**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГИГИЕНЫ,
ПРОФПАТОЛОГИИ И ЭКОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА» ФЕДЕРАЛЬНОГО
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА**

В. Р. Рембовский, Л. А. Могиленкова

# ПРОЦЕССЫ ДЕТОКСИКАЦИИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА ОРГАНИЗМ

**2017**
**г. Санкт-Петербург**

УДК [615.9 : 613.8] : 504.06] : [575.17 : 575.21 : 575.22]
ББК 51.2; 52.8 Р 371

Рецензенты:

В. С. Баранов — член-корреспондент РАН, профессор, академик РАЕН, доктор биологических наук, главный специалист Санкт-Петербурга по медицинской генетике, заведующий лабораторией пренатальной диагностики наследственных и врожденных заболеваний Федерального Государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта»

Г. И. Сидорин — доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»

Р 371 В. Р. Рембовский, Л. А. Могиленкова — Процессы детоксикации при воздействии химических веществ на организм — СПб.: изд-во Политехнического у-та, 2017. — 384 с.

В настоящей монографии представлены современные сведения об обезвреживании токсичных веществ с помощью многоуровневой системы естественной детоксикации. Обсуждены механизмы поддержания химической резистентности с помощью внешних и внутренних барьеров, систем биотрансформации, антиоксидантной и иммунологической защиты, а также экскреторными органами и транспортерами ксенобиотиков.

Рассмотрены процессы взаимодействия ксенобиотиков с данными защитными структурами, роль генетического фактора (полиморфизма генов и эпигенетических изменений) в биотрансформации, иммунном и антиоксидантном индивидуальном ответе на влияние неблагоприятных внутренних и внешних факторов. Показано значение профилактических средств и лечебно-профилактического питания, а также биологически активных веществ в малых дозах для обеспечения гомеостаза организма. Систематизированы методы оценки влияния химического фактора на основные процессы детоксикации у лиц, контактирующих с опасными химическими веществами.

Книга предназначена для сотрудников научно-исследовательских организаций, преподавателей, слушателей факультетов последипломного медицинского образования в области токсикологии, профпатологии, гигиены, экологии, врачей практических учреждений, работников территориальных органов (межрегиональных и региональных), центров гигиены и эпидемиологии ФМБА России и других специалистов, осуществляющих медико-биологическое сопровождение работ на опасных химических предприятиях и других видов деятельности.

СОДЕРЖАНИЕ

**СОКРАЩЕНИЯ** **6**

**ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ** **8**

**ПРЕДИСЛОВИЕ** **11**

**ВВЕДЕНИЕ** **13**

**1. ОПАСНОСТЬ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ (КСЕНОБИОТИКОВ) ПРИ ПОСТУПЛЕНИИ В ОРГАНИЗМ РАЗЛИЧНЫМИ ПУТЯМИ И ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИХ ДЕТОКСИКАЦИИ** **15**

**2. СИСТЕМЫ БАРЬЕРОВ, ПРЕПЯТСТВУЮЩИХ ПРОНИКНОВЕНИЮ КСЕНОБИОТИКОВ В ОРГАНИЗМ** **31**

2.1 Внешние барьеры от проникновения ксенобиотиков в организм 31

2.2 Кровь и другие внутренние барьеры от проникновения ксенобиотиков в организм 34

**3. СИСТЕМА БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ** **49**

3.1 Первая фаза биотрансформации ксенобиотиков 49

3.2 Вторая фаза биотрансформации ксенобиотиков 60

3.3 Третья фаза биотрансформации ксеноботиков 78

3.4 Воздействие ксенобиотиков на процессы биотрансформации 80

3.5 Влияние генетического полиморфизма на биотрансформацию ксенобиотиков (совместно с П.П. Бельтюковым) 89

**4. СИСТЕМЫ ВЫВЕДЕНИЯ КСЕНОБИОТИКОВ И ПРОДУКТОВ ИХ ПРЕВРАЩЕНИЯ ИЗ ОРГАНИЗМА** **127**

**5. ИММУННАЯ СИСТЕМА И ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ КСЕНОБИОТИКОВ 133**
5.1 Неспецифический (врожденный) иммунитет 139
5.2 «Специализированные» клетки иммунитета 146
5.3 Адаптивный (специфический) иммунитет 150
5.4 Участие цитокинов в иммунном ответе 167
5.5 Воздействие ксенобиотиков на иммунную систему 172
5.6 Влияние полиморфизма генов на обеспечение иммунной защиты при воздействии ксенобиотиков 180

**6. ОКСИДАНТНЫЙ СТРЕСС И СИСТЕМА АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ 190**
6.1 Свободно-радикальное окисление. Оксидантный стресс 190
6.2 Антиоксидантная система 197
6.3 Полиморфизм генов антиоксидантной системы 204

**7. ОСОБЕННОСТИ ЗАВИСИМОСТИ «ДОЗА – ЭФФЕКТ» БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В МАЛЫХ ДОЗАХ 211**

**8. РОЛЬ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ И ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ПИТАНИЯ В ДЕТОКСИКАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ 225**
8.1 Профилактические средства 225
8.2 Профилактическое питание в детоксикации ксенобиотиков организмом 233

**9. ВЛИЯНИЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ (ГЕНЕТИЧЕСКИХ) ФАКТОРОВ НА ЗДОРОВЬЕ ЧЕЛОВЕКА. ПЕРСОНИФИЦИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА** 259
9.1 Полиморфизм генов и эпигенетические факторы в развитии наследственных заболеваний 259
9.2 Генетические особенности системы детоксикации при развитии мультифакториальных (многофакторных) заболеваний 270
9.3 От персонифицированной медицины к персонализированной токсикологии 290

**10. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ОСНОВНЫХ ПРОЦЕССОВ ДЕТОКСИКАЦИИ У ЛИЦ, КОНТАКТИРУЮЩИХ С ОПАСНЫМИ ХИМИЧЕСКИМИ ВЕЩЕСТВАМИ** **306**

**11. ВЛИЯНИЕ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ОТРАВЛЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ НА ГЕНЕТИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ДЕТОКСИКАЦИИ В ОРГАНИЗМЕ** (совместно с В.Н. Бабаковым, П.П. Бельтюковым, О.Н. Прохоренко, А.С. Радиловым, Л.В. Янно) **329**

11.1 Токсические свойства фосфорорганических отравляющих веществ 329

11.2 Влияние фосфорорганических отравляющих веществ на показатели детоксикации по данным токсикологических экспериментов 338

11.3 Влияние фосфорорганических отравляющих веществ на показатели детоксикации по данным клинико-эпидемиологических исследований 341

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ** **344**

**ЛИТЕРАТУРА** **349**

СОКРАЩЕНИЯ

| | |
|---|---|
| АГ | — артериальная гипертензия |
| АДГ | — алкогольдегидрогеназа |
| АЗКЦТ | — антителозависимая клеточная цитотоксичность |
| АОА | — антиоксидантная активность |
| АОЗ | — антиоксидантная защита |
| АОС | — антиоксидантная система |
| АРС | — антигенраспознающая система |
| АТ | — антитело |
| АФК | — активные формы кислорода |
| АХЭ | — ацетилхолинэстераза |
| БА | — бронхиальная астма |
| БАВ | — биологически активные вещества |
| БОВ | — боевое отравляющее вещество |
| БП | — бенз(а)пирен |
| БХЭ | — бутирилхолинэстераза |
| ГБ | — гипертоническая болезнь |
| ГЗТ | — гиперчувствительность замедленного типа |
| ГП | — гликопротеины |
| ГЭБ | — гистоэнцефалический барьер |
| ДК | — диеновые конъюгаты |
| ЕКК | — естественные киллерные клетки |
| ИБС | — ишемическая болезнь сердца |
| ИЛ | — интерлейкин |
| ИФА | — иммуноферментный анализ |
| ИФН | — интерферон |
| ИКК | — иммунокомпетентные клетки |
| КД-СТ | — кетодиены и сопряженные триены |
| КНД | — ОВ кожно-нарывного действия |
| КОЕ | — колониестимулирующая единица |
| КЭ | — карбоксилэстераза |
| ЛП | — липопротеины (липопротеиды) |
| ЛПВП | — липопротеины высокой плотности |
| ЛПНП | — липопротеины низкой плотности |
| ЛС | — лекарственное средство |
| МДА | — малоновый диальдегид |
| МКА | — моноклональные антитела |
| МНС | — главный комплекс гистосовместимости |
| МФЗ | — мультифакториальные (многофакторные) заболевания |
| НДМГ | — несимметричный диметилгидразин (1,1- диметилгидразин) |
| НРО | — неспецифическая резистентность организма |
| НТЭ | — нейротоксическая эстераза |

ОВ — отравляющие вещества
ОМ — окислительная модификация
ОМЛ — острая миелоидная лейкемия
ОСФ — оксидазы смешанной функции
ОНТ — отставленная нейротоксичность
ОУХО — объекты уничтожения химического оружия
ОХВ — опасные химические вещества
ОХХО — объекты хранения химического оружия
ПАУ — полициклические ароматические углеводороды
ПДК — предельно допустимая концентрация
ПДКр — предельно допустимая концентрация в воздухе рабочей зоны
ПНЖК — полиненасыщенные жирные кислоты
ПОЛ — перекисное окисление липидов
ПЦР — полимеразная цепная реакция
Путь введения в/в,п/к, п/о — внутривенный, подкожный, пероральный
РЛ — рак легкого
РНК — рибонуклеиновая кислота
СОД — супероксиддисмутаза
ТБ — туберкулез
ТХДД — 2,3,7,8-тетрахлордибензо-р-диоксин
ТФР — трансформирующий фактор роста
ФАВ — физиологически активные вещества
ФМБА — Федеральное медико-биологическое агентство России
ФНО — фактор некроза опухолей
ФОВ — фосфорорганические отравляющие вещества
ФОП — фосфорорганические пестициды
ФОС — фосфорорганические соединения
ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких
ХОО — химически опасный объект
УДТ — уридиндифосфат-глюкуронозилтрансферазы
УХО — уничтожение химического оружия
ЦИК — циркулирующие иммунные комплексы
ЦНС — центральная нервная система
ЦТЛ — цитотоксический Т-лимфоцит
Ац-КоА — ацетил-кофермент А
CAT — каталаза
EPXH — эпоксидгидролаза
FMO — флавинсодержащие монооксигеназы
GPX — глутатионпероксидаза
GSH — глутатион восстановленный
GST — глутатион-S-трансфераза
Ig — иммуноглобулин
IFN — интерферон

IL — интерлейкин
KoQ — коэнзим Q
MMP — матриксная металлопротеиназа
MPO — миелопероксидаза
NAD — никотинамидадениндинуклеотид
NAT — N-ацетилтрансфераза
P-gp — P-гликопротеин
PON — параоксоназы
SAM — S-аденозилметионин
SOD — супероксиддисмутазы
SULT — сульфотрансфераза
TNF — фактор некроза опухоли
TGF — трансформирующий ростовой фактор
UGT — уридиндифосфат-глюкуронозилтрансфераза

## ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

**Антиген** — это любое чужеродное вещество, которое при попадании в организм тем или иным путем вызывает иммунный ответ и способен специфично взаимодействовать с продуктами этой реакции: антителами и иммунными Т-клетками (с точки зрения биохимии — это любая молекула, которая специфично связывается с антителом). Основными свойствами антигенов являются иммуногенность и специфичность.

**Антидот** (противоядие) — фармакологическое средство, обезвреживающее яд путем химического или физико-химического взаимодействия с ним или уменьшающее вызванные им нарушения в организме: препарат, устраняющий или ослабляющий специфические эффекты яда в результате его иммобилизации и уменьшения концентрации или противодействия на уровне рецептора (ВОЗ).

**Антитело** — особый класс гликопротеинов, присутствующих на поверхности В-лимфоцитов в виде мембраносвязанных рецепторов, а также в сыворотке крови и других биологических жидкостях, которые синтезируются в ответ на введение антигена и обладают способностью специфически взаимодействовать с антигеном, вызвавшим их образование.

**Антиоксидантная система** — система, блокирующая образование высокоактивных свободных радикалов (активные формы кислорода и др.).

**Барьерные функции организма** — функции, осуществляемые особыми физиологическими механизмами — барьерами, способствующими защите организма или отдельных его частей от изменений окружающей среды, а также одновременно регулирующими необходимый для их жизнедеятельности обмен с внешней средой.

**Биотрансформация** (от био... и позднелатинского — transformatio — преображение) — биохимическое превращение проникающих в организм ксенобиотиков (ядов), в результате чего образуются либо менее токсичные вещества (обезвреживание или детоксикация), либо соединения, более токсичные, чем исходное вещество.

**Выделительная система** — совокупность органов, выводящих из организма избыток воды, продукты обмена веществ, соли, а также ядовитые вещества, попавшие в организм извне или образовавшиеся в нём.

**Гаплоид** — клетка, ядро с одинарным (гаплоидным) набором хромосом. У большинства животных и у человека гаплоидны только половые клетки, а соматические клетки диплоидны.

**Гаптен** — простое вещество (даже металл), которое может вызывать продукцию специфичных антител, если они находятся в комплексе с белком-носителем.

**Генотип** — совокупность всех генов организма, являющихся его наследственной основой.

**Детоксикация** — процесс естественного и искусственного удаления токсинов из организма.

**Иммунная система** — система органов и тканей, обеспечивающая защиту организма от генетически чужеродных клеток или веществ.

**Интоксикация** — патологическое состояние, возникшее вследствие воздействия неблагоприятного химического фактора.

Ксенобиотики — вещества, чужеродные по отношению к живым организмам и не входящие в естественные биогеохимические циклы.

**Лечебно-профилактическое питание** — специально подобранные рационы питания лиц, работающих в условиях неблагоприятного воздействия производственной среды.

**Окислительный (оксидативный) стресс** — процесс повреждения клетки в результате окисления (накопление свободных радикалов, прооксидантов, ведущих к нарушению обмена веществ и энергии, развитию различных патологических состояний).

