.

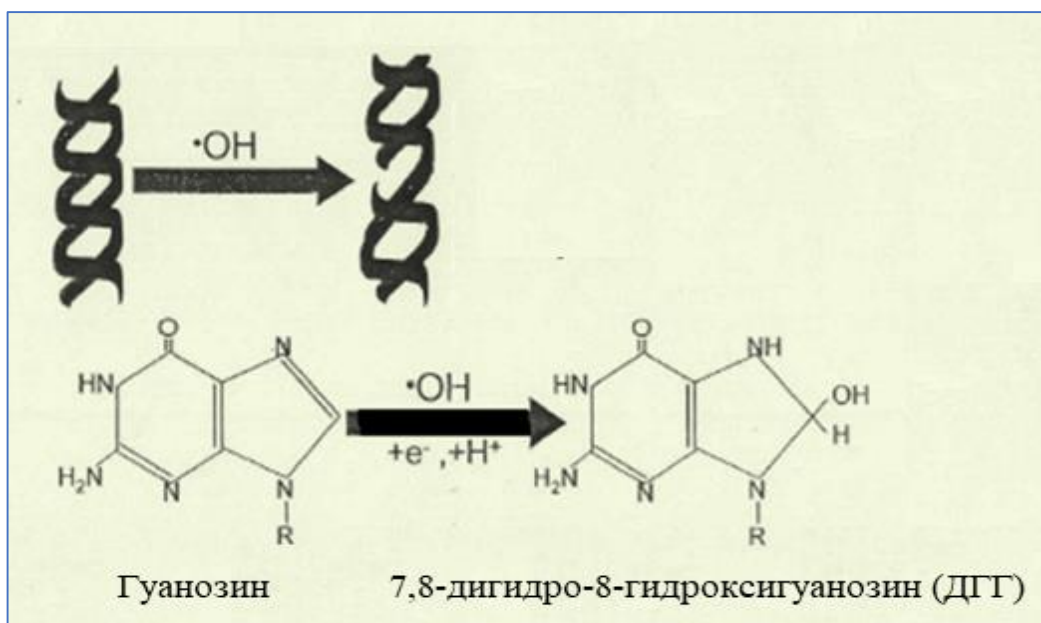


Рисунок 1.27 – Окислительная модификация ДНК.

Дисбаланс между образованием и выведением свободных радикалов, оказывает значительное влияние на белки, липиды и углеводы в клетках, приводя к их повреждению и нарушению нормального функционирования. Взаимодействия этих веществ при оксидативном стрессе включают в себя следующие процессы:

- свободные радикалы могут окислять аминокислотные остатки в белках, что приводит к изменению их структуры и функции. Например, окисление метионина может приводить к потере активности ферментов. Поврежденные белки активируют протеазы, что инициирует их дальнейшее разрушению;

- окисленные липиды способны взаимодействовать с белками, образуя белково-липидные аддукты, что также нарушает их структуру и функцию;

- свободные радикалы атакуют липиды, в основном полиненасыщенные жирные кислоты в клеточных мембранах, вызывая их деградацию, запускают ПОЛ, повреждая мембраны.

- под действием АФК могут окисляться углеводы, такие как глюкоза, что приводит к образованию карбонильных соединений и других продуктов окисления, усиливаются процессы гликирования белков (присоединение сахаров к белкам, их модификацию и образование продуктов Амадори), что также приводит к изменению их структуры и функции.

При гликации идет типичная реакция конденсации между альдегидной группой моносахарида и α -аминогруппой остатка аминокислоты в белке, в результате которой образуются Шиффовы основания (*Shiff bases*). Аддукты белка и восстановленного сахара, называются продуктами Амадори (*Amadori products*). В дальнейшем продукты Амадори подвергаются окислению, конденсации, структурным перестройкам. В результате формируется достаточно разнообразная группа веществ. В норме они медленно накапливаются в тканях и организм успевает их обезвредить, при увеличении концентрации АФК и продуктов перекисного окисления липидов скорость образования конечных продуктов гликирования возрастает.

Взаимодействие белков, липидов и углеводов при массивном образовании АФК является сложным и многогранным. Окислительное повреждение липидов может приводить к повреждению белков, а окисление белков способно интенсифицировать ПОЛ. Повреждение углеводов также может вызвать развитие оксидативного стресса и усилить повреждение других молекул. Все эти процессы вносят вклад в развитие различных заболеваний, включая сердечно-сосудистые, нейродегенеративные заболевания и рак.

Взаимодействуя с органическими веществами, АФК образуют гидропероксиды ДНК, белков, липидов. Этот процесс называется перекисным окислением (пероксидацией). В клетках имеется все необходимое для протекания процессов перекисного окисления: источники АФК, субстраты перекисного окисления, железо в разных формах.

В остатках полиненасыщенных жирных кислот биологических мембран АФК вызывают цепные реакции с образованием липидных радикалов ($L^\cdot$): пероксидов ($LOO^\cdot$), гидропероксидов ($LOOH$) и алкоксидов ($LO^\cdot$) – перекисное окисление липидов. Окисление носит свободнорадикальный, цепной самоускоряющийся характер. Выделяют 4 стадии процесса ПОЛ: инициация, продолжение цепи, разветвление, обрыв цепи (рисунок 1.28).

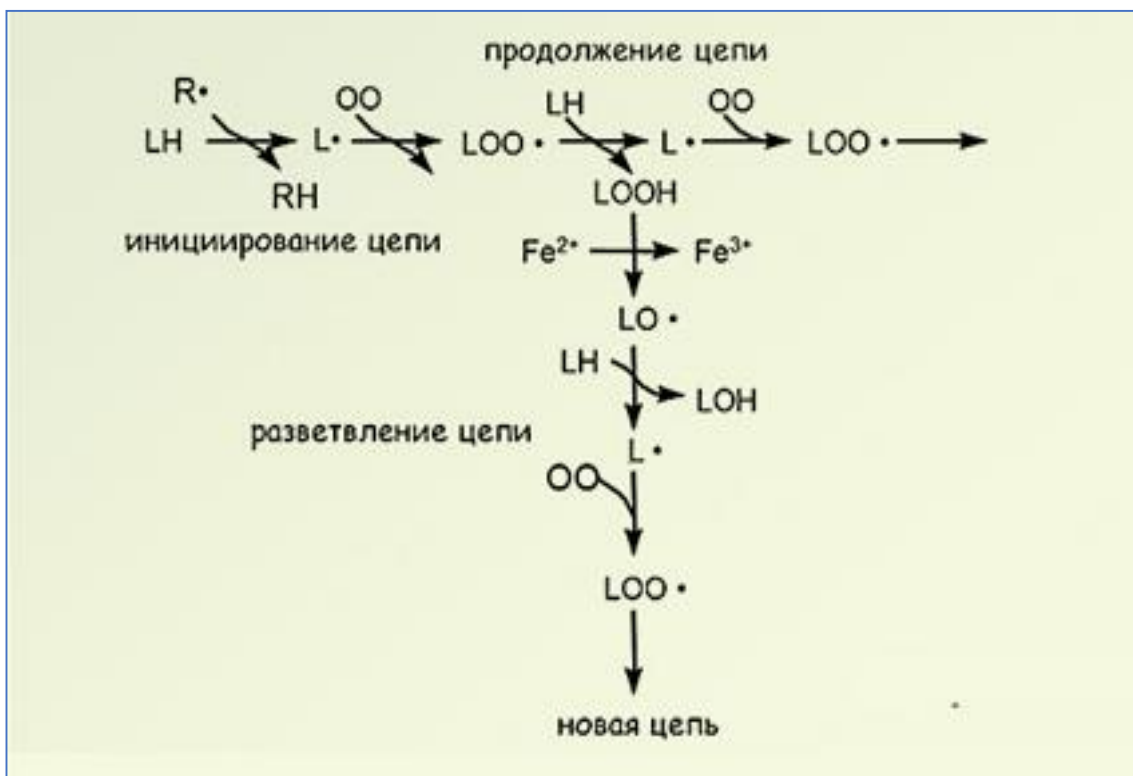
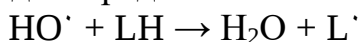


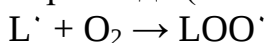
Рисунок 1.28 – Схема процесса перекисного окисления липидов.

Инициация цепи:

Радикал гидроксила (небольшая незаряженная частица) проникает в толщу гидрофобного липидного слоя и вступает в химическое взаимодействие с полиненасыщенными жирными кислотами (LH) биологических мембран и липопротеинов плазмы крови. При этом в липидном слое мембран образуются липидные радикалы:

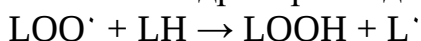


Липидный радикал ($L^\cdot$) вступает в реакцию с растворенным в среде молекулярным кислородом и образуется новый свободный радикал – радикал липопероксида ($LOO^\cdot$):



Продолжение цепи:

Радикал липопероксида атакует одну из соседних молекул фосфолипидов с образованием гидропероксида липида $LOOH$ и нового радикала $L^\cdot$:

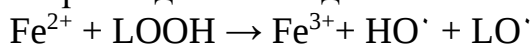


Чередование двух последних реакций представляет собой цепную реакцию ПОЛ.

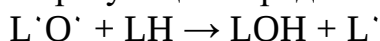
Разветвление цепи:

Существенное ускорение пероксидации липидов наблюдается в присутствии небольших количеств ионов двухвалентного железа.

Происходит разветвление цепей в результате взаимодействия Fe^{2+} с гидропероксидами липидов:

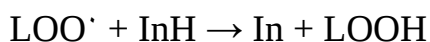
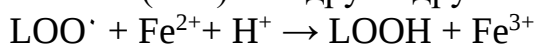


Образующиеся радикалы $\text{LO}^\cdot$ инициируют новые цепи окисления липидов:



Обрыв цепи:

В биологических мембранах цепи могут состоять из десятка и более звеньев. В конце концов цепь обрывается в результате взаимодействия свободных радикалов с антиоксидантами, ионами металлов переменной валентности (Fe^{2+}) или друг с другом:



В результате превращений, особенно в присутствии железа (II), образуются конечные молекулярные продукты ПОЛ – альдегиды, диальдегиды, кетоны, кислоты, эпоксиды и другие высокореакционные соединения. При выходе процессов ПОЛ из-под контроля продукты ПОЛ способны, реагируя с биомолекулами, привести к полному распаду клеточных мембран и клетки в целом.

В настоящее время придерживаются следующей классификации ПОЛ:

1) спонтанное:

- инициированное свободными радикалами;
- аскорбатзависимое.

2) ферментативное – в результате работы липооксигеназ и циклооксигеназ.

Свободнорадикальные процессы, вызывающие ПОЛ характерны для нормально метаболизирующих клеток, и рассматриваются как физиологические, поскольку при небольших концентрациях продукты ПОЛ оказывают биологически полезное действие. Так, перекиси липидов, используются в организме для синтеза простагландинов, тромбоксанов, стероидных гормонов и др. Интенсивность ПОЛ связана с процессами обновления состава фосфолипидов и белков, деления клеток и др.