**Полиморфизм генов** — разновидности генов (аллели), представленные в популяции и обусловливающие разнообразие признаков внутри вида. Эти различия подразделяют на четыре основные категории: а) фенотипически невыраженные (например, полиморфные участки ДНК, используемые для идентификации личности молекулярно-генетическими методами); б) вызывающие фенотипические различия (в цвете волос, росте и т.п.), но не предрасположенность к заболеванию; в) играющие некоторую роль в патогенезе заболевания (при полигенных болезнях); г) играющие основную роль в развитии заболевания (при моногенных болезнях).

**Производственно обусловленные заболевания** — общие заболевания (заболеваемость стандартизована по возрасту) различной этиологии (преимущественно полиэтиологичные), количество которых имеет тенденцию повышаться в профессиональной группе по мере увеличения стажа работы в

неблагоприятных условиях труда, и превышает число таковых болезней в группах лиц, не контактирующих с вредными факторами.

**Профессиональное заболевание** — заболевание, в возникновении которого решающая роль принадлежит воздействию неблагоприятных производственных факторов производственной среды и трудового процесса.

**Химические факторы** — вредные и опасные химические вещества, оказывающие неблагоприятное воздействие на организм человека, производственную и окружающую среду.

**Фенотип** — совокупность всех признаков и свойств организма.

**Экскреция** — удаление, выведение ядов во внешнюю среду (мочой, фекалиями, потом, выдыхаемым воздухом и др.).

**Элиминация** — полное выведение яда из организма, включает биотрансформацию и экскрецию.

# ПРЕДИСЛОВИЕ

В Российской Федерации, несмотря на то, что обеспечение химической безопасности является одним из важнейших направлений укрепления национальной безопасности, оно не доведено до должного уровня. Решение данной проблемы чрезвычайно актуально и на химически опасных предприятиях, обслуживаемых учреждениями ФМБА России, в том числе при сопровождении ракетно-космической деятельности, объектов по конверсии и уничтожению химического оружия и т.д. Условия работы на этих объектах связаны с воздействием специфических неблагоприятных факторов химической природы, требующих специальных научно обоснованных санитарно-гигиенических, лечебно-профилактических и реабилитационных мероприятий.

До настоящего времени научные исследования по оценке влияния химического фактора на организм человека в основном направлены на изучение токсических проявлений, обоснование гигиенических нормативов на основе пороговости, поиск соответствующих биомаркеров эффектов. В меньшей степени это касается критериев оценки экспозиции и восприимчивости (чувствительности/резистентности) организма конкретного человека к влиянию химических веществ в определенных условиях.

Вместе с тем современное методическое и диагностическое оснащение позволяет решать задачи как по изучению общих закономерностей глубинных патогенетических, в том числе нарушения защитных механизмов токсического процесса, так и по выявлению индивидуальной наследственно обусловленной предрасположенности ответной реакции организма на конкретное химическое воздействие на основе методологии персонифицированной (персонализированной, предиктивной) медицины. Новые достижения в области генетики, эпигенетики, иммунологии, развития омиксных технологий расширяют наши знания о роли многоуровневой системы детоксикации химических веществ в обеспечении постоянства гомеостаза и, соответственно, сохранения здоровья лиц, подвергающихся воздействию разнообразных химических соединений.

Целью работы над настоящей монографией явилось проведение научного анализа, обобщение собственных и литературных сведений по вопросам, требующим всестороннего изучения взаимодействия детоксикационных систем с химическими веществами, поступающими в организм человека.

Результаты аналитического исследования направлены на повышение квалификации специалистов медико-биологических наук, представляют

основу для разработки и внедрения новых подходов и методов диагностики, лечебно-профилактических средств в практику медико-санитарного обеспечения химической безопасности.

Отмечаем чувство признательности сотрудникам ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, чьи токсиколого-гигиенические экспериментальные и клинико-эпидемиологические материалы были использованы в настоящей работе, ссылки на соответствующие сведения представлены по мере их цитирования.

Выражаем глубокую благодарность рецензентам нашего труда — ведущим специалистам, внесшим большой вклад в медицинскую науку: в области генетики — члену-корреспонденту РАН, академику РАЕН Владиславу Сергеевичу Баранову и профилактической токсикологии — профессору Геннадию Ивановичу Сидорину за внимательное, критическое рассмотрение материалов, их обсуждение, положительную оценку, конструктивные предложения по улучшению монографии при подготовке к изданию, а также всем, кто принял участие в организации ее выпуска.

**На всякий яд имеется противоядие,**
**И Мудрый тот, кто умудряется уметь**
**Любые яды превращать в противоядия,**
**Чтоб побеждала жизнь и отступала смерть!**
Г. И. Оксенгендлер

## ВВЕДЕНИЕ

Медицинское сопровождение работ с опасными химическими веществами предусматривает мониторинг здоровья персонала химических предприятий и населения, проживающего на территории их расположения. Оценка состояния здоровья людей при воздействии химических токсикантов является многоплановой задачей вследствие многообразия факторов, влияющих на развитие разнообразной патологии [Р. Х. Райс, Л. Ф. Гуляева, 2003; Санитарно-эпидемиологическое обеспечение, 2012; В. Р. Рембовский и др., 2010, 2014].

Для ОХВ наиболее характерно то, что чем больше воздействие, тем сильнее токсическая реакция. У большей части популяции, включая работающих в контакте с химическими веществами, токсический ответ характеризуется средними (стандартными) отклонениями функции (эффекта) от дозы. Однако могут быть и чувствительные лица — это индивидуумы с повышенной реакцией на относительно малую дозу или воздействие, а также могут быть и устойчивые к воздействию индивидуумы — с пониженной реакцией на более высокую дозу или воздействие.

ФМБА России и его научно-практическими учреждениями в связи с возможным риском для здоровья действия ОХВ на химически опасных объектах (ХОО: объектах по уничтожению боевых отравляющих веществ, предприятиях ракетно-космической деятельности, «Минатома» и т.д.) организована система медико-биологического сопровождения данных работ.

Изучение санитарно-эпидемиологической обстановки показало эффективность контроля состояния производственной и окружающей среды, а также соблюдения разработанных мер защиты на объектах; определило основные этапы улучшения условий труда и среды обитания населения, внедрение в их практику [В. Р. Рембовский и др., 2010, 2012; Санитарно-эпидемиологическое обеспечение, 2012; В. В. Уйба, 2015].

Комплексные медико-гигиенические исследования здоровья работающих на предприятиях получения и испытания компонентов ракетных топлив, бывших производствах фосфорорганических отравляющих веществ и других производств химических веществ, выявили прямую зависимость состояния здоровья от условий труда (в первую очередь от степени загрязненности

производственной среды), стажа и возраста работающих.

Полученные данные свидетельствуют, что для прогнозирования риска последствий (особенно низкоуровневого воздействия) ОХВ (в частности, VX) целесообразно использование комплексных методов диагностики, включающих оценку индивидуальной чувствительности к токсичным химическим веществам. В этом плане пристальное внимание должно быть обращено на изучение процессов детоксикации организма от чужеродных веществ — ксенобиотиков (промышленные загрязнители, сельскохозяйственные яды, фармакологические препараты и др.), проведение поиска биомаркеров детоксикации конкретных ОХВ, патогенетически значимых метаболизирующих ферментов и полиморфизма генов системы метаболических превращений (биотрансформации), иммунологической реактивности [С. К. Абилев, 2 012; В. Р. Рембовский, Л. А. Могиленкова, 2 015].

На современном этапе сложность представляет исследование многофакторности воздействия на здоровье наблюдаемых контингентов лиц как внешнего, так и внутреннего характера. Данному аспекту в области промышленной токсикологии и экологии посвящено достаточно большое число публикаций. Вместе с тем имеется мало работ обобщающего характера. В немногих работах названные процессы рассматривались как согласованные функционирующие звенья целостной системы [Ю. П. Антонов и др., 1979; Ю. И. Черняк, 2005]. Поэтому актуально выявление не только токсических эффектов различных ксенобиотиков, но и изучение процессов многоуровневой системы их детоксикации, установления взаимосвязанных механизмов поддержания гомеостаза при многообразных воздействиях внешних фактов.

В настоящей работе систематизированы и обобщены результаты собственных исследований и литературные данные по изучению защитных механизмов организма при поступлении ОХВ и других ксенобиотиков, а также основные методы диагностики состояния детоксикационных функций организма, наличия генного полиморфизма и эпигенетических нарушений, влияющих на здоровье людей.

Материалы данной монографии предназначены для использования в научной, практической и педагогической деятельности специалистов в области промышленной токсикологии, профилактической медицины и других направлений по защите здоровья работников химически опасных предприятий и населения, проживающего в экологически неблагоприятных регионах Российской Федерации.

# 1. ОПАСНОСТЬ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ПРИ ПОСТУПЛЕНИИ В ОРГАНИЗМ РАЗЛИЧНЫМИ ПУТЯМИ И ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИХ ДЕТОКСИКАЦИИ

При воздействии опасных химических веществ, некоторых лекарственных средств и других ксенобиотиков могут возникать патологические состояния, оцениваемые как токсический эффект, который является предметом токсикологии [С. Н. Голиков и др., 1986; Общая токсикология, 2002; Ю. М. Степанов, 2008].

Самым древним документом, свидетельствующим о знаниях людей о ядах, является Эберский папирус, написанный примерно за 1500 лет до н.э. В нем содержатся сведения об опии, мышьяке, аконите, циансодержащих гликозидах и других ядовитых соединениях.

История становления токсикологии уходит во времена Гиппократа (460-377 гг. до н.э.), Галена (около 130-200 гг.), Парацельса (1493-1541 гг.), Рамаццини (1633-1714 гг.). Предметом их исследований являлись, в основном, растительные яды, угарный газ (оксид углерода), некоторые металлы.

Дальнейшее развитие эмпирической токсикологии связано с трудами Парацельса и ятрохимическим направлением в медицине. Формирование научной токсикологии начинается в середине XIX века. Основателем токсикологии как науки является М. Ж. Орфила (1815 г.), который впервые описал эффекты воздействия ядов на организм.

Во второй половине XIX века К. Бернар заложил основы экспериментальной токсикологии, целью которой является изучение последствий воздействия токсичных веществ на организм животных.

В России пионером экспериментальных исследований был Е. В. Пеликан (1824-1884 гг.). Основоположниками токсикологии (в том числе промышленной токсикологии) в нашей стране являются Н. В. Лазарев (1882-1973 гг.), Н. С. Правдин (1882-1954 гг.). Н. В. Лазарев указывал на необходимость лечения при отравлении ядами с помощью естественной детоксикации.

Термин «токсикология», определяющий самостоятельное научное направление, введен в 1969 г., когда при Международном научном комитете по проблемам окружающей среды была организована специальная комиссия, определившая основные направления работ по токсикологии.

С развитием биохимии связано изучение процессов детоксикации чужеродных веществ. Исследование биотрансформации ксенобиотиков стало возможным в конце прошлого века в рамках использования биохимических

подходов в токсикологии.

В конце XIX в. началось становление биохимии как самостоятельной науки, связанное с резким увеличением интенсивности и глубины биохимических исследований, объема получаемой информации, возросшим ее прикладным значением — использованием в промышленности, медицине, сельском хозяйстве. Термин «биохимия» в 1903 г. предложил немецкий химик К. Нойберг.

Одним из основоположников отечественной биохимии является А. Я. Данилевский (1838-1923 гг.), который впервые высказал идею об обратимости действия ферментов, на основании чего был осуществлен ферментативный синтез белковоподобных веществ.

Крупнейший немецкий химик-органик и биохимик Э. Фишер (1852-1919 гг.) установил структуру, предложил формулы и исследовал свойства почти всех аминокислот, входящих в состав белков. А. Н. Бах (1857-1946 гг.), ставший основателем советской биохимической школы, заложил основы учения о физиологической роли ферментов.

Значение данных глубоких исследований важно и в наше время; в частности, при выяснении роли оксигеназ, пероксидаз, каталазы, разлагающих токсическую перекись водорода, образующуюся в процессе биологического окисления.

Изучение ведущих процессов детоксикации — биотрансформации — началось в 50-х годах XX века. М. Клингерберг и Д. Гарфинкель (1958 г.) открыли фермент, по химической природе простетической группы, нековалентно связанный с белком, в 1962 г. отнесенный к цитохромам.

Т. Омура и Р. Сато в 1964 г. обнаружили, что комплекс восстановленного гемопротеина с окисью углерода имеет характерный максимум при 450 нм, поэтому фермент назван цитохром Р450. Были выделены две фазы биотрансформации экзогенных и эндогенных веществ. Известно более 150 различных изоформ основного фермента 1 фазы биотрансформации — цитохрома Р450, обнаруженных в животных, растениях, грибах, бактериях.

К концу XIX столетия относится открытие Н. И. Луниным витаминов (1880 г.). Установлено, что витамины являются составной частью около 150 ферментов, которые в живом организме работают в качестве катализаторов основных химических процессов, в том числе при детоксикации ксенобиотиков.

В 40-е и особенно 50-е годы XX в. наблюдалось усиленное использование в биохимических исследованиях физических, физико-химических и математических методов, успешное изучение основных жизненных процессов на молекулярном и надмолекулярном уровнях.

Статья Д. Уотсона и Ф. Крика о строении двойной спирали ДНК положила начало новому научному направлению — молекулярной биологии.

Касаясь истории развития иммунологии, науки изучающей механизмы и способность защиты организма человека от генетически чужеродных структур с помощью иммунной системы, следует выделить основные открытия, имеющие фундаментальную роль в ее развитии.

Основателем иммунологии заслуженно считается Луи Пастер, который в 1887 г. обосновал и успешно произвел вакцинацию человека против бешенства. Прочный научный фундамент иммунологии создал И. И. Мечников, открывший явление фагоцитоза. Он ввел понятие «клеточный иммунитет» (Нобелевская премия, 1908 г.).