В живых организмах работает сложная система регуляции интенсивности процесса ПОЛ. В норме образование и расходование продуктов ПОЛ хорошо сбалансированы, что поддерживает их относительно низкое содержание в клетках. При развитии патологического процесса баланс ПОЛ может

нарушаться, метаболиты накапливаются, что приводит к серьезным нарушениям, в первую очередь, в биологических мембранах.

1.15.2. Антиоксидантная система

Природа создала сложную антиоксидантную систему, способную нейтрализовать свободные радикалы, возникающие в результате обмена веществ, и избежать оксидативного стресса.

Биооксиданты обладают способностью реагировать с активными формами кислорода, пероксидными радикалами липидов, инактивировать их и, таким образом, обрывать цепи свободнорадикального окисления.

Клетки обладают несколькими уровнями защиты от образования активных форм кислорода:

1-й уровень – системная защита клеток за счет значительного снижения напряжения O_2 в тканях по сравнению с атмосферным воздухом;

2-й уровень – обеспечивается в процессе четырехэлектронного восстановления основной массы внутриклеточного O_2 при участии цитохромоксидазы;

3-й уровень – ферментативное удаление образовавшихся супероксидного анион-радикала и H_2O_2 ;

4-й уровень – наличие ловушек свободных радикалов (антиоксидантов);

5-й уровень – ферментативное восстановление гидропероксидов полиненасыщенных жирных кислот.

Антиоксиданты классифицированы, их можно разделить на две группы – высокомолекулярные и низкомолекулярные.

I. Высокомолекулярные соединения:

а) ферменты антиоксидантной защиты: СОД, церулоплазмин, каталаза, глутатионзависимые ферменты – обеспечивают комплексную антирадикальную защиту биополимеров.

Для ферментов-антиоксидантов характерны:

- высокая специфичность;
- строго определенная органная и клеточная локализация;
- использование в качестве катализаторов металлов Cu, Fe, Mn, Zn.

б) белки, способные связывать катионы железа и меди: альбумины крови, трансферрины, ферритины, лактоферрины, церулоплазмин и др.;

в) белки-восстановители – редоксины.

Работа белков-антиоксидантов весьма эффективна, но белки слабо проникают через мембраны и тканевые барьеры.

II. Низкомолекулярные антиоксиданты: некоторые аминокислоты, полиамины, мочевины, глутатион, серосодержащие аминокислоты,

аскорбиновая кислота, билирубин, α -токоферолы, витамины групп А, К, убихинон, флавоноиды и др.

Таким образом, антиоксидантная защита включает ферменты и аниоксиданты, которые предотвращают окислительное повреждение и/или контролируют его распространение, а также обладают механизмами устранения окислительного повреждения, направленные на репарацию, удаление или замещение поврежденных молекул.

По происхождению антиоксиданты могут быть эндогенными и экзогенными.

Антиоксиданты можно также классифицировать на скавенджер-антиоксиданты (удаляют активные формы O_2) и защитные.

К скавенджер-антиоксидантам относят:

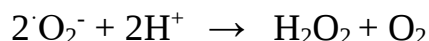
- малые молекулы (витамин С, глутатион; витамин Е, каротин, липоевая кислота, коэнзим Q10);

- большие молекулы – ферменты с антиоксидантной активностью (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза). Эти ферменты синтезируются клетками и имеют большой антиоксидантный потенциал.

Защитные антиоксиданты препятствуют формированию новых активных форм кислорода (альбумин, металлотинин, трансферрин, церулоплазмин, миоглобин, ферритин).

Ферментативная защита

Супероксиддисмутаза (СОД; КФ 1.15.1.1.) катализирует реакцию восстановления анион радикала кислорода ($O_2^{\cdot -}$) до пероксида водорода, т.о. она является ключевым ферментом антиоксидантной системы аэробных организмов.



В клетках эукариот СОД имеет несколько форм:

- а) медь и цинксодержащая СОД – локализована в цитозоле, межмембранном пространстве митохондрий, лизосомах и пероксисомах;

- б) марганецсодержащая СОД – локализована в матриксе митохондрий и у прокариотов;

- в) позднее был выявлен и железосодержащий фермент, встречающийся только у прокариотов;

- г) экстрацеллюлярная форма СОД – функционирует в плазме крови, лимфе и синовиальной жидкости.

Каталаза (Кат.; КФ 1.11.1.6) обладает свойствами разлагать пероксид водорода по двум путям: каталазному или пероксидазному. В обоих случаях процесс идет через образование промежуточного фермент-субстратного комплекса

Каталазный путь – разложение 2-х молекул H_2O_2 идет с образованием H_2O и триплетного кислорода: $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$.

Пероксидазный путь – одна молекула H_2O_2 образует фермент-субстратный комплекс и окисляет донор водорода, чаще всего спирт. В качестве доноров

водорода могут выступать одноатомные спирты, органические доноры водорода, ксенобиотики, например, аминобифенилы и др.

Каталазы локализованы в основном в пероксисомах, где образуется наибольшие количества пероксида водорода, и в фагоцитирующих клетках крови для защиты от последствий «респираторного, или дыхательного взрыва».

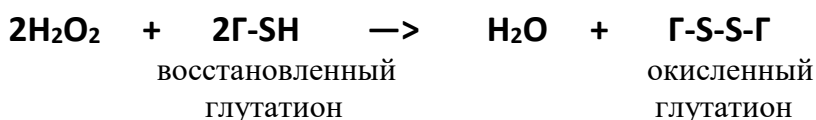
В зависимости от структуры эти ферменты относятся к одному из трех семейств:

1) тетрамерные белки, состоящие из больших или малых субъединиц, содержащих гем. Гем включается в фермент во время его сборки в пероксисомах из мономеров, которые гем не содержат.

2) бифункциональные ферменты, проявляющие и каталазную, и пероксидазную активности и являющиеся гемсодержащими асимметричными димерами.

3) гексамерные белки, содержащие по два иона марганца на мономер.

Пероксидазы – подкласс геминовых ферментов. Восстанавливают H_2O_2 до H_2O , при этом обязательно идет окисление восстановителя. Наиболее активна глутатионпероксидаза (селен содержащий фермент). Донором водорода (вторым субстратом) является глутатион (γ -глутамилцистеилглицин):



Регенерация глутатиона идет с участием НАДФН+ H^+ и глутатион-редуктазы: $\text{Г-S-S-Г} + \text{НАДФН} + \text{H}^+ \longrightarrow 2\text{Г-SH} + \text{НАДФ}^+$.

Наряду с «классической» селен-зависимой глутатионпероксидазой, в организме присутствует семейство других ферментов, выполняющих сходную функцию – глутатионтрансферазы. Они катализируют реакции конъюгации глутатиона с многочисленными электрофильными субстратами и реакции восстановления органических гидропероксидов, включая пероксиды фосфолипидов, эндопероксиды (эпоксиды), но неактивны в отношении гидропероксида водорода.

Окислительно-восстановительные, или редокс-зависимые процессы в значительной степени влияют на функциональную активность многих белков, участвуют в регуляции важнейших для жизнедеятельности клетки процессах, таких как пролиферация, дифференцировка, апоптоз.

Внимание исследователей привлекает изучение тиол-дисульфидной регуляции, осуществляемой редокс-белками, активность которых обусловлена редокс-активным участком в виде аминокислотной последовательности с двумя или одним активными тиолами.

Тиолдисульфид-редуктазы – входят в состав суперсемейства тиоредоксинов, включают тиоредоксин (Trx) и глутаредоксин (Grx). Эти ферменты полифункциональны и образуют тиоредоксин- и глутаредоксин-

зависимые системы, играющие важную роль в поддержании внутриклеточного редокс-гомеостаза.

Тиоредоксины – полифункциональные низкомолекулярные белки, имеющие в своей структуре двухцистеиновый участок, обладающий оксидоредуктазной активностью. Они образуют при окислении внутримолекулярную дисульфидную связь, (таким образом они способны окисляться и восстанавливаться). Мощные антиоксиданты, регуляторы апоптоза, митотической активности клеток др. Восстанавливают каталитическую активность пероксиредоксинов и глутатионпероксидаз. Способны восстанавливать H_2O_2 и окисленный глутатион, играют роль «ловушки» $\cdot OH$ радикалов.

Система тиоредоксинов содержит тиоредоксин и НАДФН-зависимую тиоредоксинредуктазу, которая восстанавливает окисленную форму тиоредоксина.

Глутаредоксины – Г-SH-зависимые полифункциональные оксидоредуктазы с низкой молекулярной массой (9-14 кДа). В отличие от тиоредоксинов имеют высокую степень гомологии аминокислотной последовательности, особенно в области активного центра. Функционально сопряжены с работой глутатионредуктазы и с соотношением Г-SH/GS-SG.

Также как тиоредоксины и пероксиредоксины, играют важную роль в поддержании клеточного редокс-гомеостаза. Обезвреживают АФК, участвуют в регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза.

Система глутаредоксинов включает восстановленный глутатион (Г-SH) в качестве агента, восстанавливающего окисленный глутаредоксин, и глутатионредуктазу, восстанавливающую глутатион из его окисленной формы GS-SG до Г-SH.

Пероксиредоксины, или тиоредоксиновые пероксидазы – разлагают H_2O_2 , органические гидроперекиси и пероксинитрит. У млекопитающих, например, контролируют уровень цитокин-индуцированных пероксидов, участвующих в передаче клеточных сигналов.

Пероксиредоксины – широко распространенное большое семейство неселеновых антиоксидантных ферментов. В отличие от тиоредуктаз, они не имеют двухцистеиновых внутренних участков, однако те остатки цистеинов, которые присутствуют в структуре этих ферментов, способны образовывать межмолекулярные дисульфидные связи.

Каталитическая активность пероксиредоксинов в отношении H_2O_2 ниже, чем у глутатионпероксидазы и каталазы, тем не менее они играют важную роль в детоксикации пероксида водорода.

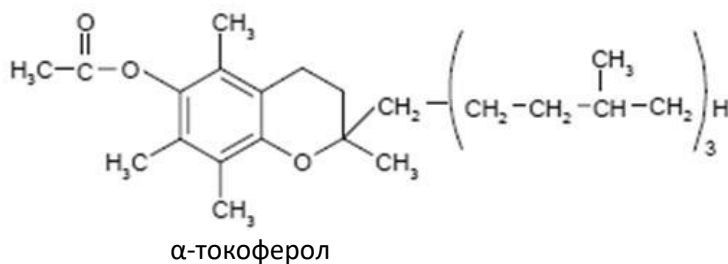
Неферментативные компоненты антиоксидантной системы.

По механизму действия неферментативные антиоксиданты могут быть классифицированы на следующие группы:

- классические антиоксиданты (агенты, обрывающие цепную реакцию);
- ловушки инициаторов свободнорадикальных реакций;

- хелаторы металлов;
- кофакторы и низкомолекулярные компоненты защитных антиокислительных ферментов и их предшественники.