П. Эрлих является одним из создателей иммунологии и основателем химиотерапии. П. Медавар и Ф. Бернет открыли иммунологическую толерантность и обосновали клонально-селекционную теорию образования антител (1960 г.). Дж. Снелл, Ж. Доссе, Б. Бенацерраф открыли систему гистосовместимости HLA (1980 г.).

Научное направление, занимающееся изучением влияния ксенобиотиков на иммунную систему, — иммунотоксикология — сформировалось более 30 лет назад. В России это направление развивает П. Ф. Забродский [П. Ф. Забродский, 1998]. Большое значение имеет изучение иммунитета — защиты организма от генетически чужеродных агентов экзогенного и эндогенного происхождения, направленной на сохранение и поддержание генетического гомеостаза организма, его структурной, функциональной, биохимической целостности и антигенной индивидуальности.

Широко ведутся исследования обмена веществ, процессов биотрансформации, генетического полиморфизма, эпигенетических изменений у человека с целью оздоровления, разработки кардинальных методов борьбы с онкологическими, сердечно-сосудистыми и другими мультифакторальными заболеваниями, нахождения путей увеличения продолжительности жизни. Данные изыскания на стыке биохимии и медицины дали новый толчок для изучения многообразия структур, участвующих в обеспечении гомеостаза и процессов обезвреживания ксенобиотиков с учетом индивидуальных полиморфизмов генов.

Эти исследования входят в 3 взаимосвязанные направления: экспери-ментально-теоретическое, профилактическое (гигиеническое) и клиническое.

Экспериментально-теоретическое направление включает изучение основных закономерностей взаимодействия вещества с биологическими объектами, законов и механизмов взаимодействия организма и токсиканта (токсического процесса и обезвреживания ксенобиотиков в организме) на

разных уровнях: субклеточном, клеточном, органа, системы, организма.

Это направление в основном проводит эксперименты на животных, разрабатывает методы экстраполяции данных с животных на человека.

Профилактическое — занимается предупреждением потенциальной опасности вредного воздействия токсикантов на живые организмы и экосистемы. Профилактическая токсикология определяет опасность химических веществ и разрабатывает способы защиты человека от их воздействия; изучает токсические свойства новых химических веществ. Устанавливает критерии вредности и опасности, обосновывает и разрабатывает ПДК и другие гигиенические нормативы вредных веществ, правовые акты, нормативно-методические и другие документы, которые должны обеспечивать сохранение жизни и здоровья населения в условиях химических воздействий.

Клиническое направление исследует заболевания (острые и хронические), которые возникают под воздействием химических веществ на организм человека. В рамках этого направления совершенствуются средства и методы диагностики и лечения отравлений, вводятся новые подходы персонализированной медицины на основе современных достижений молекулярной биологии. Клиническая токсикология является областью практической медицины и занимается оказанием помощи при острых отравлениях, выявлением и лечением патологии, которая в том числе обусловлена профессиональными особенностями течения острых и хронических интоксикаций.

В системе диагностики влияния ксенобиотиков на организм человека актуальным является проведение всесторонних исследований, которые включают оценку психофизиологических, биохимических (в т.ч. активности процессов биотрансформации), иммунологических, генетических и других показателей, характеризующих функциональное состояние организма и его защитных механизмов в целом.

Изучение влияния химических веществ на организм проводится с использованием современных достижений токсикологии и смежных медико-биологических и физико-химических наук.

В патогенезе интоксикации большую роль играют физико-химические свойства ксенобиотиков и ответные реакции организма, в том числе защитные механизмы барьерных, метаболических, иммунной и других систем.

Степень и характер вызываемых нарушений также зависят от пути попадания в организм, дозы, (концентрации), времени воздействия вещества, его растворимости, летучести, температуры, атмосферного давления, влажности и других характеристик окружающей среды. Так, высокая

температура влияет на летучесть газа, скорость испарения токсиканта и т.д.

При высокой температуре воздуха опасность отравления повышается; повышение влажности воздуха усиливает токсичность некоторых ядов (соляная кислота, фтористый водород).

Все химические вещества по степени опасности для организма делятся на 4 класса: чрезвычайно опасные, высоко опасные, умеренно опасные и малоопасные. В понятие опасные химические вещества входят вещества, относящиеся к 1 и 2 классам опасности (чрезвычайно и высоко опасные).

По характеру развития и длительности течения патологического процесса при воздействии химических соединений различают две основные формы отравлений — острые и хронические интоксикации.

Острая интоксикация наступает, как правило, внезапно после кратковременного воздействия относительно высоких концентраций яда и выражается более или менее бурными и специфическими клиническими симптомами.

Хронические интоксикации вызваны поступлением в организм малых доз веществ при длительном их воздействии, иногда определяющемся несколькими годами. Большинство промышленных ядов вызывают как острые, так и хронические отравления.

По токсикологической классификации в зависимости от характера действия на организм химические вещества подразделяют на:

— общетоксического действия (1-4 классов опасности: углеводороды, хлорированные углеводороды, спирты, анилин, синильная кислота, соли ртути, оксид углерода, пестициды и др.);

— вещества с остронаправленным механизмом действия (отравляющие вещества кожно-нарывного действия, фосфорорганические соединения, хлор и другие);

— раздражающего действия (слизистые оболочки дыхательных путей, глаз, легких, кожа — диоксид серы, хлор, фтор, аммиак, ацетальдегид, пары кислот, щелочей, и т.д.), в том числе удушающие вещества (оксид углерода, оксиды азота);

— мутагены (этиленамин, свинец, хлорированные углеводороды, соединения ртути и др.);

— канцерогены (бенз(а)пирен, винилхлорид, гидразины, ароматические углеводороды, циклические амины, асбест, никель, хром и др.);

— сенсибилизирующего действия (аллергены: ПХА, формалин, лаки на основе нитро- и нитрозосоединения и др.);

— вещества, опасные для репродуктивного здоровья (эмбриогены, тератогены и др.);

— метаболические яды (диоксины, бензофураны, метилхлорид, диметилсульфат, этиленоксид и др.).

Многие вещества обладают смешанным типом действия.

По «избирательной токсичности», отражающей опасность для органов-мишеней, химические вещества подразделяются на:

— нейротоксиканты (спирты, ароматические углеводороды, ФОС, ФОВ, алкоголь и его суррогаты, наркотики и др.);

— кардиотоксические (соли калия, бария);

— легочные (оксиды азота, озон, хлор, ОВ);

— печеночные (хлорированные углеводороды, фенолы, альдегиды);

— почечные (соединения тяжелых металлов, этиленгликоль, щавелевая кислота);

— гемотоксические (анилин и его производные, нитриты, мышьяковистый водород);

— эндокринные разрушители (бисфенол, диоксины и др.);

— гастроэнтерологического действия (крепкие кислоты, щелочи, соединения тяжелых металлов, мышьяка).

Изучение влияния условий труда на здоровье работающих на химически опасных объектах, обслуживаемых медицинскими учреждениями ФМБА России, показало, что наиболее часто встречаемой явилась невропатология [Санитарно-эпидемиологическое обеспечение..., 2012; Л. В. Янно и др., 2002]. Также распространены заболевания органов пищеварения, кожи и подкожной клетчатки, сердечно-сосудистой системы.

Ряд загрязнителей производственной среды, по данным ретроспективного анализа, представлял опасность формирования канцерогенного и мутагенного эффектов (НДМГ, винилхлорид, диоксины и др.).

У наиболее чувствительных лиц наблюдалась активация аутоаллергических процессов, снижение антиинфекционной резистентности и другие иммунологические изменения [Л. А. Могиленкова, В. Р. Рембовский, 2006; Л. В. Янно и др., 2010].

Полученные нами данные явились основой для разработки мер профилактики, выбора методов диагностики, средств лечения и экспертизы пострадавших от действия разнообразных химических веществ.

Критериями начальных признаков воздействия ОХВ, обладающих общетоксическим действием, являются изменения психофизиологических показателей ЦНС, вегетативной нервной системы, органов чувств (обонятельный, зрительный анализаторы), гемограммы и иммунологической резистентности.

При длительном воздействии ОХВ у персонала химически опасных

объектов отмечается рост общей заболеваемости, хронической патологии поражаемых органов и систем, нарушения репродуктивной функции, отдаленные последствия, включая канцерогенный эффект.

Функциональные изменения у работников отмечались с первого года контакта с ОХВ; в дальнейшем отклонения здоровья или стабилизировались, или прогрессировали с увеличением стажа работы.

В первый год работы действие химического фактора вызывало у работников повышение числа острых заболеваний верхних дыхательных путей, кожи и подкожной клетчатки, гастрита. Ухудшение самочувствия являлось причиной «текучести» кадров, которая была особенно высокой в период опытно-промышленного освоения новых технологий. Это могло быть обусловлено токсическим стрессом и связанным с ним высоким нейропсихическим напряжением.

Особенно выраженный стресс наблюдался при работах с нейротоксикантами (ФОВ, НДМГ, СУРТ и др.). Он характеризовался нейроэндокринными нарушениями, сопровождающимися психическими отклонениями по типу пограничных психических расстройств.

Изменения, характерные для специфического воздействия ОХВ, вплоть до развития хронической профинтоксикации, у большинства работников выявлены при стаже более 10-15 лет.

Высокая индивидуальная чувствительность наблюдалась у лиц, работающих в контакте с синтетическими углеводородами, нитроэфирами и другими ОХВ [Санитарно-эпидемиологическое обеспечение…, 2012; О. Н. Танюхина и др., 2007].

Вопрос своевременного выявления и оценки возможных проявлений токсических эффектов ОХВ актуален до настоящего времени.

При выборе методов ранней диагностики сочетанного действия производственных факторов на организм следует отметить, что существует большое количество причин, влияющих на состояние здоровья человека.

Среди значимых внешних факторов, влияющих на состояние здоровья работников химических производств, превышение допустимых уровней содержания в производственной среде химических соединений, связанное с несоблюдением санитарно-гигиенических требований, развитием нештатных и аварийных ситуаций, относится к основному опасному производственному фактору.

Из числа внутренних факторов наиболее важными являются наследственная предрасположенность, общее состояние здоровья человека, пол, возраст. Работник может занижать или переоценивать свою работоспособность, самочувствие и т.д.

Общая схема взаимодействия ксенобиотика и организма представлена на рисунке 1.1.

При оценке влияния ОХВ на организм в различных группах профессионального риска важным является выбор патогенетически значимых критериев нарушения здоровья с учетом профессии, стажа работы, степени загрязненности производственной среды и других показателей условий труда, образа жизни и т.д.

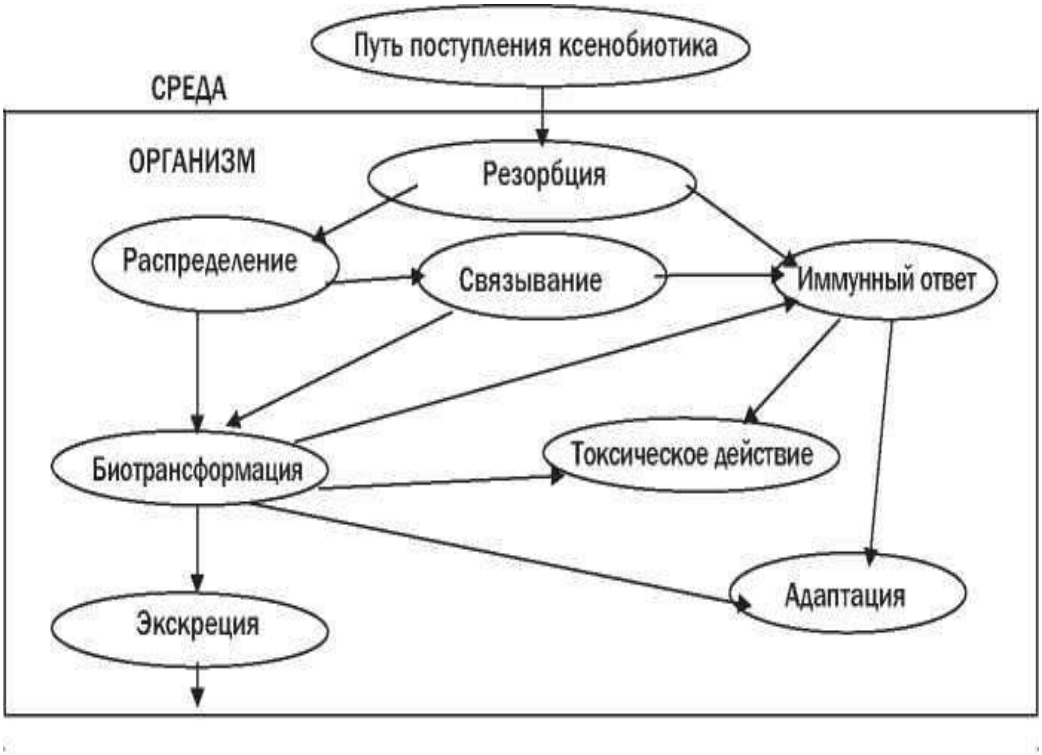


Рис.1.1 Этапы взаимодействия ксенобиотика с организмом.

В современных условиях в области промышленной токсикологии и профпатологии основное внимание уделяется изучению токсического процесса в рамках токсикодинамики.

Однако, так как организм представляет собой сложную систему, состоящую из большого числа компартментов (отделов: кровь, ткани, внеклеточная жидкость, внутриклеточное содержимое и т.д.) с различными свойствами, отделенных друг от друга биологическими барьерами, влияние на человека ксенобиотиков при поступлении (аппликации) в организм целесообразно исследовать и с позиций токсикокинетики (резорбции, распределения ксенобиотиков в тканях и органах, их биотрансформации и элиминации из организма), а также реагирования на эти процессы нейроэндокринной,

иммунной, сигнальной и других систем, участвующих в механизмах защиты от чужеродного воздействия.

Токсикокинетические характеристики вещества обусловлены как его свойствами, так и особенностями структурно-функциональной организации клеток, органов, тканей и организма в целом.