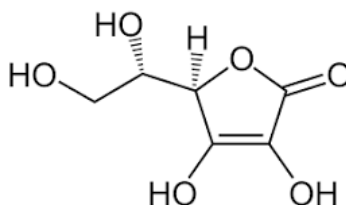
Витамин E (токоферол). Токоферолы участвуют в процессе разрушения свободных радикалов в клетках и регулируют интенсивность процессов перекисного окисления липидов на различных уровнях организации живых систем. Наиболее активные антиокислители. Функционируют в биологических мембранах:



α-Токоферол способен реагировать с АФК и радикалами жирных кислот. В реакции принимает участие ОН-группа фенольного ядра, которая может окисляться, отдавая электрон, с образованием малоактивного свободного радикала. Синергистом является витамин С. Аскорбат восстанавливает токоферол, превращаясь в дегидроаскорбат, последний в свою очередь восстанавливается аскорбатредуктазой.

Токоферолы могут проявлять прооксидантные свойства. Феноксильные радикалы, образующиеся при реализации антиоксидантного действия витамина, сами по себе обладают достаточной реакционной способностью, чтобы включаться в цепные реакции ПОЛ. При повышении концентрации феноксильных радикалов в среде будет наблюдаться стимуляция, а не торможение цепных реакций ПОЛ. Токоферолы способны восстанавливать катионы Cu^{2+} , являющиеся высокоэффективными инициаторами ПОЛ, до Cu^+ . Такой вариант восстановительного действия реализуется при концентрациях на 1–2 порядка ниже концентраций, инициирующих прооксидантные эффекты.

Витамин С (аскорбиновая кислота) – наиболее эффективный водорастворимый антиоксидант:



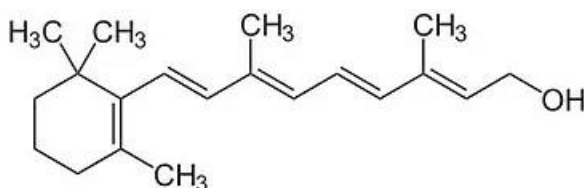
В желудке аскорбиновая кислота препятствует образованию в кислой среде из нитритов и аминов нитрозоаминов, являющихся канцерогенами. Предотвращает разрушение ферментов свободными радикалами, участвует в окислительно-восстановительных реакциях, защищая гемоглобин от окисления,

способствует синтезу коллагена (реакции гидроксирования), обеспечивает образование гормонов коры надпочечников, желчных кислот.

Аскорбиновая кислота может проявлять выраженное прооксидантное действие в присутствии катионов металлов переменной валентности, запускает аскорбатзависимое ПОЛ. Это явление связано с высокой восстановительной активностью аскорбиновой кислоты. При повышении концентрации выше нормы может инактивировать биотрансформацию ксенобиотиков Р450, оказывать другие прооксидантные эффекты.

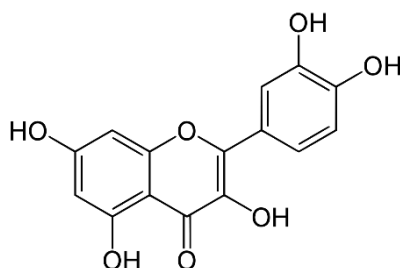
Аскорбиновую кислоту не следует употреблять совместно с препаратами, в которых содержится железо, кофеин, витамин В12, фолиевая кислота.

Витамин А (ретинол):



Антиоксидантное действие ретинола и каротиноидов направлено на предотвращение кератинизации эпителия. Кератинизация обуславливается окислением SH-содержащих белков с образованием в них S-S связей между остатками серосодержащих аминокислот. Витамин А способствует поддержанию SH-групп в восстановленном состоянии, усиливает антиоксидантное действие токоферола.

Флавоноиды: рутин, кверцетин, морин, таксифолин, силибины, гесперидин, эскулин, антоциан и др. (в целом идентифицировано более 1000 веществ), – эффективно нейтрализуют свободные радикалы. Так, кверцетин, благодаря большому количеству гидроксильных групп и конъюгированных π -орбиталей, может выступать донором электронов или водорода, связывая H_2O_2 и окисляя супероксид-анион:



С H_2O_2 кверцетин вступает в реакцию в присутствии пероксидаз, снижая концентрацию пероксида и препятствуя повреждению клеток. Однако, в результате этого химического «антиоксидантного» каскада может происходить образование потенциально вредных для организма продуктов окисления:

- с участием кверцетина идет образование промежуточного продукта хинонов – семихинон-радикала, который является нестабильным, быстро вступает в реакции окисления и приводит к образованию другого хинона – кверцетин-хинона. Этот хинон способен вовлекаться в сложные органические

реакции с белками, липидами и ДНК, играя ключевую роль в их повреждении, инициировать ПОЛ;

- на уровне ДНК кверцетин-хинон служит медиатором разрывов цепей ДНК и катализатором окисления 2'-дезоксигуанозина с формированием впоследствии 7,8-дигидро-8-гидроксигуанозина.

Убихинон. Важнейшая биологическая роль коэнзима Q определяется участием в митохондриальной электрон-транспортной цепи в качестве кофермента. Убихинон обладает антиоксидантной активностью, образуя окислительно-восстановительную систему убихинол-убихинон. Восстановленная форма (убихинол) может реагировать с пероксильным радикалом, препятствуя образованию алкильных радикалов, что ведет к обрыву цепи ПОЛ; обеспечивает эффективную защиту мембранных липидов, белков и ДНК от действия АФК; восстанавливает витамин Е, взаимодействуя с его токофероксильным радикалом. Убихинон является единственным липидорастворимым антиоксидантом, который синтезируется в клетках и постоянно регенерируется из окисленной формы с помощью ферментных систем.

В тоже время, в результате функционирования дыхательной цепи образуется определенное количество семихинон-радикала, взаимодействующего с кислородом и продуцирующего супероксид-анион, требующий обезвреживания.

В поддержании физиологических значений АФК большой вклад вносят **тиолсодержащие молекулы:** глутатион, серосодержащие аминокислоты.

Высокая антиокислительная активность выявлена у некоторых гормонов, в частности, содержащих фенольную группу эстрогенов (женских половых гормонов) – эстрадиола, эстриола и эстрона. Химическая модификация этих соединений и исследование антиокислительного и защитного действия полученных производных при развитии окислительного стресса – перспективное направление по созданию новых антиоксидантов, более эффективных, чем их эндогенные аналоги.

Выраженной способностью связывать свободные радикалы обладает **мелатонин**. Он связывает образующиеся при перекисном окислении липидов гидроксильные радикалы, экзогенные канцерогены, активирует глутатионпероксидазу. Мелатонин полифункционален, но основные функции антиоксидантного действия направлены на защиту ДНК, в меньшей степени на защиту белков и липидов.

Мелатонин локализуется не только в цитоплазме, но и в ядрах клеток и предохраняет макромолекулы от оксидативного повреждения как в ядрах, так и во всех субклеточных структурах.

Созданы, обладающие высокой биологической активностью, синтетические хиноны, например производные о-бензохинона. Эти соединения оказывают хороший защитный эффект в условиях ишемии головного мозга, сердца, почек. Они легко восстанавливаются компонентами электрон-

транспортной цепи митохондрий и микросом в диоксибензолы, способные легко отдавать атомы водорода гидроксильных групп на восстановление радикалов.

Эффективные антиоксидантные свойства присущи транспортерам *металлов переменной валентности* (церулоплазмин, трансферрины, в частности лактоферрин и др.). Находясь в составе указанных протеинов, металлы переменной валентности не катализируют свободнорадикальные процессы. На основе белков, переносчиков металлов разрабатываются новые лекарственные препараты, обладающие антиоксидантными свойствами и низким токсическим действием.

Одним из перспективных направлений создания антиоксидантов нового поколения является конструирование гидрофильных фенольных антиоксидантов (гидрофильность существенно повышает биодоступность). Примерами уже созданных соединений могут служить тролокс и TDMG – водорастворимые аналоги α - и γ -токоферолов.

Усилия исследователей направлены на получение полифункциональных, или «гибридных», антиоксидантов комбинированного действия, сочетающих антирадикальную и антипероксидную активность, антиоксидантную и биологическую эффективность (противовоспалительную, антиканцерогенную, нейропротекторную и т. д.).

2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

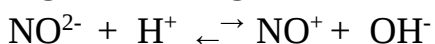
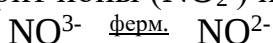
2.1. Лабораторное занятие 1. Исследование содержания нитритов и нитратов в биологическом материале

В процессе выращивания растения могут накапливать нитраты в плохо выводящейся из организма форме, особенно при внесении высоких доз азотсодержащих удобрений. Накопление азота в растениях часто происходит и из-за нехватки в почве серы и молибдена

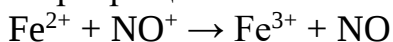
Недостаток серы вызывает недостаток серосодержащих аминокислот в клетках, препятствует синтезу белков, и, тем самым, синтезу фермента нитратредуктазы. Молибден необходим для работы нитратредуктазы. Таким образом, нитраты сохраняются в растении в неметаболизируемом состоянии.

В чем токсическое действие нитратов?

В принципе нитраты, теоретически, должны всасываться без изменений и выводиться из организма. Однако, под действием микрофлоры, содержащейся в ротовой полости и кишечнике, нитраты микробиологически восстанавливаются до нитритов, а нитриты – до нитрозил ионов, в результате в кровь поступают нитрит ионы (NO_2^-) и нитрозил ионы (NO^+)



I. Нитрозил ионы способны окислять железо (II) в гемоглобине до железа (III) и превращать гемоглобин в метгемоглобин:



Образуются:

- 1) метгемоглобин, не способный образовывать координационную связь с O_2 ;
- 2) NO – вторичный посредник, избыток которого также нежелателен организму.

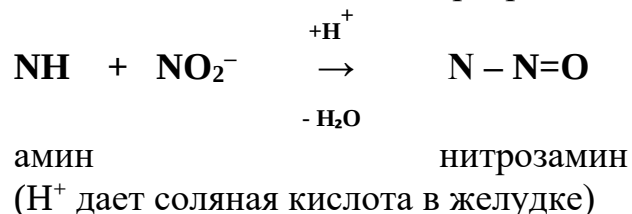
При переходе $\approx 60\%$ Fe(II) в Fe(III) развивается тяжелейший цианоз (синюха) и наступает смерть.

Особенно чувствительны к нитрозил иону грудные дети в первые недели жизни. У них в крови еще не работает гемоглобинредуктаза, восстанавливающая Fe(III) в Fe(II) , и отличается гемоглобин, его называют фетальным (Hb^F). У взрослых (HbA) → две идентичные α -цепи (по 141 аминокислотному остатку) и две β -цепи (по 146 аминокислотных остатков). Hb^F - состоит из двух α -цепей и двух γ -цепей, у Hb^F выше сродство к O_2 , что обеспечивает большую устойчивость плода к недостатку O_2 .

II. Нитриты расширяют сосуды (их применяют для снятия приступов стенокардии → нитроглицерин и аналоги), но в нормальном здоровом организме расширение сосудов нежелательно.

III. Нитриты натрия или калия в желудке под действием соляной кислоты превращаются в азотистую кислоту, обладающую мутагенным действием.

IV. Нитриты в кислой среде могут взаимодействовать с органическими аминами (последние содержатся также в растительной и животной пище). В результате из нитритов и аминов синтезируются нитрозамины. Это может происходить в ротовой полости под действием ферментов микрофлоры – нитриты из растительных остатков пищи превратятся в нитрозамины.



Нитроамины – сильнейшие канцерогены (поступление диметилнитроамина или диэтилнитроамина, или этил-метилнитроамина в течение одного месяца в дозе 20 мг/л) вызывает злокачественное перерождение печени ≈ в 80-90%. Нитроамины летучи – это делает их еще более опасными, т.к. они могут проникать в организм через дыхательные пути).

Само по себе присутствие нитратов в растениях – нормальное явление. Нитраты в норме встречаются во многих продуктах питания и хорошо переносятся организмом человека (таблица 2.1)

Таблица 2.1 – Предельно допустимые концентрации нитратов в плодах и овощах (мг/кг сырого продукта)

Продукт	Норма ПДК	Продукт	Норма ПДК
Абрикос	60	Морковь ранняя	400
Арбуз	60	Морковь поздняя	250
Банан	200	Нектарин	60
Баклажан	300	Огурец (грунтовый)	150
Виноград	60	Огурец (тепличный)	400
Груша	60	Перец (сладкий)	250
Зелень	2000	Персик	60
Дыня	90	Помидор (грунтовый)	150
Капуста ранняя	900	Помидор (тепличный)	300
Капуста поздняя	500	Редис	1500
Кабачок	400	Редька	1000
Картофель	250	Салат	2000
Клубника	100	Свекла	1400
Лук репчатый	80	Хурма	60
Лук Зеленый	600		

Как видно из данных, приведенных в таблице, к числу растений, особенно накапливающих нитраты относятся: зелень (петрушка, укроп), салат, редис, редька, свёкла, капуста и др. Пагубное влияние на здоровье проявляется только в случае превышения допустимых суточных норм их употребления с пищей.

Источники нитратов в продуктах питания

Антропогенные источники нитратов подразделяются на:

- аграрные (минеральные и органические удобрения, животноводческое производство);
- индустриальные (отходы промышленного производства и сточные воды);
- коммунально-бытовые.

Аграрные источники нитратов:

Бобовые растения, например горох, клевер и соя, накапливают на своих корнях клубеньки, в которых бактерии, фиксирующие азот, превращают его в нитраты. Шведский физикохимик, член Королевской шведской АН С.Аррениус установил, что таким способом фиксируется до 400 млн. т азота ежегодно. При неправильном использовании нитратов в качестве удобрений они накапливаются в сельскохозяйственных продуктах в чрезмерных количествах, что может привести к отравлению людей и животных.

Индустриальные источники нитратов:

- воздушного пространства (выбросы газа, парообразных веществ, дымов, аэрозолей, пыли и т.п.);
- поверхностных водоисточников (сточные воды, утечка жидких продуктов или полуфабрикатов и т.п.);
- почвы (накопление твердых отходов, выпадение токсичных веществ из загрязнённого воздуха, сточных вод).

Коммунально-бытовые источники нитратов:

загрязняющие веществ в сточных водах коммунально-бытового сектора, причем около 50 % загрязняющих веществ находится в растворенном состоянии.

Пути попадания нитратов в организм человека

Нитраты попадают в организм человека различными путями.

1. С продуктами питания: растительного и животного происхождения;

Основная масса нитратов попадает в организм человека с консервами и свежими овощами (40-80% суточного количества нитратов). Нитраты содержатся и в животной пище. Рыбная и мясная продукция в натуральном виде содержит немного нитратов (5-25 мг/кг в мясе, и 2-15 мг/кг в рыбе). Но нитраты и нитриты добавляют в готовую мясную продукцию с целью улучшения её потребительских свойств и для более длительного её хранения (особенно в колбасных изделиях).

Также нитраты попадают в организм человека через табак. Выяснено, что некоторые сорта табака содержат до 500 мг нитратов на 100 г сухого вещества.

2. С питьевой водой.

3. С лекарственными препаратами.

Существует ориентировочная величина предельно допустимого суточного потребления нитратов человеком. Она составляет 5 мг на 1 кг массы тела человека, причём считаются все нитраты, потреблённые с разными продуктами, на человека массой 60 кг это – 0,25 г. Согласно нормам ВОЗ, суточная доза для взрослого человека не должна превышать 3.7 мг на 1 кг веса. Эти показатели могут меняться в зависимости от стран. Так, предельные нормы потребления нитратов в сутки на человека установлены на следующем уровне: 50-100 мг – для Германии; 300 мг – для Грузии, Армении, Узбекистана; 400-500 мг – для США.

Даже если продукт содержит в себе допустимую концентрацию нитратов, его неумеренное употребление может нанести вред организму. Зная концентрацию нитратов в продукте питания и количество продукта, употребленного в пищу в течение дня, можно рассчитать потребленное количество нитратов.

Измерив концентрацию нитратов в продуктах питания, можно не только определить их пригодность для питания, но и оценить допустимые количества потребления.

Способы снижения содержания нитратов в растениях

Количество нитратов снижается при термической обработке овощей (мойке, варке, жарке, тушении и бланшировании). Так, при вымачивании – на 20-30%, а при варке на 60-80%. В капусте – на 58%, в столовой свекле – на 20%, в картофеле – на 40%. При этом следует помнить, что при усиленной мойке и бланшировании овощей в воду уходят не только нитраты, но и ценные вещества: витамины, минеральные соли.

Чтобы снизить количество нитратов в старых клубнях картофеля, его клубни следует залить 1%-ным раствором поваренной соли. При этом следует помнить, что картофельный отвар в пищу использовать нельзя, т.к. при варке нитраты переходят в отвар. При приготовлении пюре из картофеля лучше использовать кипяченое молоко, а не воду, в которой варился картофель;

У патисонов, кабачков и баклажанов необходимо срезать верхнюю часть, которая примыкает к плодоножке на 1/4.

Так как нитратов больше в кожуре овощей и плодов, то их (особенно огурцы и кабачки) надо очищать от кожуры, а у пряных трав надо выбрасывать их стебли и использовать только листья.

У огурцов, свеклы, редьки к тому же надо срезать оба конца, т.к. здесь самая высокая концентрация нитратов.

Хранить овощи и плоды надо в холодильнике, т.к. при температуре +2 °С невозможно превращение нитратов в более ядовитые вещества – нитриты.

Чтобы уменьшить содержание нитритов в организме человека надо в достаточном количестве использовать в пищу витамин С (аскорбиновую кислоту) и витамин Е, т.к. они снижают вредное воздействие нитратов и нитритов.

Выяснено, что при консервировании уменьшается на 20-25% содержание нитратов в овощах, особенно при консервировании огурцов, капусты, т.к. нитраты уходят в рассол и маринад, которые поэтому надо выливать при употреблении консервированных овощей в пищу.

Салаты следует готовить непосредственно перед их употреблением и сразу съедать, не оставляя их храниться, т.к. происходит накопление нитритов.

При хранении овощей в открытых емкостях вместе с гнилыми овощами увеличивается содержание нитритов в них. Не следует перерабатывать корнеплоды моркови или плоды томатов, поврежденные гнилью. Нельзя хранить овощи битые, поврежденные.

Резать зелень надо непосредственно перед употреблением. Под воздействием кислорода и микроэлементов нитраты быстро превращаются в нитриты. Для того чтобы достичь предельной концентрации, хватает всего 10 минут. Поэтому не стоит долго хранить нарезанную зелень, лучше сразу подать ее к столу и съесть.

На реализуемую продукцию выдаются сертификаты, в которых должно указываться содержание нитратов. Поэтому при покупке овощей и фруктов, особенно на рынке, можно требовать данные документы у частных лиц и продавцов.

Среди многообразия имеющихся методов анализа нитратов и нитритов в пищевых продуктах часто используют а) качественное определение: визуально по определенным признакам, на основании цветных реакций; б) количественное определение: с помощью специального прибора – нитрат тестера; ионометрический и спектрофотометрический методы.

Приготовить водную вытяжку из сока растений, плодов или ягод. Для этого 1 г растения растереть стеклянной палочкой или пестиком в ступке, добавляя 4 мл дистиллированной H₂O. Дать вытяжке отстояться или профильтровать. Эту вытяжку использовать для открытия нитритов по методу Грисса, определения аммиачного азота методом Несслера и количественного определения нитратов в биологических средах.

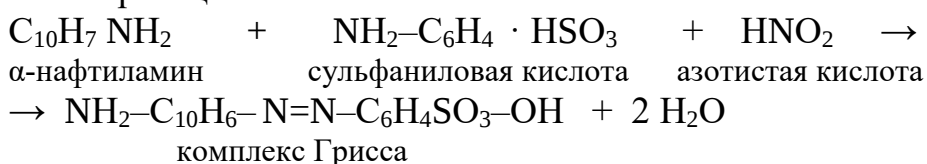
2.1.1. Лабораторная работа

Открытие нитритов по методу Грисса

Метод основан на приобретении раствором, содержащим нитриты, красной окраски при действии реактива Грисса.

Реактив Грисса состоит из нафтиламиносульфокислоты, растворенной в уксусной кислоте.

Схема реакции:



Реактив Грисса очень чувствителен к ничтожным количествам нитритов в растворе, он применим в присутствии глюкозы и других органических соединений.

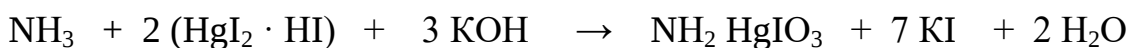
Ход работы: В пробирку внести 0,5 мл водной вытяжки растения и добавить несколько капель реактива Грисса. Через 15 мин при наличии нитритов разовьется красное окрашивание.

Определение аммиачного азота методом Несслера

Метод основан на том, что аммиак с реактивом Несслера образует соединение – йодистый меркуроаммоний. При малых количествах аммиака в растворе соединение окрашивается в желтый цвет, а при значительных – в красно-желтый.

Реактив Несслера состоит из двойной соли йодистой ртути и йодистого калия, растворенной в растворе КОН.

Схема реакции:



Ход работы: в пробирку внести 0,5 мл водной вытяжки растения и добавить несколько капель реактива Несслера. При наличии аммиака развивается соответствующее окрашивание.

Наличие в вытяжке солей кальция и магния мешает определению аммиака с реактивом Несслера, так как образуется осадок. Для устранения образования осадка к водной вытяжке растения добавляют 3 капли 50 % раствора сегнетовой соли, а затем 5 капель реактива Несслера.

Метод количественного определения нитратов в биологических средах.

Количественное определение нитратов основано на восстановлении нитратов в нитриты с помощью металлического цинка, реакции азосочетания диазотированного α -нафтиламина с сульфаниловой кислотой и фотометрическом определении интенсивности полученного при этом окрашенного соединения.