В рамках токсикокинетики изучаются следующие процессы.

Растворение — накопление вещества в жидкой фазе (растворителе) в молекулярной или ионизированной форме. Проникнуть во внутренние среды организма могут лишь растворившиеся (в поте, жировой смазке кожи, желудочном или кишечном соке и т.д.) вещества.

Конвекция — механическое «перемешивание» среды, приводящее к уравниванию концентрации ксенобиотика, растворенного в ней.

Вещества, проникшие в кровоток, распределяются в организме, прежде всего, путем конвекции. Так как скорость кровотока в капиллярах существенно ниже, чем в крупных сосудах (в капиллярах — 0,03-0,05 см/сек; в аорте — 20 см/сек), перемешивание токсиканта в крови в основном осуществляется в сердце, аорте и крупных сосудах.

Диффузия — перемещение массы вещества в среде в соответствии с градиентом концентрации, приводящее к самопроизвольному выравниванию концентраций по всему занимаемому объёму.

Физиологически значимые диффузионные процессы осуществляются на небольшие расстояния — от нескольких микрон до миллиметра. Дело в том, что время диффузии возрастает пропорционально квадрату пути, проходимому молекулой (для диффузии на расстояние 1 мкм потребуется время 10-2 с, для 1 мм — 100 с, для 10 мм — 10000 с, т.е. три часа).

Фильтрация — движение растворенного вещества вместе с растворителем через пористые мембраны под действием гидростатического давления.

Осмос — процесс перемещения растворителя через мембрану, непроницаемую для растворенного вещества, в сторону более высокой концентрации последнего, под влиянием силы осмотического давления. Осмотическое давление раствора пропорционально количеству частиц растворенного вещества.

К свойствам химического вещества, определяющим его токсикокинетику, относятся:

— сродство токсикантов к структурным элементам клеток различных тканей и органов;

— агрегатное состояние. Биодоступность ксенобиотика, т.е. его способность поступать во внутренние среды организма, а также пути проникновения, во многом определяются агрегатным состоянием. Так, пары

синильной кислоты поступают в организм через легкие, жидкая синильная кислота может попасть в организм через кожу (в очень ограниченном количестве) и через желудочно-кишечный тракт, через желудочно-кишечный тракт поступают также соли синильной кислоты и их растворы;

— отношение растворимости вещества в неполярных растворителях (в том числе липидах) к растворимости в воде. Этот показатель влияет на способность соединений преимущественно накапливаться в соответствующей среде (жирорастворимые накапливаются в липидах; водорастворимые — в водной фазе плазмы крови, межклеточной и внутриклеточной жидкости), а также преодолевать биологические барьеры;

— размер молекулы. Чем больше молекула, тем меньше скорость ее диффузии, тем в большей степени затруднены процессы фильтрации и т.д. Поэтому размеры, прежде всего, влияют на проницаемость ксенобиотиков через биологические барьеры. Так, молекула CO (оксид углерода, угарный газ) практически мгновенно проникает в организм через легкие и быстро распределяется в крови и тканях, а молекуле ботулотоксина (МВ более 150000) для этого требуются часы;

— наличие заряда в молекуле. Влияет на прохождение веществ через барьеры и их растворимость в различных биосредах. Заряженные молекулы (ионы) плохо проникают через ионные каналы, не проникают через липидные мембраны, не растворяются в липидной фазе клеток и тканей. Даже ионы одного и того же элемента, имеющие различный заряд, по-разному преодолевают биологические барьеры: ионы $Fe^{+2}$ — всасываются в желудочно-кишечном тракте, а $Fe^{+3}$ — нет;

— величина константы диссоциации солей, слабых кислот и оснований. Определяет относительную часть молекул токсиканта, диссоциировавших на ионы в условиях внутренней среды. Важнейшими характеристиками организма, влияющими на токсикокинетику ксенобиотиков, являются свойства его органов и систем, а также разделяющих их биологических барьеров.

Основными свойствами компартментов являются:

— соотношение воды и жира. Биологические структуры, ткани, органы могут содержать большое количество липидов (биологические мембраны, жировая ткань, мозг) либо преимущественно состоять из воды (мышечная ткань, соединительная ткань и т.д.). Чем больше жира в структуре, тем в большем количестве в ней накапливаются жирорастворимые вещества. Так, хорошо растворимые в липидах молекулы фосфорорганических соединений легко проникают в мозг;

— наличие молекул, активно связывающих токсикант. Например, клетки тканей с высоким содержанием цистеина (кожа и ее придатки) активно

накапливают вещества, образующие прочные связи с сульфгидрильными группами (мышьяк, таллий и т.д.). Белки костной ткани активно связывают двухвалентные металлы (стронций, свинец).

К биологическим барьерам относятся структуры самого разного строения [Барьерные функции. [Электронный ресурс]; В. А. Кондрашов, 2014]. Это клеточные и внутриклеточные мембраны, гистогематические барьеры (например: гематоэнцефалический, плацентарный и т.д.) покровные ткани (кожа, слизистые оболочки). Все барьеры — гидрофобные образования, богатые липидами, поэтому их легко преодолевают вещества с высоким значением коэффициента распределения в системе «масло/вода» (хорошо растворимые в липидах). Многие барьеры содержат «поры» — заполненные водой «каналы» в биологическом барьере (структура и размеры пор в разных барьерах различны).

К основным свойствам барьеров относятся толщина и суммарная площадь. Чем тоньше барьер и чем больше площадь его поверхности, тем большее количество вещества может через него пройти в единицу времени.

Среди барьеров, образованных покровными тканями, наибольшую поверхность имеет альвеолярно-капиллярный барьер легких и слизистая тонкого кишечника. Через органы дыхания в организм могут поступать вещества, находящиеся в воздухе в газообразном и аэрозольном состоянии (ФОС, ФОВ, НДМГ, диоксины, $NO_2$, $CO_2$ и т.д.).

Некоторые токсиканты подвергаются химическим превращениям непосредственно в дыхательных путях, поэтому их задержка в организме происходит с более постоянной скоростью. Кроме того, они способны разрушать саму альвеолярную мембрану, нарушать ее барьерную и транспортную функцию, что ведет к развитию токсического отека легких.

При наличии в воздухе аэрозолей в дыхательных путях происходит два процесса: задержка и выделение поступивших частиц. На процесс задержки влияет агрегатное состояние аэрозолей (твердые, жидкие) и их физико-химические свойства (размер частиц, форма, гигроскопичность, заряд). В верхних дыхательных путях задерживается 80-90% частиц величиной более 10 мкм, в альвеолярную область поступает 70-90% частиц размером менее 5 мкм (в среднем 1-2 мкм).

Ряд жирорастворимых соединений — фенолы, некоторые соли, особенно цианиды, при пероральном пути поступления всасываются в кровь уже в полости рта. На протяжении ЖКТ существуют различные градиенты pH, определяющие различную скорость всасывания токсичных веществ.

Кислотность желудочного сока близка к единице, вследствие чего все кислоты здесь находятся в неионизированном состоянии и легко

всасываются. Напротив, неионизированные основания (например, морфин, ноксирон) поступают из крови в желудок и отсюда в виде ионизированной формы движутся далее в кишечник.

Токсичные вещества в желудке могут сорбироваться пищевыми массами, разбавляться ими, в результате чего уменьшается контакт яда со слизистой оболочкой. Кроме того, на скорость всасывания влияют интенсивность кровообращения в слизистой желудка, перистальтика и количество слизи.

В основном всасывание ядовитых веществ происходит в тонком кишечнике, pH секрета которого 7,5-8,0.

На резорбцию ядовитых соединений и их депонирование в желудочно-кишечном тракте влияют колебания pH желудочно-кишечной среды, активность ферментов ЖКТ, большое количество соединений, образующихся в процессе пищеварения и т.д.

В кишечнике, так же как и в желудке, липидорастворимые вещества хорошо всасываются путем диффузии, а всасывание электролитов связано со степенью их ионизации. Вещества, близкие по химическому строению к природным соединениям, всасываются путем пиноцитоза, проявляющегося наиболее активно в области микроворсинок слизистой тонкой кишки.

Трудно всасываются прочные комплексы токсичных веществ с белками, что свойственно, например, редкоземельным металлам. Замедление регионального кровотока и депонирование венозной крови в области кишечника при экзотоксическом шоке приводит к уравниванию локальных концентраций ядов в крови и в содержимом кишечника, что составляет патогенетическую основу замедления всасывания и увеличения местного токсического эффекта. Например, при отравлениях гемолитическими ядами (уксусная эссенция) это приводит к более интенсивному разрушению эритроцитов в капиллярах стенки желудка и быстрому появлению в этой зоне тромбогеморрагического синдрома (тромбы вен подслизистого слоя желудка, множественные кровоизлияния и др.).

Химические вещества через кожу могут проникать через эпидермис, придатки кожи (волосяные фолликулы, потовые и сальные железы). Общая поверхность кожи человека (приблизительно) 1,5 $м^2$. Вещество, проникающее через кожу, проходит через все слои эпидермиса до базальной мембраны включительно и только после этого всасывается в кровеносные капилляры или лимфатическую систему дермы (в сосочковом и сетчатом слое).

Наибольшее значение в барьерной функции кожи придаётся верхней части рогового слоя эпидермиса, пропитанной кожным салом, выделяющимся из сальных желез, и нижней очень плотной части рогового слоя [Кожа., 1982]. Эпидермис можно рассматривать как липопротеиновый барьер, через который

быстро проходят газы и растворимые в липидах органические вещества.

Эпидермальная проницаемость — это первая фаза проникновения яда, второй фазой является эвакуация химических соединений из дермы в кровь.

То есть потенциальную опасность представляют вещества, обладающие не только липоидорастворимостью, но и значительной растворимостью в воде (крови). Возможен и другой путь к сосудистой системе: через железистый аппарат кожи, а именно через сальные и потовые железы.

В придатках кожи ОХВ могут задерживаться длительное время [В. А. Кондрашов, 2014]. Так, например, доказано, что через 3 часа после нанесения на кожу ФОВ (зарин, зоман) в сальных железах обнаруживалось еще значительное количество (до 30% от нанесенной дозы) данных ОВ.

Механические повреждения кожи (ссадины, царапины, раны и пр.), термические и химические ожоги усиливают проникновение токсичных веществ в организм. Раневые поверхности могут служить входными воротами для ОВ при непосредственном поражении осколками химического снаряда, загрязнении землей; с повязок, зараженных ОВ; при попадании капельножидких или аэрозольных ОВ в рану.

Следующим этапом после преодоления внешнего барьера и всасывания токсичного вещества в крови является его распределение в организме.

Различные токсичные вещества и их метаболиты транспортируются в различных формах. Для многих чужеродных соединений характерна связь с белками плазмы, преимущественно с альбуминами, которые обладают способностью образовывать с металлами комплексы.

Для некоторых металлов имеет значение транспорт с клетками крови. Например, 90% мышьяка и свинца циркулируют в эритроцитах.

Токсичные вещества — неэлектролиты частично растворяются в жидкой части крови, а частично проникают в эритроциты, где сорбируются.

Таким образом, белки крови, способные связываться с токсичным веществом, помимо транспортной функции выполняют роль своеобразного барьера, препятствующего до определенной степени непосредственному контакту токсичного вещества с клеткой-мишенью.

Одним из основных токсикологических показателей является объем распределения, т.е. характеристика пространства, в котором распределяется данное токсичное вещество.

Существует 3 главных сектора распределения чужеродных веществ:

- внеклеточная жидкость (14 л для человека с массой тела 70 кг);
- внутриклеточная жидкость (28 л);
- жировая ткань.

Объем распределения зависит от трех основных физико-химических

свойств данного вещества: водорастворимости, жирорастворимости и способности к диссоциации (ионообразованию). Водорастворимые соединения способны распространяться во всем водном секторе организма (около 42 л), жирорастворимые вещества накапливаются (депонируются) преимущественно в липидах.

Основным препятствием для распределения водорастворимых веществ являются мембраны клеток. Именно процесс диффузии через этот барьер будет определять накопление веществ во внутриклеточном объеме, т.е. переход от распределения в 14 л воды (внеклеточная жидкость) к распределению в 42 л.

Жирорастворимые вещества накапливаются преимущественно в липидах.

Важным элементом распределения некоторых ксенобиотиков в организме является их депонирование. Депонирование — это накопление и длительное сохранение химического вещества в относительно высокой концентрации в одном или нескольких органах (или тканях).

В основе депонирования лежат два явления:

— высокое физико-химическое сродство ксенобиотика к неким компонентам биосистемы (химическое взаимодействие с элементами биосистемы или избирательное накопление липофильных веществ в жировой ткани);

— кумуляция (благодаря избирательному, активному захвату токсиканта тканями или клетками органа).

Ряд токсикантов депонируется в тканях настолько прочно, что выведение их из организма практически невозможно (например, период полуэлиминации кадмия из организма человека составляет более 20 лет).

Депонирование химических соединений может и не сопровождаться повреждением биологически значимых молекул-мишеней (токсический процесс не формируется).

Основные взаимосвязи путей поступления, распределения ксенобиотиков в тканях и органах и их выведения из организма представлены на рис. 1.2.

Очищение организма от чужеродных веществ включает различные виды детоксикации, которые суммарно предопределяют так называемый «тотальный клиренс».

Основные процессы биохимической адаптации организма к ксенобиотикам осуществляются системой биотрансформации (окисление, конъюгация, выведение) и неразрывно связанным с ними энергообеспечением детоксицирующих процессов (Г. И. Сидорин, 1991; Г. И. Сидорин и др., 2004).

Детоксикация токсических веществ является одним из ведущих механизмов поддержания химического гомеостаза [С. Н. Голиков и др., 1986].

Исходя из современных сведений, система детоксикации представляет

сложный комплекс биохимических и биофизических реакций, обеспечиваемых функциональным взаимодействием барьерных структур, специальных ферментов, иммунной, антиоксидантной и выделительных систем, с целью повышения функционирования организма в целом.