Чувствительность метода 1 мкг ионов нитрита в 1 мл колориметрируемого раствора. Ошибка метода не более $\pm 5\%$. Метод применим для определения показателя в сыворотке крови, слюне, профильтрованной моче, вытяжки из органов растений и др.

Реактивы:

1) Составной реактив: сульфат бария (высушенный до постоянной массы при 110°C) – 50 г; сульфат марганца (моногидрата) – 5 г; металлический цинк (порошок) – 1 г; лимонная кислота – 37,5 г; сульфаниловая кислота – 2 г; α -нафтиламин – 1 г.

Поместить в фарфоровую ступку вначале навески кислот и измельчить, а затем навески остальных веществ и все вместе растереть до однородной массы.

Полученный реактив хранить в склянке из темного стекла до 2 лет. Для опыта готовят навески составного реактива по 0,15 г в соответствии с количеством определяемых проб.

2) 20 % р-р уксусной кислоты 1 л.

(100 % CH_3COOH -d=1,0498 г/см³; 99 % CH_3COOH -d=1,0524 г/см³; 98 % CH_3COOH -d=1,0549 г/см³).

Ход определения:

1) К 0,5 мл водной вытяжки растений добавляют 4,5 мл 20 % р-ра CH_3COOH и 0,15 г составного реактива. Пробирку закрывают пробкой, энергично встряхивают в течение 2-х мин., затем дают отстояться или центрифугируют при 5000 об/мин. – 5 мин. После этого верхний слой аккуратно отсасывают и колориметрируют на ФЭКе в кюветах с толщиной слоя 1 см при длине волны λ –540 нм против контрольной пробы. Для контрольной пробы берут 4,5 мл 20 % р-ра CH_3COOH и 0,5 мл $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист.}}$ добавляют 0,15 г составного реактива, а далее, как описано для опытной пробы.

Окраска устойчива в течение 6 часов. Количество нитрит иона в сыворотке рассчитывают по калибровочному графику и выражают в мг/л сыворотки крови.

Построение калибровочного графика.

0,2741 г нитрита Na, (что соответствует 0,2 г нитрит иона) растворяют в $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист.}}$ и доводят объем раствора до 1000 мл 20 % р-ром CH_3COOH . Для построения калибровочного графика полученный раствор разбавляют $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист.}}$ так, чтобы содержание нитрит иона составляло: 5, 10, 25, 50, 75, 100 мкг в 0,5 мл, что соответствует линейной зависимости экстинкции от концентрации и азоокраски. Разведения стандартного раствора готовят в пробирках 1–6, как указано в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Разведения стандартного раствора нитрита Na для построения калибровочного графика.

№ пробирки	Количество стандартного раствора, мл	Количество H_2O , мл	Содержание нитрит иона в мкг в 0,5 мл раствора после разведения
1	2	0	100
2	1,5	0,5	75
3	1	1	50
4	0,5	1,5	25
5	0,2	1,8	10
6	0,1	1,9	5

Далее из каждой пробирки отбирают в чистые пробирки по 0,5 мл, обрабатывают как опытные пробы и колориметрируют против контрольной пробы. На миллиметровой бумаге строят калибровочную кривую.

На основании полученных результатов открытия нитритов по методу Грисса, определения аммиачного азота методом Несслера и количественного определения нитратов в биологических средах сделать заключение о содержании нитритов и нитратов в исследуемом продукте.

2.1.2. Контрольные вопросы

1. Какое вещество может образовываться в организме из нитритов под действием микрофлоры?
2. Какие вещества, образующиеся при восстановлении нитритов, способны окислять Fe^{2+} в Fe^{3+} , к каким неблагоприятным последствиям для организма это может привести?
3. Какое вещество образуется из нитритов под действием соляной кислоты в желудке, в чем его опасность?
4. Напишите реакцию взаимодействия аминов с нитритами, какие вещества образуются, в чем их опасность?
5. В каком случае нитраты и нитриты могут наносить вред организму?
6. Перечислите возможные источники поступления нитратов и нитритов в продукты питания.
7. Каковы пути попадания нитратов и нитритов в организм человека.
8. Какие вещества более опасны для организма – нитраты или нитриты?
9. Назовите ориентировочную величину предельно допустимого суточного потребления нитратов человеком.
10. Какие способы снижения содержания нитратов в овощах?
11. На чем основан принцип метода Грисса выявления нитритов, напишите схему реакции.
12. Какое вещество можно открыть в растении, используя реактив Несслера? Напишите уравнение реакции.
13. На каком принципе базируется метод определения нитратов и нитритов в биологических средах?

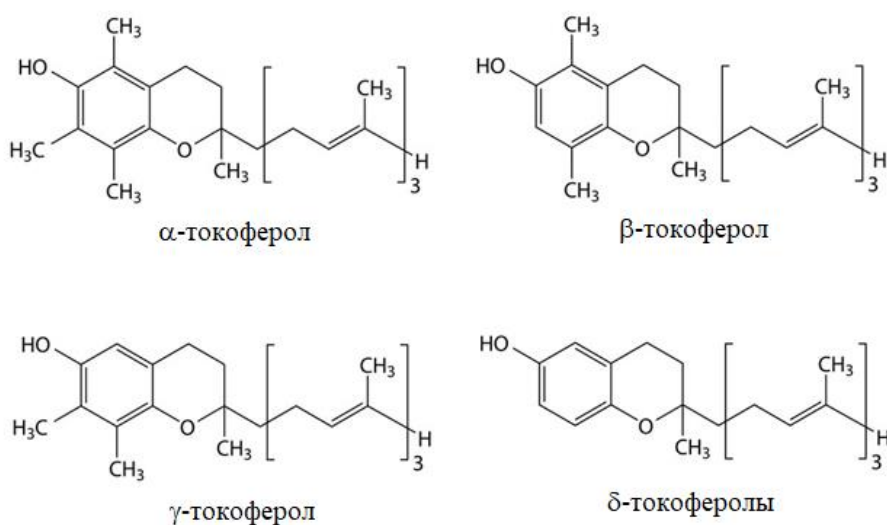
2.2. Лабораторное занятие 2. Исследование антиоксидантных эффектов α -токоферола на процессы пероксидного окисления липидов в тканях животных

Пероксидное (перекисное) окисление липидов (ПОЛ) представляет собой цепной свободнорадикальный процесс. Наиболее легко подобным образом окисляются ненасыщенные липиды или свободные жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов биологических мембран. Поэтому скорость пероксидного окисления липидов прежде всего оказывает влияние на функцию биологических мембран и на развитие в них патологических изменений.

Первичными продуктами ПОЛ являются гидропероксиды липидов, среди которых определенный процент падает на диеновые конъюгаты. Далее ПОЛ развивается по разветвленному механизму. При этом накапливаются другие

(вторичные) продукты пероксидного окисления липидов: спирты, кетоны, эпоксиды, альдегиды и диальдегиды и т. д. Среди диальдегидов представляет интерес малоновый диальдегид $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$, который образуется при свободнорадикальном окислении ненасыщенных жирных кислот, в первую очередь линоленовой и арахидоновой. Этот бифункциональный альдегид способен образовывать Шиффовы основания с аминогруппами белков, выступая в качестве внутри- и межмолекулярного сшивающего агента. В результате сшивки формируются нерастворимые липид-белковые комплексы, называемые пигментами изнашивания. Определение его концентрации служит одним из наиболее применяемых методов оценки интенсивности процессов ПОЛ.

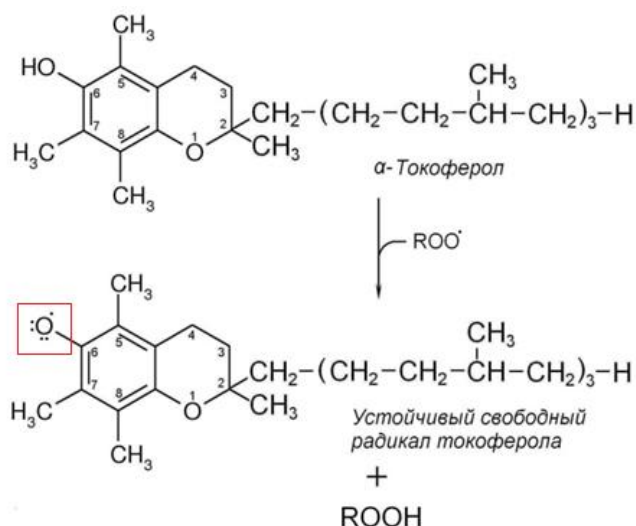
Одним из высокоэффективных компонентов системы антиоксидантной защиты является витамин *E*, который представлен смесью из 4 токоферолов и 4 токотриенолов:



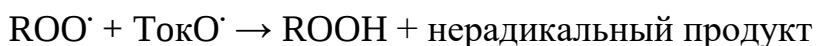
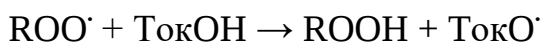
У β - и γ -токоферолов в положениях 7 и 5 заместителем является «H». δ -токоферол содержит «H» в 5 и 7 положениях

Установлено, что наиболее сильными антиоксидантными свойствами обладает α -токоферол, а самыми минимальными – δ -токоферол.

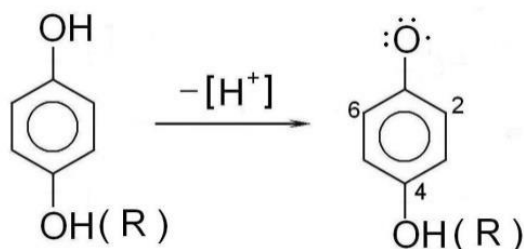
Токоферолы действуют как антиоксиданты, прерывающие цепи окисления, благодаря их способности переносить фенольный водород на пероксидный радикал. Феноксирадикал токоферола является резонансно-стабилизированной и достаточно устойчивой структурой:



Из сказанного выше следует, что токоферолы практически не вовлекаются в процесс цепной реакции. В ходе окисления хроманольного кольца и боковой цепи токоферолов образуется продукт, не являющийся свободным радикалом:



Этот продукт образует конъюгат с глюкуроновой кислотой и экскретируется с желчью. Необходимо отметить, что в подобные реакции с $\text{ROO}^\cdot$ -радикалами вступают фенолы, причем феноксирадикалы фенолов отличаются повышенной устойчивостью, особенно замещенные по 2-ому, 4-ому или 6-ому положениям:



Способность к образованию относительно устойчивых свободных радикалов токоферолов можно объяснить наличием хроманольной структуры и присутствием метильных заместителей в положениях 5 и 7.

Кроме того, радикалы токоферола могут восстанавливаться аскорбиновой кислотой, в результате чего образуется дегидроаскорбиновая кислота, восстанавливаемая в свою очередь аскорбатредуктазой.

В нормально функционирующей клетке ПОЛ протекает с определенной скоростью (базальный уровень, или спонтанное ПОЛ), оно играет важную роль для процесса апоптоза, регулирования структуры мембран и их функций (работа рецепторов и ионных каналов, высвобождение биологически активных веществ, передача сигналов между клетками и т. д.). Под действием физико-химических факторов, при развитии патологии ПОЛ может активироваться.

Так, индуктором ПОЛ может служить аскорбиновая кислота в присутствии металлов переменной валентности, так называемое аскорбатзависимое ПОЛ. Одной из систем экспериментального индуцирования ПОЛ является система Фентона, или система Fe^{2+} /аскорбат.

2.2.1. Лабораторная работа

Приготовление гомогената ткани

Реактивы: 1. 0,5 М фосфатного буфера (pH 7,4).

Ход работы. Приготовить 2 % гомогенат ткани (печень, почки). Для этого:

1) взвесить г ткани измельчить ножницами и перенести в ступку, стоящую на льду, добавить 4 мл 0,5 М фосфатного буфера (pH 7,4), растереть, затем добавить еще 5 мл буфера и хорошо перемешать, полученный 10 % гомогенат ткани отфильтровать через несколько слоев марли в пробирку.

2) к 1 мл 10 % гомогената ткани добавить 4,5 мл 0,5 М фосфатного буфера (pH 7,4) и перемешать – получили 2 % гомогенат ткани.

Определение концентрации белка биуретовым методом в гомогенате тканей крыс

Метод основан на способности белков давать с раствором сернокислой меди фиолетовое окрашивание в щелочной среде. Для биуретовой реакции необходимо наличие двух OH-групп и трех атомов азота, находящихся в полипептидной цепи. Группа, образующая пептидную связь ($-\text{OC}-\text{NH}-$) в щелочной среде, присутствует в своей таутомерной форме. В избытке щелочи происходит диссоциация водорода енольной OH-группы, при этом возникает отрицательный заряд, с помощью которого кислород, взаимодействуя с медью, образует соль; кроме того, медь образует дополнительные связи с атомами азота пептидных связей. Возникший комплекс характеризуется высокой стабильностью.

Чувствительность данного метода позволяет определять белок в диапазоне концентраций от 2 до 10 мг в пробе.

Реактивы: 1. Раствор сывороточного альбумина, содержащий 10 мг белка в 1 мл (стандартный раствор).

2. Биуретовый реактив: 0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,6 г натрий-калия виннокислого ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) растворяют в 50 мл H_2O , при энергичном перемешивании приливают 30 мл 10 % раствора NaOH, затем добавляют 0,1 г KI. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 100 мл. Реактив хранят в парафинированной или полиэтиленовой склянке в течение 1 мес.

Ход работы: В пробирку внести 1 мл гомогената, добавить 4 мл биуретового реактива, перемешать и оставить при комнатной температуре на 30 мин. Измерить оптическую плотность раствора на ФЭК при 540 нм в 1 см кювете.

Для построения калибровочного графика из стандартного раствора альбумина приготовить растворы белка, содержащие 2, 4, 6, 8 и 10 мг

альбумина в 1 мл. В каждую пробирку, содержащую 1 мл раствора белка соответствующего разведения добавить 4 мл биуретового реактива, перемешать и оставить при комнатной температуре на 30 мин.

Измерить оптическую плотность раствора на ФЭК при 540 нм в 1 см кювете. На каждую точку провести три определения, для построения калибровочного графика рассчитать среднее арифметическое из показателей трех определений для каждой точки.

Готовый калибровочный график для определения содержания белка биуретовым методом представлен на рисунке 2.1.

Содержание белка в опытных пробах рассчитывают по калибровочному графику.

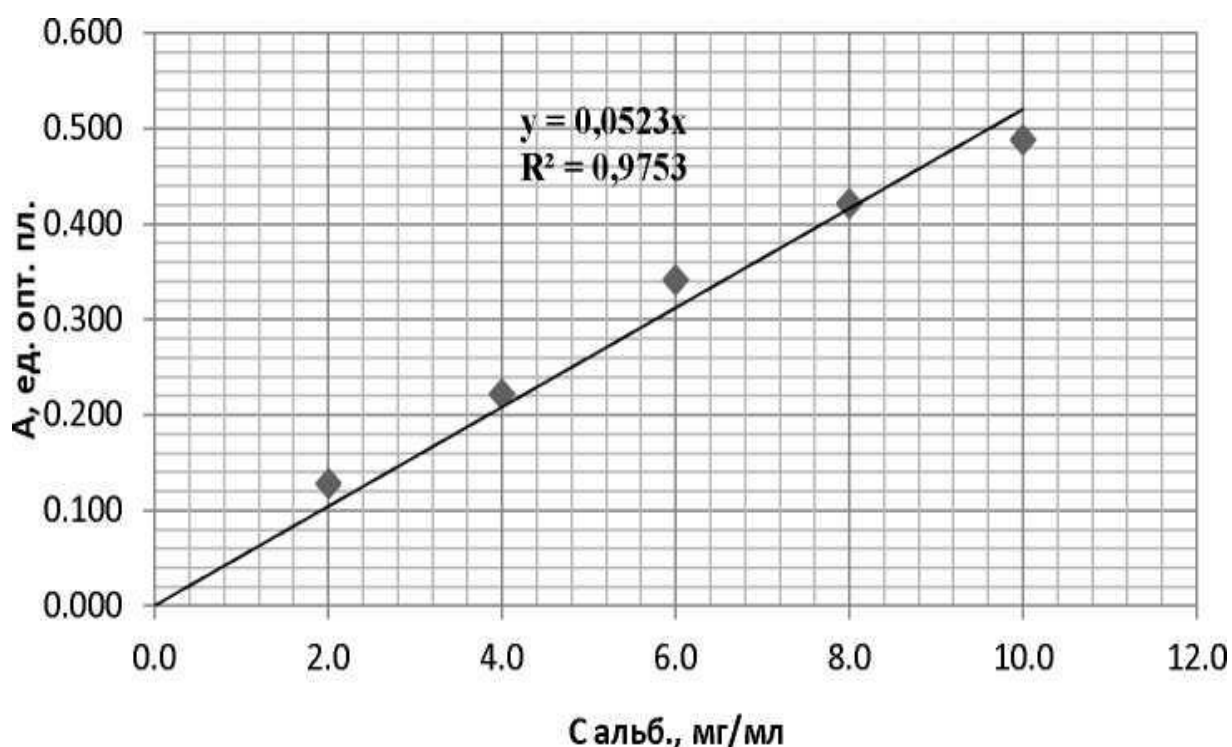


Рисунок 2.1 – Калибровочный график для определения содержания белка - биуретовый метод.

В зависимости от метода определения, возраста и пола крыс в печени в среднем содержится 0,17 – 0,26 г белка /г ткани, в почках – 0,16 –0,19 г белка/г ткани.

Определение ТБК-активных продуктов в тканях крыс при спонтанном и индуцированном ПОЛ

Об интенсивности процессов ПОЛ косвенно можно судить по количеству ТБК-активных продуктов – *вторичных* продуктов ПОЛ: альдегидов, кетонов, спиртов, эпоксидов, которые взаимодействуют с тиобарбитуровой кислотой. Среди них наиболее известен малоновый диальдегид, составляющий основной компонент группы ТБК-активных продуктов. Как правило, при поступлении в

организм ксенобиотиков, развитии патологических процессов, при которых повышается интенсивность ПОЛ, возрастает уровень ТБК-активных продуктов.

Этот тест является неспецифическим и основан на том, что при высоких температурах и низкой pH среды малоновый диальдегид реагирует с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), образуя окрашенный комплекс с максимумом поглощения при 532 нм. Молярный коэффициент экстинкции этого комплекса $\varepsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1}\text{М}^{-1}$.

Реактивы:

- 1) 0,5 моль/л фосфатный буфер (pH 7,4);
- 2) 0,8 % ТБК (тиобарбитуровая кислота) (*раствор ТБК готовить постоянно перемешивая, если плохо растворяется, то можно нагреть на водяной бане*);
- 3) 30 % трихлоруксусная кислота (ТХУ);
- 4) ацетат α -токоферола, 5 % масляный раствор развести рафинированным растительным маслом в 200 раз;
- 5) Fe/аскорбатная система индукции ПОЛ (рабочие растворы):

0,9 % NaCl;

10 ммоль/л FeSO₄ (*Mr*-151,908 г/моль);

100 ммоль/л аскорбиновой кислоты (*Mr*-176,12 г/моль).

Из каждого рабочего раствора отобрать по 100 мкл и весь объём довести до 10 мл 0,5 моль/л фосфатным буфером (pH 7,4).

Метод окисления Фентона работает в кислых условиях, где H₂O₂ в присутствии Fe²⁺ генерирует гидроксильные радикалы ($\cdot\text{OH}$) с сильной окислительной способностью, инициируя цепную реакцию других активных форм кислорода, разлагающих органические вещества. Процесс окисления представляет собой цепную реакцию, в которой образование $\cdot\text{OH}$ отмечает начало цепи, в то время как другие активные формы кислорода и промежуточные продукты реакции образуют узлы цепи. По мере того, как эти активные формы кислорода расходуются, реакционная цепочка прекращается.

Ход работы:

1. Приготовить реакционные смеси, как указано в таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Состав реакционных смесей для определения концентрации ТБК-активных продуктов в гомогенате тканей крыс.

Номер пробирки	Гомогенат ткани, 2%	Ацетат α -токоферола,	Фосфатный буфер pH 7,4	Fe/аскорбатная система
1) Спонтанное ПОЛ	0,5 мл	-	0,5 мл + 1 капля	-
2) Индуцированное ПОЛ	0,5 мл	-	1 капля	0,5 мл
3) Индуцированное ПОЛ + антиоксидант	0,5 мл	1 капля		0,5 мл

2. Пробы инкубировать на водяной бане при 37 °С в течение 30 мин.
3. Добавить в пробы (после окончания инкубации) по 0,5 мл 30%ТХУ для остановки реакции и осаждения белка.
4. Сразу же после этого в пробы внести по 2 мл 0,8 % ТБК и кипятить на водяной бане в течение 15 мин.
5. После кипячения пробы охладить до комнатной температуры, и образовавшийся осадок отделить центрифугированием в течение 10 мин при 4000g.
6. Измерить оптическую плотность надосадочной жидкости при 532 нм с использованием спектрофотометра “Solar PV 1251 с” (пластиковая кювета, $l = 1$ см) против контрольной пробы (фосфатный буфер рН 7,4).
7. Количество МДА (малонового диальдегида, или ТБК-активных продуктов) рассчитать с помощью коэффициента молярной экстинкции:

$$C = A/\varepsilon \cdot l,$$

где C – концентрация ТБК-активных продуктов, мкмоль/мг белка,
 A – оптическая плотность, ед. опт.пл.,
 ε - коэффициент молярной экстинкции комплекса МДА-ТБК, равный при длине волны $\lambda=532$ нм – $1,56 \cdot 10^5 \text{ м}^{-1} \text{ см}^{-1}$,

l – длина оптического пути, равная 1 см.