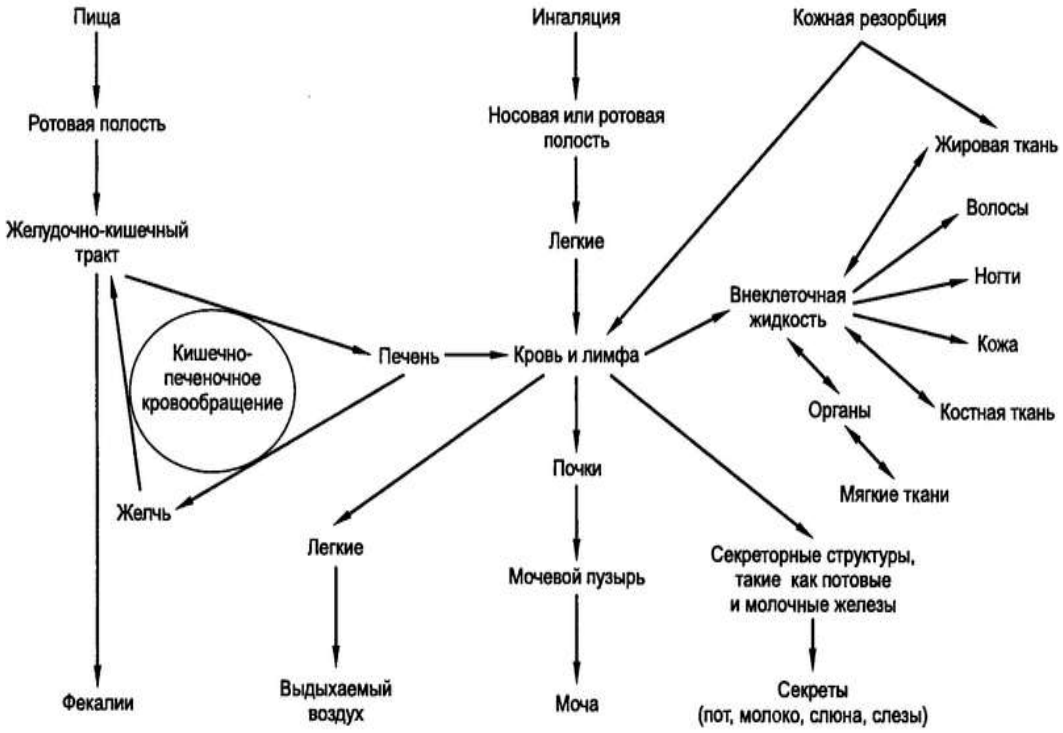


Рис. 1.2 Взаимосвязь распределения ксенобиотиков в тканях и органах, их выведение из организма при основных путях поступления [Токсикокинетика ксенобиотиков [Электронный ресурс].

Систематизацию процессов детоксикации следует проводить исходя из физико-химических свойств (молекулярной массы, водо- и жирорастворимости, ионизации и др.) ксенобиотиков, путей и последовательности стадий детоксикации.

Защитные системы по назначению подразделяют на:

— системы ограничения токсического воздействия ксенобиотиков (барьеры, тканевые депо);

— системы, служащие для устранения токсического воздействия ксенобиотиков (транспортная, ферментная);

— системы экскреции ксенобиотиков и их метаболитов из организма.

Основными способами очищения организма от чужеродных агентов являются внешние барьеры на пути их поступления в организм,

гистогематические и другие внутренние барьеры, ферментные системы биотрансформации ксенобиотиков, особые транспортные механизмы их поступления к органам-мишеням, тканевые депо, где накапливаются некоторые ксенобиотики, органы выведения из организма.

Принято выделять три фазы детоксикации: 1-я и 2-я фазы биотрансформации и 3-я фаза (выведение из организма ксенобиотиков и продуктов их метаболизма, осуществляемое через легкие, кожу, почки, кишечник).

Биотрансформация ксенобиотиков в комплексе с системой антиоксидантной защиты, объединяющей антирадикальные и антиперекисные механизмы, рассматриваются как универсальная биохимическая система естественной детоксикации [С. Н. Голиков и др., 1986; Ю. И. Черняк, 2005].

Эти процессы могут сопровождаться активацией клеточного иммунитета, образованием антител к белковым комплексам с ксенобиотиками (гаптенами — генетически чужеродными агентами), антиканцерогенными и другими механизмами иммунной защиты при химическом воздействии.

При функционировании детоксикационных систем возможно образование более реакционноспособных метаболитов по сравнению с исходными соединениями, а также образование активных форм кислорода. В результате могут развиваться мутации ДНК, окислительный стресс, являющиеся основной причиной повреждения внутриклеточных мембран, инактивации многих ферментов и других патологических процессов.

Рассогласованность систем детоксикации является одним из общих механизмов токсичности, приводящим к нарушению гомеостаза.

На современном этапе развития профилактической медицины все более пристальное внимание уделяется изучению наследственной индивидуальной предрасположенности к развитию патологии, в том числе обусловленной воздействием ОХВ на различные системы детоксикации. Успехи данных исследований связаны с расшифровкой генома человека, изучением природы и проявлений полиморфизма генов и других генетических структур.

# 2. СИСТЕМЫ БАРЬЕРОВ, ПРЕПЯТСТВУЮЩИХ ПРОНИКНОВЕНИЮ КСЕНОБИОТИКОВ В ОРГАНИЗМ

При поступлении ксенобиотиков в организм они подвергаются воздействию первичной защиты барьеров, препятствующих их проникновению во внутреннюю среду организма [Барьерные функции [Электронный ресурс]; В. А. Кондрашов, 2014].

Условно различают внешние и внутренние барьеры. К внешним барьерам относят органы дыхания, пищеварения, кожу, слизистые оболочки рта, носа, глаз, половых органов и почки. Внутренними являются кровь и ее компоненты, лимфа, гистогематические и специализированные барьеры.

## 2.1 Внешние барьеры от проникновения ксенобиотиков в организм

В качестве начальной стадии детоксикации — ее первого защитного барьера — следует выделить органы, через которые поступают чужеродные соединения в организм: органы дыхания, ЖКТ, кожа, слизистые глаз. Основным вторым защитным барьером принято считать печень .

Внешние барьеры образованы одно- или многослойными пластами клеток. Как известно, каждая клетка окружена белково-липидной мембраной, почти непроницаемой для растворенных в воде веществ. Поэтому трудно или невозможно водорастворимым веществам преодолеть один или несколько слоев клеток.

Ведущим фактором проникновения химических веществ во внутренние среды организма через внешний барьер является хорошая их растворимость в липидах (жирах), определяющая характер распределения между липидной и водной фазами в месте всасывания.

В органах дыхания, помимо обмена газов, происходит очистка вдыхаемого воздуха от пыли и мелкодисперсных вредных веществ.

Большая поверхность легочных альвеол обеспечивает интенсивное всасывание и быстрый эффект действия ядовитых паров и газов, присутствующих во вдыхаемом воздухе. Скорость перехода газа (пара) из вдыхаемого воздуха в кровь тем выше, чем больше градиент концентрации в системе воздух — кровь.

Содержание газа в оттекающей от легких крови пропорционально его парциальному давлению во вдыхаемом воздухе.

Усиление легочной вентиляции увеличивает диффузию газа (пара) в направлении концентрационного градиента или градиента парциального давления (из организма — в организм, в зависимости от указанных выше условий). Захват газов кровью зависит от их растворимости в крови.

При прочих равных условиях, состояние равновесия в системе альвеолярный воздух — кровь, устанавливается тем быстрее, чем менее растворим токсикант в крови. Скорость резорбции газообразного (парообразного) токсиканта увеличивается с увеличением скорости кровотока в легочной ткани.

В процессе самоочищения дыхательных путей твердые частицы вместе с мокротой удаляются из организма. Аэрозоли представляют собой фазовые смеси, состоящие из мелких частиц жидкости (туман) или твердого вещества (дымы) в воздухе.

Резорбция в дыхательной системе аэрозоля является функцией количества вещества, адсорбировавшегося на поверхности легких и дыхательных путей, она зависит от концентрации аэрозоля, размера его частиц, частоты и глубины дыхания. Адсорбция крупных частиц (около 5 мкм) происходит преимущественно в верхних дыхательных путях, мелких частиц (около 1 мкм) — в глубоких отделах дыхательных путей и альвеолах.

При поступлении водорастворимых токсичных аэрозолей их резорбция может происходить по всей поверхности дыхательных путей, причем заметная часть со слюной попадает в желудок. Частицы аэрозоля, адсорбировавшиеся на поверхности дыхательных путей, могут захватываться макрофагами и с ними поступать в кровоток.

В первую очередь легкие становятся «входными воротами» для тех ОХВ, которые хорошо растворимы в жирах. Диффундируя через альвеолярно-капиллярную мембрану толщиною около 0,8 мкм, отделяющую воздушную среду от кровяного русла, молекулы ядов наикратчайшим путем проникают в малый круг кровообращения и затем, минуя печень, через сердце достигают кровеносных сосудов большого круга. Лёгкие выполняют свою детоксикационную функцию, выступая в роли биологического фильтра.

Наличие в легких комплекса микросомальных оксидаз позволяет окислять многие гидрофобные вещества среднемолекулярной массы, что подтверждает определение большего их количества в венозной крови по сравнению с артериальной.

Некоторые вещества, действуя в форме газов и аэрозолей, обладая высокой реакционной способностью, взаимодействуют непосредственно с легочной тканью, вызывая местное действие (хлор, фосген и т.д.). Такие вещества резорбции практически не подвергаются; закономерности, ха-

рактеризующие этот процесс, на них не распространяются.

Кожный покров является особой мультифункциональной системой, выполняющей высокоспециализированные функции для предохранения организма от различных воздействий внешней среды, в том числе химических загрязнителей [В. А. Кондрашов, 2014] — терморегуляции и обмена веществ, восприятия и реакции на действие различных экзогенных и эндогенных раздражителей, обеспечения иммунитета, биотрансформации ксенобиотиков. Выполняет секреторную, экскреторную, выделительную, резорбционную и дыхательную функции, а также депонирование в виде жира в подкожной клетчатке.

Основными отделами резорбции и детоксикации при кожном пути поступления вредных химических веществ в организм являются эпидермис, а также волосяные фолликулы, сальные железы, потовые железы.

При дермальном пути поступления степень поглощения вещества зависит от дозы, концентрации, площади поражения, целостности и состояния кожи, гидрофобности вещества, присутствия растворителей и эмульгаторов, которые могут способствовать всасыванию.

На скорость резорбции веществ через кожу влияют агрегатное состояние, дисперсность (размер частиц аэрозолей), интенсивность кровотока в кожных покровах. Механические повреждения, мацерация кожи, раздражение, сопровождающиеся усилением кровотока, ускоряют резорбцию токсикантов.

Степень резорбции вредных веществ в организм через кожу на различных её участках также зависит от состояния водно-липидной пленки, буферной способности кожной поверхности, толщины рогового слоя, от наличия волосяных фолликулов, сальных и потовых желез.

При резорбции через кожные покровы концентрация вещества в крови нарастает плавно, максимальный подъем определяется спустя несколько дней.

Для высоколипофильных веществ, не проходящих стадию первичных метаболических превращений в печени, всасывание через кожу очень значительное, и их токсичность может быть такой же, как и при пероральном поступлении.

При пероральном поступлении токсичные вещества проникают в кровь через слизистые оболочки полости рта, желудка и кишечника. Большинство из них всасывается в эпителиальные клетки пищеварительного тракта и далее в кровь по механизму простой диффузии. Существенную роль играет также степень диссоциации веществ.

Слизистая желудочно-кишечного тракта в силу особенностей строения приспособлена для быстрой резорбции веществ.

Поскольку сосудистая сеть желудочно-кишечного тракта развита хорошо, резорбция здесь не лимитирована фактором кровоснабжения. Закономерности резорбции аналогичны во всех отделах желудочно-кишечного тракта.

Имеющиеся особенности всасывания в различных отделах ЖКТ определяются различиями pH содержимого отделов, неодинаковой площадью всасывающей поверхности.

Слабые кислоты в ЖКТ в основном находятся в недиссоциированном состоянии, потому относительно легко всасываются. Слабые основания в желудочном соке находятся в форме ионов, потому не всасываются. В кишечнике pH щелочная, поэтому здесь преобладает ионизированная форма кислот и неионизированная форма слабых оснований.

Количество и качество пищи, принятой вместе (до, после) с токсикантом, могут существенно повлиять на скорость его резорбции.

Жиронерастворимые чужеродные вещества проникают через клеточные мембраны слизистых оболочек желудка и кишечника по порам или пространствам между мембранами.

Током крови из желудочно-кишечного тракта токсичные вещества доставляются в печень — орган, выполняющий барьерную функцию по отношению к подавляющему большинству чужеродных соединений.

ЖКТ несёт ряд детоксикационных функций, обеспечивает регуляцию липидного обмена и выведение поступающих с желчью высокополярных соединений и различных конъюгатов, которые способны гидролизоваться под влиянием ферментов пищеварительного тракта и микрофлоры кишечника. Некоторые из них могут реабсорбироваться в кровь и снова поступать в печень для следующего круга конъюгации и выделения (энтерогепатическая циркуляция).

Обеспечение детоксикационной функции кишечника значительно затруднено при пероральных отравлениях, когда в нем депонируются различные токсиканты, в том числе и эндогенные, которые резорбируются по градиенту концентрации и становятся основным источником токсикоза.

## 2.2 Кровь и другие внутренние барьеры от проникновения ксенобиотиков в организм

К внутренним защитным приспособлениям относятся кровь, лимфа, соединительная ткань, различные образования лимфатической ткани, гистогематический и другие барьеры [Барьерные функции [Электронный ресурс]; Г. Н. Кассиль, 1983; Лимфа [Электронный ресурс].

Преодолев внешние барьеры, ксенобиотики поступают в кровь. Следующий

этап очищения организма осуществляется в крови. С одной стороны, это — транспортировка ксенобиотиков к органам и тканям организма, с другой — их связывание. Кровь может осуществлять транспорт веществ в свободной и связанной формах.

Белки и клетки крови осуществляют временное депонирование (адсорбцию) многих токсикантов, транспортировку к печени и в другие тканевые депо (жировая, костная ткань и др.) для избирательного накапливания, тем самым защищая рецепторы токсичности от их воздействия.

Кровь и лимфа представляют собой вторую линию защиты при внедрении патогенов.

В крови токсикант может вступать во взаимодействие с форменными элементами крови и прежде всего с эритроцитами. При этом возможно связывание вещества клеточной мембраной эритроцитов (связывание с белками мембраны, растворение в липидах клеточной мембраны); проникновение соединения внутрь клетки, связывание с её содержимым, взаимодействие с гемоглобином. Фиксация веществ на поверхности эритроцитов отчасти обусловлена наличием отрицательного заряда на внешней поверхности мембраны. Он формируется многочисленными связанными с мембраной молекулами мукополисахаридов. Положительно заряженные вещества, особенно содержащие четвертичный атом азота в молекуле (алкалоиды и т.д.), активно взаимодействуют с поверхностью эритроцитов.

Прохождение ксенобиотиками клеточной мембраны эритроцитов подчиняется общим закономерностям. Из-за высокой концентрации гемоглобина в эритроците вся внутриклеточная вода связана с этим белком и не принимает участия в растворении ксенобиотиков, поэтому возможность эритроцитов фиксировать гидрофильные молекулы внутри клетки ограничена.

Способностью связывать ксенобиотики обладают альбумины, гликопротеиды, липопротеиды (липопротеины), специфические транспортные белки (церулоплазмин, металлотионеины и т.д.) плазмы крови [Биохимия, 2009; Взаимодействие с альбумином [Электронный ресурс].

Связывание ксенобиотиков белками осуществляется путем образования между ними слабых гидрофобных, водородных и ионных связей. Комплексы химических соединений с белками приобретают характеристики распределения, свойственные белкам. Сильные связи белок — ксенобиотик затрудняют отток вещества в ткани.

Связь ксенобиотиков с белками, спонтанно протекающая реакция, которая не требует затрат энергии и зависит от их строения [А. Н. Маянский, Д. Н. Маянский, 1989]. В основе этого процесса, как правило, лежит установление

гидрофобных связей между участниками взаимодействия.

С увеличением молекулярной массы ксенобиотика, длины алкильных радикалов в молекуле вероятность его связывания белками возрастает.

Включение в молекулу галогенов делает связь вещество-белок более прочной. Влияние различных заместителей возрастает в ряду: Cl< Br< J. Наличие N-ацильных радикалов в молекуле упрочивает связь. Галогенированные углеводороды наиболее прочно связываются с липопротеинами, также прочно и с альбуминами.

Липофильные ФОС связываются и с альбуминами, и с липопротеинами.

Ключевую роль в связывании металлов с белками играют низкомолекулярные, содержащие SH-группы металлсвязывающие белки — металлотионеины, усиленно синтезируемые в ответ на поступление целого ряда металлов (Cd, Zn и т.д.) в организм.

При попадании в кровь нескольких БАВ, конкурирующих за один и тот же участок связывания на белках плазмы крови, возможна существенная модификация их токсичности и продолжительности действия.

Связывание веществ белками крови имеет определенные токсикокинетические и токсикодинамические последствия [С. А. Куценко, 2004]. Простые вещества, связанные с белками крови, приобретают кинетические характеристики этих белков. Содержание таких веществ в тканях, как правило, невелико, объем распределения мал (плазма крови). Напротив, у веществ, плохо связывающихся с белками, объемы распределения и содержание в тканях высокие. Если распределение вещества в организме не подчиняется законам диффузии и осуществляется путем активной его экстракции из крови тканями. Например, в печени или почках связывание белками может даже способствовать активному захвату такого ксенобиотика (при длительном поступлении высоких концентраций кадмия происходит захват почками образующегося в печени комплекса кадмий-металлотионеины, что приводит к развитию нефропатии).

Клиренс (скорость «очищения» плазмы) определяется интенсивностью кровотока и скоростью экстракции вещества органами выведения. Клиренс в значительной степени зависит от интенсивности кровотока. Соотношение между свободной и связанной фракциями токсиканта в крови играет подчиненную роль. Одними из наиболее вероятных переносчиков для ксенобиотиков различного типа являются липопротеины сыворотки крови.

Характер распределения ксенобиотиков между фракциями ЛП, а также связывание их с альбумином сыворотки крови, неспецифическая сорбция на мембранах эритроцитов во многом зависят от липофильности химического

соединения: чем оно липофильнее, тем в большей степени связывается с фракциями ЛП, с поверхностью эритроцитов и в меньшей степени — с альбумином.

Среди транспортных систем крови важная роль в немикросомальных процессах детоксикации принадлежит белку плазмы крови — сывороточному альбумину, который связывает и транспортирует ксенобиотики, метаболиты экзогенных и эндогенных субстратов, в том числе продукты 1 и 2 фаз детоксикации [Н. В. Гончаров и др., 2015].

Сывороточный альбумин — белок, содержащийся в значительных количествах в плазме, играет главную роль в связывании и транспорте кровью и межклеточной жидкостью низкомолекулярных метаболитов, продуктов жизнедеятельности, вредных веществ, в том числе органических соединений и некоторых неорганических ионов. Альбумины вырабатываются в печени.

Альбумин обладает уникальной способностью связывать значительное число лигандов различной химической структуры, в том числе различные гидрофобные вещества. Его доля составляет около 60% от суммарного количества белков крови. Выделяют 6 основных центров связывания ксенобиотиков на молекуле альбумина. Различные центры отличаются друг от друга неодинаковым сродством к веществам с различными значениями константы рКа, механизмами взаимодействия с ксенобиотиками, различной кривой насыщения связи, числом на молекуле белка, величинами константы диссоциации комплекса белок-ксенобиотик.

Связывание с активными центрами альбумина носит неспецифический характер и осуществляется за счет различных типов взаимодействий: гидрофобных, дипольных, электростатических, посредством Ван-дер-Ваальсовых сил, водородных связей и др. [Взаимодействие с альбумином [Электронный ресурс]. Образующиеся комплексы являются непрочными, легкодиссоциирующими; величина энергии связи не превышает 8-10 ккал/ моль.

В молекуле альбумина содержится большое количество реакционноспособных участков (тиоловые, имидазольные, карбоксильные группы, аминогруппы лизина), благодаря чему он легко вступает во взаимодействия с различными ионами, продуктами обмена и различными ксенобиотиками, преимущественно слабокислого и нейтрального характера.

Связывание происходит по двум первичным и нескольким вторичным сайтам, точное количество которых неизвестно. Три гомологичных домена (I, II, III), состоящие из двух субдоменов (A, B) образуют трехмерную структуру

альбумина, которая достаточно лабильна, так что при взаимодействии с молекулой альбумина разных веществ имеют место такие эффекты, как кооперативность и аллостерическая модуляция, обычно присущие мультимерным белкам.

Жирные кислоты — основной лиганд альбумина — изменяют полярность и увеличивают объем одного из главных сайтов связывания лекарственных препаратов.

Большинство попавших в кровь веществ фиксируются на альбуминах, не зависимо от того являются они нейтральными, кислыми или основными соединениями.

Связывая лекарства и токсические вещества, альбумин в значительной степени определяет их фармако- и токсикокинетику, транспортируя к тканям-мишеням или местам их биотрансформации. Так, при введении собакам метилпаратиона в дозе 20 мг/ кг (в/в и п/о), и паратиона в дозах 5 и 10 мг/кг (в/в и п/о) установлено, что свыше 90% этих ФОП связываются с альбумином и другими белками плазмы крови в широком диапазоне концентраций (0,2-30 мкг/мл) [R. A. Braeckman et al., 1983].

Альбумин является не только пассивным, но и активным участником фармако- или токсикокинетического процесса. Отмечена эстеразная или псевдоэстеразная активность альбумина по отношению к нафтилацетату и фенилацетату, эфирам жирных кислот, аспирину, фосфорорганическим пестицидам и фосфорорганическим отравляющим и другим веществам.

Ацетилирование — характерный пример псевдоэстеразной активности (реакция псевдопервого порядка), когда убыль субстрата обусловлена не его гидролизом, а образованием ковалентных связей по многим сайтам молекулы альбумина.

В токсикологии наибольший интерес представляет проблема эстеразной активности альбумина по отношению к высокотоксичным химическим соединениям, например к ФОВ (зарин, зоман, VX). Получены данные о том, что (псевдо)эстеразная активность альбумина может играть важную роль в детоксикации зомана. ФОС или ФОВ образуют аддукты с альбумином по Tyr-411 и Tyr-150 [Н. В. Гончаров и др., 2015].

Альбумин также является важным компонентом антиокислительной и антитоксической активности плазмы крови [А. Д. Надеев и др., 2013].

Из фракции сывороточных белков крови – глобулинов (альфа-глобулины, бета-глобулины и гамма-глобулины), которые вырабатываются печенью и иммунной системой, следует выделить фракцию гамма-глобулинов.

Содержащиеся в них антитела (IgA, IgM, IgG, IgE, IgD), обеспечивают гуморальный иммунитет организма. Гамма-глобулины также включают белковые факторы свертывания крови, агглютинины, участвующие в формировании групповой принадлежности крови, и криоглобулины [Гамма-глобулин [Электронный ресурс]; Иммунологические аспекты [Электронный ресурс].

Лимфа является производной крови и ее роль, как и крови, направлена на поддержание относительного постоянства внутренней среды. В наибольшей степени защитная роль лимфы связана с транспортом иммунокомпетентных клеток. В иммунных реакциях обезвреживания ксенобиотиков лимфа участвует посредством транспорта из лимфоидных органов макрофагов, лимфоцитов и антител. С помощью лимфы осуществляется возврат белков из тканевых пространств в кровь, перераспределение воды в организме, молокообразование, пищеварение и обмен веществ. Она играет решающую роль во всасывании и транспорте жиров и жирорастворимых веществ в кишечнике. Функция лимфы состоит и в удалении из межклеточного пространства веществ, которые не реабсорбируются в кровеносных капиллярах. Способствуя удалению жидкости из тканевого пространства, лимфатическая система выполняет дренажную функцию.

В систему внутренних барьеров входят гистогематические, а также гематоэнцефалический и другие специализированные барьеры — биологические структуры, находящиеся на границе кровеносного русла, с одной стороны, и жидкими средами организма — с другой, а также внутриклеточные барьеры [Г. Н. Кассиль, 1983; Клиническая фармакокинетика..., 2009; О. В. Макарова, 2004].

Значение гистогематического и специализированных барьеров заключается в задержке перехода того или иного чужеродного вещества из крови в ткани (защитная функция) и в регуляции состава и свойств непосредственно питательной среды органа, т. е. создание наилучших условий для жизнедеятельности органа (регуляторная функция), что очень важно для всего организма и его отдельных частей. Основную барьерную функцию осуществляют стенки кровеносных капилляров.

Термин «гистогематический барьер» ввела Л. С. Штерн (1929 г.). [Физиология и патология, 1968]. Гистогематические барьеры выполняют регулирующие функции обмена между общей внутренней средой организма — кровью и непосредственно питательной средой органов и тканей, а также защитную функцию, препятствуя переходу из крови в ткани и

из тканей в кровь вредных и чужеродных веществ.

Гистогематический барьер имеет различные названия: тканевой, гематопаренхиматозный, сосудисто-тканевой и т.д. Особенностью гистогематического барьера является его избирательная (селективная) проницаемость, т.е. способность пропускать одни вещества и задерживать другие. Структурными элементами гистогематических барьеров являются эндотелий кровеносных сосудов, базальная мембрана, в состав которой входит большое количество нейтральных мукополисахаридов, основное аморфное вещество, волокна и т.д. Структура гистогематических барьеров определяется в значительной степени особенностями строения органа и варьирует в зависимости от морфологических и физиологических особенностей органа и ткани. Основную барьерную функцию осуществляют стенки кровеносных капилляров.

Защитные функции выполняют соединительная ткань, образования лимфатической системы, некоторые специальные клетки органов и тканей, а также оболочки клеток и внутриклеточные барьеры, в задачу которых входит защита важных элементов клетки.

К гистогематическим барьерам относят барьеры между кровью и цереброспинальной жидкостью, лимфой, плевральной и синовиальной жидкостями: так называемые гематоликворный, гематолимфатический, гематоплевральный, гематосиновиальный барьеры.

В основе барьерных функций лежат процессы диализа, ультрафильтрации, осмоса, а также изменение электрических свойств, растворимости в липидах, тканевого сродства или метаболической активности клеточных элементов.

Функциональное состояние гистогематического барьера определяется соотношением концентраций того или иного вещества в органе и омывающей его крови. Эта величина получила название коэффициента проницаемости, или коэффициента распределения.

К специализированным барьерам относят гематоэнцефалический барьер (между кровью и головным мозгом — центральной нервной системой), гематоофтальмический барьер (между кровью и внутриглазной жидкостью), гематолабиринтный барьер (между кровью и эндолимфой лабиринта), барьеры между кровью и половыми железами (гематотестикулярный, гематофолликулярный, гематоовариальный), а также гематотиреоидный и гематокохлеарный барьеры.

Специализированными барьерами вышеперечисленные ткани ограждены от аутоагрессивных клеток иммунной системы. В этих органах расположено

небольшое число сосудов, уходящих вглубь этих органов.

Барьерными свойствами, защищающими развивающийся плод, обладает и плацента.

Гематоэнцефалический барьер формируется благодаря уникальным особенностям анатомических структур головного мозга.

Во-первых, эндотелий капиллярного русла головного мозга отличается от эндотелия других органов чрезвычайно тесным контактом клеток друг с другом. Эффективный радиус пор капилляров мозга значительно меньше, чем в других тканях.