Рассчитать содержание ТБК-активных продуктов на мг белка в пробе.

На основании полученных результатов определения содержания ТБК-активных продуктов в исследуемых образцах сделать вывод о интенсивности протекания Fe/аскорбат-индуцированного ПОЛ по отношению к спонтанному и о роли α -токоферола в протекании индуцированного Fe/аскорбатной системой ПОЛ в тканях крыс.

2.3. Лабораторное занятие 3. Исследование антиоксидантных эффектов α -токоферола на процессы пероксидного окисления липидов в листьях растений

2.3.1. Лабораторная работа

Приготовление гомогената ткани лука

Реактивы: 1. 0,5 М фосфатного буфера (рН 7,4).

Ход работы: 1) взвесить 5 г листьев лука (или салата) измельчить ножницами и перенести в ступку, растереть измельченные листья, постепенно добавляя 5 мл 0,1 М фосфатного буфера рН 7,4 (допускается приготовление гомогената на дистиллированной воде), профильтровать.

Определение концентрации белка биуретовым методом в гомогенате листьев лука.

Выполнить определение концентрации белка в листьях лука как описано в

методике к лабораторной работе № 2.

В зависимости от метода определения, возраста и сорта лука в листьях в среднем содержится 15–29 г белка /кг ткани.

Определение концентрации ТБК-активных продуктов в листьях лука при спонтанном и индуцированном ПОЛ

Принцип метода и реактивы: описаны в методике к лабораторной работе № 2.

Ход работы:

1. Приготовить реакционные смеси, как указано в таблице 2.4.

Таблица 2.4 – Состав реакционных смесей для определения концентрации ТБК-активных продуктов в гомогенате листьев лука.

Номер пробирки	Гомогенат листьев лука	Ацетат α -токоферола,	Фосфатный буфер pH 7,4	Fe/аскорбатная система
1) Спонтанное ПОЛ	0,5 мл	-	0,5 мл + 1 капля	-
3) Индуцированное ПОЛ	0,5 мл	-	1 капля	0,5 мл
4) Индуцированное ПОЛ + антиоксидант	0,5 мл	1 капля		0,5 мл

2. Пробы инкубировать на водяной бане при 37 °С в течение 30 мин.
3. Добавить в пробы (после окончания инкубации) по 0,5 мл 30%ТХУ для остановки реакции и осаждения белка.
4. Сразу же после этого в пробы внести по 2 мл 0,8 % ТБК и кипятить на водяной бане в течение 15 мин.
5. После кипячения пробы охладить до комнатной температуры, и образовавшийся осадок отделить центрифугированием в течение 10 мин при 4000g.
6. Измерить оптическую плотность надосадочной жидкости при 532 нм с использованием спектрофотометра “Solar PV 1251 c” (пластиковая кювета, $l = 1$ см) против контрольной пробы (фосфатный буфер pH 7,4).
7. Количество МДА (малонового диальдегида, или ТБК-активных продуктов) рассчитать с помощью коэффициента молярной экстинкции:

$$C = A/\epsilon \cdot l,$$

где C – концентрация ТБК-активных продуктов, мкмоль/мг белка,

A – оптическая плотность, ед. опт.пл.,

ϵ - коэффициент молярной экстинкции комплекса МДА-ТБК, равный при длине волны $\lambda=532$ нм – $1,56 \cdot 10^5 \text{ м}^{-1} \text{ см}^{-1}$,

l – длина оптического пути, равная 1 см.

Рассчитать содержание ТБК-активных продуктов на мг белка в пробе.

На основании полученных результатов определения содержания ТБК-активных продуктов в исследуемом образце сделать вывод о интенсивности протекания Fe/аскорбат-индуцированного ПОЛ по отношению к спонтанному и о роли α -токоферола в протекании индуцированного Fe/аскорбатной системой ПОЛ в листьях лука.

2.3.2. Контрольные вопросы:

1. Дайте определение понятия – перекисное окисление липидов (ПОЛ). Что может инициировать этот процесс?
2. Как происходит развитие цепной реакции при ПОЛ, какие липиды в первую очередь вовлекаются в этот процесс? Представьте процесс в виде уравнения.
3. Какие первичные и вторичные продукты образуются при ПОЛ?
4. Какие соединения относятся к низкомолекулярным, а какие к высокомолекулярным антиоксидантам? Как их можно классифицировать по механизму действия?
5. Почему и какие токоферолы являются высокоэффективными антиоксидантами, каков механизм реализации их антиоксидантного действия?
6. Что понимают под спонтанным и индуцированным ПОЛ? Как можно инициировать ПОЛ в эксперименте?
7. На чем основан метод определения белка биуретовым методом, Какова его чувствительность?
8. На чем основан метод определения ТБК-активных продуктов, его специфичность?
9. В каких условиях работает система окисления Фентона.
10. Какова роль α -токоферола в протекании индуцированного Fe/аскорбатной системой ПОЛ в тканях крыс и листьях растений?

3. РАЗДЕЛ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ

3.1. Реферативная работа (УСР)

При написании реферата основное внимание уделяется биохимическому аспекту. Структура реферата должна включать: 1) титульный лист; 2) список использованных сокращений; 3) содержание; 4) введение, в котором раскрываются цели и задачи реферата; 5) основную часть с заголовками и подзаголовками разделов, (по ходу изложения материала необходимо делать ссылки на литературу); 6) заключение; 7) список использованной литературы. Желательно включить в реферат иллюстративный материал в виде таблиц, рисунков, фотографий (со ссылкой на источник).

Темы рефератов

1. Характеристика путей биотрансформации ксенобиотиков микроорганизмами.
2. Организация систем биотрансформации ксенобиотиков у растений.
3. Регуляция процессов биотрансформации на уровне синтеза белка *de novo*, посттрансляционном уровне и уровне белкового катаболизма.
4. Роль биотрансформации в адаптации организмов к воздействию негативных физических и химических факторов окружающей среды.
5. Механизмы устойчивости растений и насекомых к гербицидам и инсектицидам.
6. Ксенобиотики антропогенного происхождения, распространенные повсеместно, и их влияние на природу.
7. Способность поллютантов к биodeградации.
8. Физические и химические свойства ксенобиотиков, определяющие их токсичность.
9. Поллютанты, их клеточные мишени, виды токсического действия на организм.
10. Виды и источники загрязнения окружающей среды, опасные факторы их воздействия на экосистемы.
11. Загрязнение продуктов питания, Химические превращения веществ при обработке пищевых продуктов. Проблемы консервирования и упаковки продуктов.
12. Токсичные вещества природного происхождения в растительной пище человека.
13. Токсическое действие на человека средств борьбы с вредителями и возбудителями болезней сельскохозяйственных растений.
14. Оценка токсичности пестицидов в продуктах питания.
15. Токсичность препаратов домашнего обихода (детергенты, чистящие средства, косметика, средства гигиены и другая бытовая химия).
16. Загрязнители естественного и искусственного происхождения в быту

(воздух, вода, мебель, полимерные материалы, лаки, краски, растворители и др.) и их опасность для человека.

17. Воздействие поллютантов на организм человека (прямое, опосредованное, смешанное, эмбриотоксическое, иммуотоксическое и др.)

18. Методы повышения устойчивости человека к воздействию поллютантов (разумная витаминoproфилактика, физиотерапевтические методы, адаптационные методы, антиоксидантная защита и др.).

19. Метаболический паспорт человека.

20. История развития биохимии чужеродных соединений.

3.2. Примеры ситуационных задач

1. Ферменты, метаболизирующие ксенобиотики, отличаются широкой субстратной специфичностью. Можно ли на этом основании считать, что они недостаточно совершенные ферменты?

2. При химиотерапии рака нередко развивается устойчивость не только к используемому лекарству, но и к ряду других лекарств (множественная лекарственная устойчивость). С чем это может быть связано?

3. Царь Митридат, а затем Борджиа систематически травили политических врагов. Чтобы самим избежать отравления, они принимали яды в небольших дозах и после отравления выжили. Почему? Какие препараты можно было принимать вместо яда, если бы такие лекарства были в то время?

4. Продолжительность сна при введении гексобарбитала (снотворного) в дозе 10 мг/кг веса тела новорожденным мышам составляет 6 часов, а у взрослых мышей при дозе 100 мг/кг веса - только 1 час. Объясните, почему?

5. Какие белки плазмы крови играют основную роль в связывании и транспорте многих лекарственных веществ, жирных кислот, билирубина?

6. Гексобарбитал (снотворное) инактивируется гидроксилированием. Доза гексобарбитала (на единицу веса тела) усыпила мышей на 12 минут, кроликов - на 49, крыс - на 90, а собак - на 315 минут. У какого вида животных активность микросомальной ферментной системы окисления наивысшая?

7. Почему дозы лекарств, рассчитанные на единицу массы тела, для детей раннего возраста обычно меньше, чем для взрослых?

3.5. Примерный перечень вопросов для подготовки к зачету

1. Биотрансформация веществ: предмет, задачи, значение для биологии, химии, медицины и др.

2. Характеристика чрескожного поступления ксенобиотиков в организм и резорбция через слизистые оболочки.

3. Характеристика перорального и ингаляционного поступления ксенобиотиков в организм.

4. Характеристика транспорта и особенности распределения поступивших в организм ксенобиотиков по органам и тканям.

5. Пассивное обезвреживание ксенобиотиков. Депонирование ксенобиотиков.
6. Обезвреживание эндогенных токсических веществ. Катаболизм гема.
7. Обезвреживание аммиака.
8. Инактивация катехоламинов, стероидных гормонов гормонов.
9. Организация системы биотрансформации ксенобиотиков. Локализация процессов и фазы биотрансформации.
10. I фаза биотрансформации. Реакции окисления: деалкилирования, эпоксилирования, гидроксирования, N-окисления и окисления тиоэфиров.
11. Реакции, катализируемые флавиносодержащими монооксигеназами, флавопротеинредуктазами и дегидрогеназами.
12. Реакции гидролиза: расщепление эфиров, амидов кислот, эпоксидов.
13. Реакции восстановления: азо - и нитросоединений, карбонильных соединений, дисульфидов, сульфоксидов, хинонов.
14. Метаболизм этанола в организме человека, характеристика ферментов. Обезвреживание ацетальдегида, характеристика ферментов.
15. Метаболизм метанола в организме человека.
16. Характеристика электротранспортных цепей эндоплазматического ретикулума.
17. Характеристика цит. Р-450. Разнообразие ферментов семейства цит. Р-450. Суперсемейство генов цит. Р-450, классификация цит. Р-450.
18. Модель гидроксирования субстратов при участии цит. Р-450.
19. Методы исследования цит. Р-450. Электрохимический метод анализа активности цит.Р-450, его возможности и преимущества.
20. Методы оценки состояния системы биотрансформации ксенобиотиков: высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), ПЦР-ПДРФ анализ, ДНКчиповые технологии.
21. Моделирование взаимодействия лигандов с цит.Р-450. Методы молекулярного докинга и молекулярной динамики. QSAR модели, исследования in silico.
22. Цит. b5, роль в осуществлении микросомального окисления. Взаимодействие с цит. Р-450.
23. 2-я фаза биотрансформации. Основные ферменты и метаболиты участвующие в реакциях конъюгации, локализация процессов.
24. Глюкуронидная конъюгация, активная форма глюкуроновой кислоты, характеристика процесса, химизм реакций, значение для организма.
25. Сульфатная конъюгация, характеристика и химизм процесса, значение для организма.
26. Аминокислотная конъюгация, ферменты аминокислотной конъюгации, особенности активации процесса, химизм реакций, значение для организма.
27. Конъюгация с глутатионом, особенности протекания и химизм процесса, значение для организма. Глутатионтрансферазы, классификация, локализация.

28. Реакции метилирования и ацетилирования. Типы ацетилирования лекарственных веществ и их последствия.

29. 3-я фаза биотрансформации. Характеристика транспортных систем, участвующих в выведении ксенобиотика из клетки. Примеры функционирования. Значение для химиотерапии.

30. Удаление ксенобиотика или продуктов его биотрансформации из организма: легочная, почечная, печеночная экскреция, удаление через желудочно-кишечный тракт, кожу, выделение ксенобиотиков с молоком.

31. Характеристика факторов, влияющих на метаболизм чужеродных соединений.

32. Биотрансформация белков в кишечнике микроорганизмами (гниение белков), обезвреживание и выведение из организма.

33. Общая теория метаболизма лекарственных веществ в организме. Изменение эффектов лекарственных веществ в ходе биотрансформации. Индивидуальные особенности проявления фармакологического эффекта лекарственного вещества. Локализация процессов метаболизма лекарственных веществ.

34. Факторы, влияющие на процессы биотрансформации лекарственных веществ. Причины и проявление несовместимости лекарственных веществ.

35. Фармакокинетическая, фармакодинамическая и фармацевтическая несовместимость лекарственных веществ. Примеры несовместимых сочетаний.

36. Изоферменты семейств цит.Р-450, биотрансформирующие лекарственные вещества и их фармакологическая значимость. Общее представление о субстратах, индукторах и ингибиторах клинически значимых изоформ цит.Р-450.

37. Биотрансформация свободных радикалов. Инициация образования свободных радикалов в процессе биотрансформации ксенобиотиков. Классификация биорадикалов.

38. Пути образования активных форм кислорода, пероксинитрита, гипохлорита в организме и его значение.

39. Оксидантное действие АФК. Окислительный (оксидативный) стресс и его последствия. Окислительная модификация нуклеиновых кислот, белков, липидов и углеводов при окислительном стрессе.

40. Перекисное окисление липидов. Продукты ПОЛ и их эффекты в клетке.

41. Антиоксидантная система. Факторы антиоксидантной защиты. Классификация антиоксидантов. Высокомолекулярные и низкомолекулярные антиоксиданты.

42. Характеристика ферментов антиоксидантной защиты, химизм реакций, катализируемых супероксиддисмутазой, каталазой, пероксидазами, глутатионтрансферазами.

43. Тиоредоксины, пероксиредоксины, глутаредоксины - роль в поддержании редоксгомеостаза и обезвреживания АФК.

44. Неферментативные компоненты антиоксидантной системы. Роль

токоферола, аскорбиновой кислоты, их антиоксидантные и прооксидантные эффекты.

45. Неферментативные компоненты антиоксидантной системы. Роль ретинола, флавоноидов, их антиоксидантные и прооксидантные эффекты.

46. Антиоксидантные свойства эстрагенов, мелатонина, хинонов, транспортеров металлов переменной валентности и др.

47. Преимущества использования микроорганизмов и ферментов биотрансформации для синтеза органических веществ по сравнению с химическим синтезом. Недостатки микробиологических методов.

48. Преимущества биоутилизации отходов перед термическими (сжигание, пиролиз) и химическими (химическая трансформация, комплексообразование и др.).

49. Детоксификация и токсификация поллютантов в процессе биodeградации.

50. Биологическое значение биodeградации: возвращение основных биогенных элементов в глобальные циклы круговорота веществ; предотвращение накопления неразлагающихся остатков на Земле.

4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

4.1. Рекомендуемая литература

Основная:

1. Извекова Т.В. Основы токсикологии : учебное пособие для вузов /Т.В. Извекова, А.А. Гущин, Н.А. Кобелева; под общей редакцией В.И. Гриневича. – 3-е изд., стер. – С.-Петербург : Лань, 2023. – 152 с.
2. Дударев, А.Н. Ксенобиология для специальностей: 1-31 01 01 Биология (НПД), 1-33 01 01 Биоэкология : учебно-методический комплекс по учебной дисциплине / А.Н. Дударев, А.А. Чиркин, И.М. Прищепа. – Витебск : ВГУ имени П.М. Машерова, 2021. – 264 с.
3. Ксенобиология: учебно-методический комплекс по учебной дисциплине для специальностей: 1-31 01 01 «Биология (НПД)», 1-33 01 01 «Биоэкология» / А. Н. Дударев, А. А. Чиркин, И. М. Прищепа. - Витебск : ВГУ, 2021. – 263 с.

Дополнительная:

4. Черняк Ю.И. Цитохром Р450: основные представления, методы исследования, значение для практической медицины : учеб.-метод. пособие / Ю. И. Черняк, С. И. Колесников, Е. В. Черняк. – 2-е изд., испр. – Иркутск : Изд-во ИГУ, 2014. – 47 с.
5. Шумянцева В.В. Электрохимические методы в биохимических исследованиях/ В.В. Шумянцева [и др.] // Биологическая химия, 2015. – Т. 81. – вып. 2. – С. 188-202.
6. Основы ксенобиологии: курс лекций для студентов специальности 1—31 01 01 02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)» / Л. В. Шевцова. – Гомель : ГГУ, 2010. – 125 с.
7. Ксенобиология: учебно-методический комплекс для студентов специальностей 1-33 01 01 «Биоэкология», 1 31 01 01-02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)» / Учреждение образования «Брестский государственный университет им. А. С. Пушкина». – Брест : БрГУ, 2019. – 116 с.
8. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рем, Юрген В. / Пер. с англ. Т. В. Мосоловой – 7-е изд. – М : Лаборатория знаний, 2021. – 509 с.
9. Введение в фармацевтическую микробиологию / В. И. Кочеровец [и др.]; под ред. В. А. Галынкина, В. И. Кочеровца. – СПб.: Проспект науки, 2014. – 238 с
10. Ксенобиохимия : Учебно-методическое пособие для практических занятий /[Текст] / сост. Н.М. Титова. – Красноярск: Сиб. федер. ун-т, 2012. – 12 с.
11. Харчевникова Н.В. Квантовохимическая модель для прогноза положения гидроксирования ароматических соединений под воздействием цитохрома Р-450 / Н.В. Харчевникова, А.В. Дмитриев, Ю.В. Бородина, П.Н.

Дьячков. Биомедицинская химия, 2005. – Том 51(3). – С. 341-355.

12. Бутова С.Н. Теоретические основы биотехнологии. Биохимические основы синтеза биологически активных веществ / С.Н. Бутова, И.А. Типисева, Г.И. Эль-Регистан / Под ред. И.М. Грачевой. /– М.: Элевар. – 2003. – 554 с.

13. Молекулярное моделирование. Теория и практика / Х. Д. Хельтье [и др.]; под ред. В. А. Палюлина, Е. В. Радченко. – Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010.-318 с.

14. Медицинская экология: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений /А.А. Королев, М.В. Богданов, А.А. Королев и др., под ред. А.А. Королева. – М.: Изд. центр «Академия», 2003. – 192с.

15. Оптимизация метода подготовки проб ПЦР-РВ с целью оценки экспрессии генов в процессе контроля дозозависимого изменения функционального состояния клеток организма человека под влиянием ксенобиотиков / Н. А. Крайнова [и др.] // Биотехнология. – 2013. – № 6. – С. 71–77.

16. F. Hannemann et al. Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. *Biochim. et Biophys. Acta* 1770 (2007) 330–344.

17. A. Fantuzzi et al. A New Standardized Electrochemical Array for Drug Metabolic Profiling with Human Cytochromes P450. *Anal. Chem.* 83, (2011), 3831–3839.

18. T. W. Tam et al. Inhibition of Human Cytochrome P450 Metabolism by Blended Herbal Products and Vitamins. *Pharm. Pharmaceut. Sci.* 14(1), (2011)1-16.

19. N. E. Moskaleva and V. G. Zgoda. Modern Methods of Cytochrome P450 Analysis. *Biomedical Chemistry*, 2013. – Vol. 7, No. 2. – p. 124–135.

20. V. V. Shumyantseva et al. The Effect of Antioxidants on Electrocatalytic of Cytochrome P450 3A4. *Biomedical Chemistry*, (2013), Vol. 7, No. 2, pp. 160–164.

21. Chang, Y-C. Microbial Biodegradation of Xenobiotic Compounds /Y–C.Chan. – CRC Press, 2021, – 248 p.

22. Sheila J. Drug–drug interactions and cooperative effects detected in electrochemically driven human cytochrome P450 3A4. *Bioelectrochemistry* 86, (2012), 87–91.

23. Sandro Carrara. Multi-panel drugs detection in human serum for personalized therapy. *Biosensors and Bioelectronics* 26, (2011), 3914–3919.

24. Sheila J. Sadeghi. Breakthrough in P450 bioelectrochemistry and future perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta*.1814, (2011), 237–248.

25. Haiser, H.J. Developing a metagenomic view of xenobiotic metabolism / H.J. Haiser, P.J. Turnbaugh // *Pharmacol. Res.* – 2013. – Vol. 69, No 1. – P. 21–31.

26. Gren, I. Microbial transformation of xenobiotics / I. Gren // *Chemic.* – 2012. – Vol. 66, No 8. – P. 835-842.

27. Microbial diversity: application of microorganisms for the bio-degradation of xenobiotics / R.K. Jain [et al.] // *Cur. Sci.* – 2005. – Vol. 89, No 1. – P. 101-112.

28. V. V. Shumyantseva et al. The dose-dependent influence of antioxidant vitamins on electrochemically-driven cytochrome P450 3A4 catalysis. *Oxid.*

Antioxid. Med, 2013. – Sci., 2(2),

29. Wackett, L.P. Biocatalysis and biodegradation: microbial transformation of organ-ic compounds / L.P. Wackett, C.D. Hershberger – ASM Press, 2001. – 288 p.

4.2. Электронные ресурсы

1. Биохимия : электронный учебно-методический комплекс для специальностей: 6-05-0511-01 «Биология», 6-05-0511-03 «Микробиология», 6-05-0521-01 «Экология», 7-07-0511-01 «Фундаментальная и прикладная биотехнология» / БГУ, Биологический фак., каф. биохимии ; сост.: Кукулянская Т. А., Орёл Н. М. – Минск : БГУ, 2024. – 215 с.

2. База научных данных в области биомедицинских наук MedLine [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed)–
Дата доступа: 29.07.2025.