Крупные молекулы не в состоянии проникать через эндотелиальный барьер. Водорастворимые и заряженные молекулы могут проходить непосредственно через биомембраны и цитоплазму эндотелиальных клеток только в том случае, если имеют малые размеры (CN). Лишь при некоторых патологических состояниях (гипоксия) в ЦНС в эндотелии образуются пиноцитарные вакуоли, при этом возрастает проницаемость гематоэнцефалического барьера, увеличивается уязвимость мозга для действия токсикантов.

Во-вторых, капилляры мозга плотно окутаны отростками астроцитарной глии, что препятствует проникновению гидрофильных ксенобиотиков из крови в ткань мозга и их взаимодействию с другими клеточными элементами.

В некоторых областях мозга (срединное возвышение гипоталамуса, медиальная преоптическая область, область четвертого желудочка мозга) астроцитарная оболочка развита сравнительно слабо. В этих регионах в ограниченном количестве возможно проникновение водорастворимых и даже заряженных молекул токсикантов в ЦНС.

Последней структурой, вносящей вклад в формирование ГЭБ, является базальная мембрана, залегающая между эндотелиальными клетками капилляров и отростками астроцитов. Эта мембрана имеет упорядоченную фибриллярную макропротеидную структуру, обеспечивающую избирательное проникновение в мозг ряда важных для обеспечения его жизнедеятельности молекул (кислород, глюкоза и др.).

Жирорастворимые неэлектролиты, например хлорированные углеводороды, спирты, ароматические углеводороды, легко проникают через ГЭБ. Напротив, чужеродные органические электролиты, например азотсодержащие основания (алкалоиды, миорелаксанты и т.д.) не проникают в ЦНС.

Проницаемость ГЭБ в значительной степени изменяется с возрастом и при различных патологических состояниях (воспалительный процесс, ацидоз). У

плода и новорожденных барьер проницаем для токсикантов, не проникающих в мозг взрослого (например, ионы свинца при остром отравлении солями этого металла). Проницаемость ГЭБ можно усилить, вводя в кровь алкоголь, мочевину, нортриптилин и другие соединения.

Особенностью капиллярного русла мозга является наличие хориоидального сплетения, в котором осуществляется образование ликвора, жидкости, заполняющей желудочки мозга.

Кроме гематоэнцефалического, существует также гематоликворный барьер, который ограничивает ЦНС от кровеносного русла. Он образован эпителиальными клетками с плотными контактами, выстилающими сосудистое сплетение желудочков мозга [N. Hettenbach, 2008].

Переход веществ из крови в ликвор определяется проницаемостью стенки капилляра и клеточной мембраны эпителия сплетения (гематоликворный барьер) и в целом затруднен для водорастворимых и заряженных молекул. В свою очередь обмен веществ между ликвором и тканью мозга ограничивается лишь тонким слоем хорошо проницаемой эпендимы. Концентрация веществ в ликворе принимается равной концентрации в межклеточном пространстве. Это допущение в значительной степени справедливо для водорастворимых веществ и в меньшей степени — для жирорастворимых соединений.

Гематоликворный барьер участвует в поддержании гомеостаза мозга. Через него из крови в омывающую мозг спинномозговую жидкость поступают витамины, нуклеотиды и глюкоза.

Однако общий вклад гематоликворного барьера в процессы обмена между мозгом и кровью невелик. Суммарная поверхность гематоликворного барьера сосудистых сплетений желудочков мозга приблизительно в 5000 раз меньше в сравнении с площадью гематоэнцефалического.

Периферический отдел нервной системы аналогично окружен гематоневральным барьером. Также как и в ЦНС, здесь имеются структуры с повышенной проницаемостью для токсикантов. К числу таких структур относятся корешки дорзальных ганглиев и вегетативные (автономные) ганглии.

Различают два типа гематоофтальмического барьера.

Первый регулирует обмен веществ между кровью и внутриглазной жидкостью (камерами глаза). Главную роль здесь играет цилиарное тело, продуцирующее внутриглазную жидкость. Внутриглазная жидкость устремляется из задней камеры глаза в переднюю и покидает глаз через Шлемов канал.

Переход веществ из крови в камеры глаза осуществляется простой диффузией через двухслойный эпителий цилиарного тела и, следовательно, определяется общими свойствами молекул, влияющими на проникновение соединений через биологические барьеры.

Также путем диффузии происходит распределение вещества между камерами глаза, стекловидным телом и другими структурными элементами глаза.

Вторым является гематоретинальный барьер, отделяющий кровь от сетчатки глаза. Гематоретинальный барьер по свойствам близок гематоликворному. Закономерность прохождения через него ксенобиотиков носит общий характер.

Лишь небольшое количество веществ активно транспортируются из крови в сетчатку, не зависимо от их физико-химических свойств.

Если химическое вещество поступает в организм беременной женщины, оно может оказаться опасным не только для будущей матери, но и для плода, а иногда и исключительно для плода. Большинство чужеродных веществ преодолевает плацентарный барьер путем простой диффузии.

Для некоторых субстратов, биорегуляторов и жизненно-необходимых веществ могут существовать механизмы активного транспорта через плаценту. В пользу наличия механизмов активного транспорта говорит тот факт, что в тканях плода содержание не синтезируемого организмом витамина $B_{12}$ в 100 раз выше, чем в организме матери. Достаточно легко через плацентарный барьер проникают иприты, триметиленмеламин, свинец, мышьяк и др.

Большое значение в функции некоторых гистогематических барьеров придается ферментативной активности [Барьерные функции [Электронный ресурс]. Например, в стенках микрососудов мозга и окружающей их соединительнотканной стромы (гематоэнцефалический барьер) обнаружена высокая активность ферментов — холинэстеразы, карбоангидразы, ДОФА-декарбоксилазы и др. Эти ферменты, расщепляя некоторые биологически активные вещества, препятствуют их проникновению в мозг.

Защитные функции выполняют соединительная ткань, лимфатические образования. По современным представлениям, к системе внутренних барьеров относятся внутриклеточные барьеры, которые состоят из трехслойных мембран, входящих в состав различных внутриклеточных образований и клеточной оболочки.

Отдельные чужеродные вещества плохо проникают через барьерные

структуры. К ним относятся образующиеся в организме четвертичные аммониевые основания, сильные электролиты, некоторые антибиотики, а также коллоидные растворы.

Однако растворимые в липидах и быстро диффундирующие через липопротеидные мембраны вещества сравнительно легко попадают в головной мозг, кровь плода через плаценту и т.д. То есть некоторые ксенобиотики могут повреждать клетки, образующие гистогематические барьеры, и те становятся легко проницаемыми.

Лишенные защиты нервные или половые клетки подвергаются токсическому воздействию, вплоть до их гибели. К таким веществам относятся нейротропные соединения, например спирты, наркотические средства, ФОС.

Многие сульфаниламидные препараты хорошо проникают в головной и спинной мозг.

Одной из причин бесплодия у мужчин и женщин является нарушение барьеров, защищающих половые клетки от действия ксенобиотика (гематотестикулярного и гематоовариального барьеров, необходимых соответственно для изоляции сперматоцитов и овоцитов от иммунной системы; гематофолликулярного барьера, создающего оптимальные условия для развития женских половых клеток).

Тканевые депо, сорбируя ксенобиотик, защищают от него внутреннюю среду организма и способствуют сохранению гомеостаза.

Некоторые ксенобиотики накапливаются и длительное время сохраняются в определенных тканях организма. Однако если ксенобиотик задерживается в депо надолго и его концентрация значительно возрастает с течением времени, то его отравляющее действие из хронического переходит в острое.

Способность ксенобиотиков накапливаться в определенных тканях или органах определяется их составом, строением и физико-химическими свойствами.

Неэлектролиты, метаболически относительно инертные и обладающие хорошей липоидорастворимостью, накапливаются во всех органах и тканях. В первой фазе поступления яда в организм определяющим будет кровоснабжение органа, которое лимитирует достижение динамического равновесия кровь — ткань. Однако в дальнейшем основным фактором, влияющим на распределение яда, является сорбционная емкость органа (статическое равновесие).

Для липоидорастворимых веществ наибольшей емкостью обладает жировая ткань и органы, богатые липидами (костный мозг и др.).

Для многих липоидорастворимых веществ жировая ткань является основным депо, удерживающим яд, как в больших количествах, так и в

течение более длительного времени, чем другие ткани и органы.

Длительность сохранения ядов в жировом депо определяется их физико-химическими свойствами.

Для распределения ионов металлов в организме, в отличие от органических неэлектролитов, не выявлено общих закономерностей, связывающих физико-химические свойства последних с их распределением. Ионы металлов имеют тенденцию накапливаться больше всего в тех же тканях и органах, где они обнаруживаются в больших количествах в норме как микроэлементы.

Кроме того, избирательное депонирование ионов металлов обнаруживается в тканях, где имеются полярные группы, способные отдавать электроны и образовывать координационные связи с атомами металлов, и в органах с интенсивным обменом веществ.

Например, щитовидная железа поглощает марганец, кобальт, никель, хром, мышьяк, рений; поджелудочная железа — марганец, кобальт, хром, цинк, никель; гипофиз — марганец, свинец, молибден; семенники поглощают кадмий и цинк.

Депонирование ионов большинства переходных металлов в организме обусловлено преимущественно их способностью образовывать различные органические комплексы с белками и аминокислотами.

Ионы таких металлов, как цинк, кадмий, кобальт, никель, таллий, медь, олово, рутений, хром, ртуть, распределяются в организме равномерно. Они обнаруживаются при интоксикации во всех тканях. Наблюдается некоторая избирательность их накопления.

Избирательное депонирование в любой форме ртути и кадмия происходит в почках, что связывают со специфическим сродством этих металлов к SH-группе ткани почек.

В форме грубодисперсных коллоидов некоторые малорастворимые редкоземельные металлы избирательно задерживаются в таких органах, как печень, селезенка, костный мозг, богатых ретикулоэндотелиальными клетками.

В костной ткани избирательно накапливаются ионы тех металлов, неорганические соединения которых хорошо диссоциируют в организме, а также ионы металлов, образующих прочные связи с фосфором и кальцием.

К таким металлам относятся свинец, бериллий, барий, стронций, галлий, иттрий, цирконий, уран, торий.

Кроме того, свинец при длительном его вдыхании в максимальных количествах обнаруживается также в печени, почках, селезенке и сердечной мышце.

Выделение ионов металлов из организма подчиняется экспоненциальному

закону. После прекращения поступления содержание их в организме быстро нормализуется. Во многих случаях выделение протекает неравномерно, многофазно, причем каждая фаза имеет свою экспоненциальную кривую.

Например, большая часть вдыхаемых паров ртути удаляется из организма почками в течение нескольких часов, но удаление ее остаточных количеств затягивается на несколько дней; выделение остаточных количеств урана затягивается до 900 ч, а выделение цинка длится более 150 суток.

К внутренним защитным структурам также относятся транспортные системы, выводящие ксенобиотики из клеток. Эти системы обнаружены во многих органах млекопитающих, в том числе и у человека [Н. Н. Каркищенко, 2007; В. Г. Кукес и др., 2007]. Наиболее мощные из них находятся в клетках печени и почечных канальцев.

Механизм вывода ксенобиотиков транспортными системами заключается в том, что транспортные клетки образуют слой, одна сторона которого граничит с внутренней средой, а другая — с внешней; липидная мембрана этого слоя не пропускает водорастворимые ксенобиотики во внутреннюю среду клетки. В мембране транспортных клеток имеется белок-переносчик, который идентифицирует вредное вещество, образует с ним транспортный комплекс и проводит его через липидный слой из внутренней среды во внешнюю.

Активный транспорт веществ через биологические мембраны проходит с большей скоростью, чем диффузия; осуществляется специальными транспортными белками и следует закономерностям ферментативных реакций (табл. 2.1). Активный транспорт обеспечивает ток малых молекул и ионов против градиента их концентраций.

Для обеспечения процессов нужна энергия, запасенная в форме макроэргических соединений (например, АТФ), транспорт через биологические мембраны токсикантов, имеющих очень большую массу (белковых токсинов), может осуществляться с помощью цитозов (пиноцитоза, рецептор-связанного эндоцитоза и т.д.). Цитозы — процессы, неразрывно связанные с клеточным метаболизмом (табл. 2.2).

Основной функцией P-gp (белка множественной лекарственной устойчивости) является энергозависимый трансмембранный транспорт субстратов.

К субстратам P-gp относятся билирубин, противоопухолевые лекарства, сердечные гликозиды, иммуносупрессоры, глюкокортикоиды, ингибиторы протеаз 1 типа вируса иммунодефицита человека и т.д.

Располагаясь в гепатоцитах, P-gp способствует выведению ксенобиотиков в желчь. В кишечнике он выполняет роль своеобразного насоса, выкачивающего ксенобиотик (ЛС и др.) из клетки в просвет кишечника. P-gp

эпителия почечных канальцев участвует в активной секреции ксенобиотиков в мочу.

Таблица 2.1 — Признаки специфического транспорта ксенобиотиков [В. Г. Кукес, 2004]

| № п/п | Признаки активного транспорта |
|---|---|
| 1 | Связывание ксенобиотика с наружной поверхностью мембраны и молекулой-носителем |
| 2 | Транслокация связавшегося вещества через мембрану специальным носителем |
| 3 | Высвобождение вещества из связи с носителем внутри клетки |
| 4 | Субстратная специфичность взаимодействия вещества с носителем |
| 5 | Кинетика процесса, описываемая гиперболой (наличие максимальной скорости процесса − Vmax, и константы процесса − Km) |
| 6 | Наличие веществ, избирательно блокирующих процесс |
| 7 | Более высокая скорость процесса в сравнении с процессом диффузии |

Таблица 2.2 — Транспорт ксенобиотиков путем цитозов [В. Г. Кукес, 2004]

| № п/п | Виды транспорта путем цитозов |
|---|---|
| 1 | Эндоцитозы (захват вещества клеткой):<br>- фагоцитоз: захват корпускулярных частиц<br>- пиноцитоз: захват капель жидкости и растворенных в ней молекул<br>- рецептор-обусловленный эндоцитоз: связывание макромолекул на специфических рецепторах клеточной мембраны с последующим образованием шероховатых везикул |
| 2 | Экзоцитозы: выделение веществ из клетки:<br>- гранулокринная секреция: выделение везикул, содержащих клеточное вещество<br>- отпочковывание: выделение части цитоплазмы содержащихся в ней веществ путем краевого отделения части клетки |
| 3 | Трансцитоз (транспорт веществ через объем клетки) |
| 4 | Синцитозы:<br>- слияние клеток<br>- слияние клеток липидными везикулами, содержащими вещества |
| 5 | Интрацитоз (образование везикул и их слияние внутри клетки) |

P-g, размещенный внутри апикальных мембран капиллярного эндотелия

мозга, ограничивает проникновение ксенобиотиков в ЦНС.

Транспортеры органических анионов и катионов осуществляют выведение гидрофильных ксенобиотиков и их метаболитов печенью в желчь и почками в мочу. Транспортёры органических анионов формируют суперсемейство $Na^+$-независимых транспортных систем, осуществляющих транспорт через мембрану ряда ОХВ и их метаболитов. Они подразделяются на два семейства: органических переносчиков анионов — ОАТ и органических анион-транспортирующих полипептидов — ОАТР. Суперсемейство транспортёров органических катионов представлено одним семейством — ОСТ.

Транспортеры (ОАТ, ОАТР, ОСТ) обнаруживают в печени, почках, головном мозге и кишечнике, что позволяет им играть важную роль во всасывании, распределении и выведении ксенобиотиков. ОАТ и ОСТ играют наибольшую роль в активной секреции гидрофильных ЛС и других ксенобиотиков в проксимальных почечных канальцах в мочу, а ОАТР в гепатоцитах — в желчь.

О роли транспортеров в 3-й фазе биотрансформации ксенобиотиков более подробно изложено в главе 3.

Таким образом, барьерные функции меняются в зависимости от возраста, пола, нервных, гормональных и других гуморальных взаимоотношений в организме, тонуса вегетативной нервной системы, многочисленных внешних (химический и физические факторы) и внутренних воздействий, включая различные патологические состояния. На проницаемость гистогематических барьеров влияют механические и термические воздействия, ионизирующая радиация, голодание, утомление и т.д. Отмечено избирательное изменение проницаемости клеточных мембран гистогематических барьеров при введении в организм психотропных препаратов, этанола и ряда ксенобиотиков. Проницаемость гистогематических барьеров можно изменять направленно, что находит применение в клинике (например, для повышения эффективности химиотерапевтических препаратов).

# 3. СИСТЕМА БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ

Биотрансформации (метаболизму) чужеродных соединений, катализируемой с помощью специальных ферментных систем барьерных органов, придается особое значение, так как она направлена на подготовку ксенобиотика к выведению из организма [Г. И. Сидорин, 1991, 1994; Л. А. Тиунов, 1995; Фармакология, 2008; Экстренная медицинская помощь при отравлениях, 2010; J. A. Hinson, P. G. Forkert, 1995].

Различают микросомальные (с участием монооксигеназ) и немикросомальные (с участием цитозольных, митохондриальных и других ферментов) механизмы метаболизма ксенобиотиков.

Биотрансформация включает две основные фазы. Первая фаза — это метаболические реакции превращения эндогенных и экзогенных веществ в большинстве случаев с помощью микросомальных ферментов в более полярные метаболиты (окисление, восстановление, гидролиз, протекающие с затратой необходимой для этого энергии). Вторая фаза включает реакции конъюгации (соединение с белками, аминокислотами, глюкуроновой и серной кислотами), не требующие использования основных энергетических ресурсов клетки. Эти реакции направлены на образование нетоксичных гидрофильных соединений, которые хорошо вовлекаются в другие метаболические превращения и выводятся из организма экскреторными органами. Активация ферментов 2-й фазы также отвечает за антимутагенные и антиканцерогенные свойства метаболических систем детоксикации.

В настоящее время выделяют третью фазу биотрансформации, направленную на выведение ксенобиотиков из организма.

## 3.1 Первая фаза биотрансформации ксенобиотиков

В реакциях 1-й фазы биотрансформации участвуют оксидазы смешанной функции (семейства изоформ цитохрома Р450) и другие суперсемейства энзимов: флавинсодержащие монооксигеназы — ФМО; простогландинсинтетазы — гидропероксидазы и другие пероксидазы; дегидрогеназы (алкогольдегидрогеназы; альдегиддегидрогеназы и т.д.); редуктазы (флавопротеинредуктаза, НАДФН-хинооксидоредуктаза), гидролазы (эпоксидгидролазы, эстеразы), амидазы и др. [В. П. Саловарова и

др., 2007; Цитохром Р450 [Электронный ресурс]; Daniel W. Nebert et al. [Электронный ресурс].

Наиболее важное место в поддержании метаболического гомеостаза организма отводится ферментам микросомальной системы (монооксигеназная система — МОГС), локализованной в основном в мембранах эндоплазматического ретикулума [А. И. Арчаков, 1975].

Первая фаза биотрансформации осуществляется главным образом с помощью большой группы ферментов семейства цитохрома Р450 (CYP), отвечающих за метаболизм чужеродных органических соединений, лекарственных препаратов [Клиническая фармакокинетика., 2009; Экстренная медицинская помощь при отравлениях, 2010; Daniel W. Nebert et al. [Электронный ресурс]; D. R. Koop, 1986]. Цитохром Р450, НАДФН-цитохромР450 редуктаза и фосфолипиды биологических мембран, в которые встроены эти энзимы, образуют микросомальный монооксигеназный комплекс.

Печень является основным органом метаболизма ксенобиотиков. Вместе с тем микросомальные монооксигеназы обнаружены в коже, лёгких, тонком кишечнике, почках, головном мозге, надпочечниках, гонадах и плаценте. Из них кожа, лёгкие и кишечник служат первыми барьерами для токсических веществ, проникающих в организм.

Ферменты семейства цитохрома Р450 МОГС разнообразны по функциям (окисление, восстановление и гидролиз), типам ферментативной активности. Зачастую обладают малой субстратной специфичностью. Они могут проявлять как монооксигеназную, так и оксигеназную активность, поэтому их относят к оксидазам со смешанной функцией.

Цитохром Р 450 в ферментативном каскаде многоцелевых оксигеназ играет роль конечной оксидазы, принимающей электроны, необходимые для последующей активации кислорода, используемого для окисления метаболизируемых субстратов.

Задачей МОГС является образование функциональных гидрофильных групп. Эта система отличается высокой мощностью и многообразием осуществляемых метаболических реакций [А. И. Арчаков, 1975]:

1. Гидроксилирование алифатических и ароматических углеводородов (бензол, фенол, ПАУ), барбитуратов. Гидроксилирование по ароматическому кольцу связано с образованием фенолов, а в результате альфа-окисления — по боковым цепям.

2. Окисление по азоту и сере (аминазин, никотин, аминофлюорен). В результате окисления атома азота могут образовываться гидроксиламины, оксимы и N-оксиды. Окисление по атому серы приводит к образованию

сульфоксидов.

3. Эпоксидирование (ПАУ, например бенз(а)пирена, нафталена). Эпоксиды, возникающие в процессе метаболизма, могут подвергаться неферментативному гидролизу с образованием нафтанола либо, взаимодействуя с эпоксид гидролазой. В ходе биологического окисления ароматических углеводородов в клетках инициируются свободно-радикальные процессы, образуются ареноксиды, формирующие ковалентные связи с нуклеофильными структурами клеток (белками, нуклеиновыми кислотами и т.д.) и активирующие перекисное окисление липидов клеточных мембран. Ареноксиды могут вызывать некроз клеток, являются канцерогенами.

4. Окислительное деалкилирование гетероатомов (O-, N-, Si- и S-деалкилирование). Легко протекает O- и S-деалкилирование (гидролиз сложных эфиров и тиоэфиров); труднее — N-деалкилирование аминов. N-деметилирование является основным способом метаболизма вторичных и третичных аминов с образованием в качестве конечных продуктов альдегида, а широко используемого ракетного топлива 1,1-диметилгидразина — с образованием гидразина.

5. Окислительное дезаминирование ксенобиотиков, в том числе лекарственных веществ.

6. Дегалогенирование (галогенсодержащие пестициды: гексахлоран, ДДТ и др.).

7. Восстановление нитро- (нитробензол) и азосоединений (азокрасители). Реакции восстановления протекают в эндоплазматическом ретикулуме в присутствии NADPH (или NADH)-зависимого флавопротеина и цитохрома P450.

8. Десульфирование. Ферментативный процесс отщепления сероводорода или элементарной серы от органических соединений, в том числе с замещением серы кислородом, протекает при участии цитохрома P450.

К наиболее распространенным реакциям первой стадии биотрансформации ксенобиотиков относят реакции окисления, в первую очередь, — это гидроксилирование ксенобиотика по типу монооксигеназной многофункциональной реакции, которая осуществляет восстановление до воды одного атома кислорода и внедрение второго атома кислорода в молекулу субстрата. Цитохром P450 также катализирует TV-окисление, разрыв сложноэфирной связи, дегидрирование.

Реакции микросомального окисления, протекающие при участии P450, как правило, зависят от содержания O2 и NADPH в среде. Молекулярный кислород активируется цитохромом P450 (или другими цитохормами, например, P-448). Активация осуществляется с помощью NADPH при участии

флавин-содержащего энзима НАДФН-цитохром Р450 редуктазы. Донором электронов в превращениях субстратов, катализируемых этими энзимами, является NADPH.

На рисунке 3.1 представлена схема микросомального окисления субстрата (ксенобиотика) при участии цитохрома Р-450.

Цитохром Р-450 представляет собой группу ферментов, которые осуществляют не только метаболизм ксенобиотиков, но и участвуют в синтезе стероидных гормонов, холестерина, желчных кислот, эйкозаноидов (тромбоксана А2, простациклина I2) [Н. Н. Каркищенко, 2007].

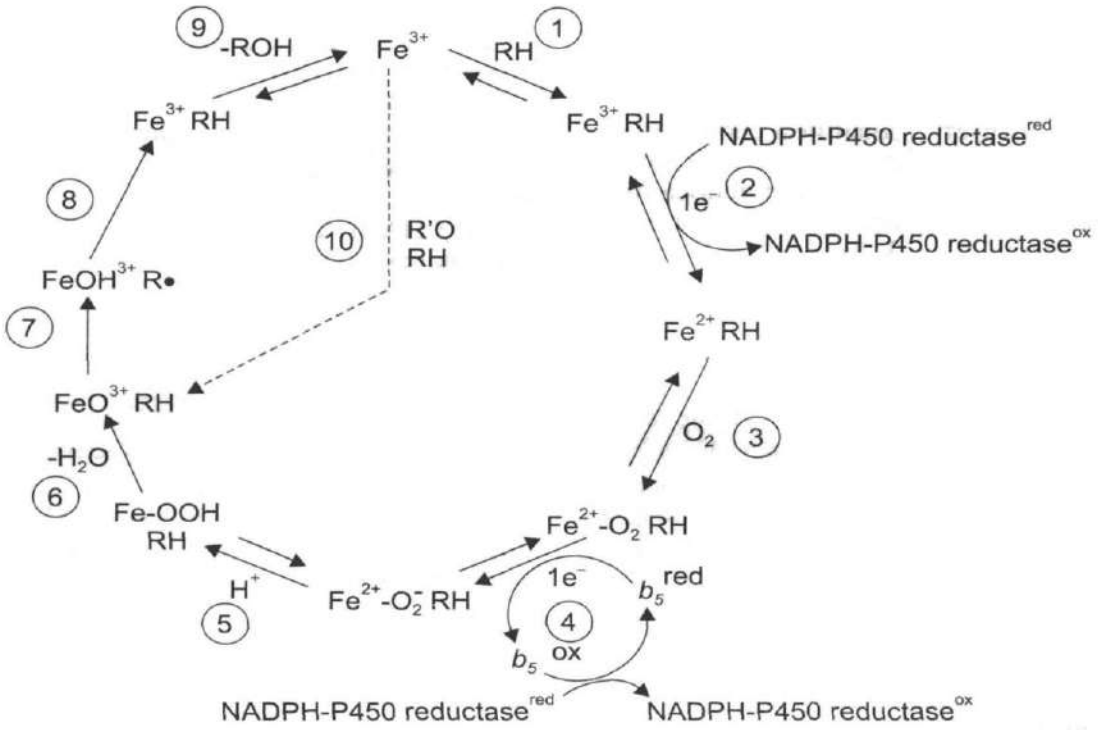


Рис. 3.1 Схема превращения субстрата при участии цитохрома Р-450 [Куценко С.А., 2004].

Активность этих гемопротеинов регулируется процессами синтеза гема, субстратами которого являются глицин, сукцинил-КоА и $Fe^{2+}$. Нарушение метаболизма гема, голодание, понижение соотношения NADPH / NADP+ могут приводить к снижению их активности.

В настоящее время известно, что цитохромы Р450 млекопитающих представляют собой структурно и функционально различные изоферменты. В 1987 г. была разработана классификация Р450, основанная на дивергентной эволюции и гомологии нуклеотид/аминокислотной последовательностей. Суперсемейство разделено на семейства, подсемейства и индивидуальные

цитохромы.

Независимо от структуры и хромосомной локализации, цитохромы Р450 подразделяют на конститутивные и индуцибельные. Конститутивные изоформы Р450 постоянно продуцируются клеткой, независимо от условий роста. В отличие от конститутивных форм, экспрессия индуцибельных ферментов может контролироваться химическими соединениями. Специфическая индукция отдельных форм Р450 — одно из важнейших свойств этих ферментов, приобретенных в процессе эволюции.

Система цитохром Р-450 (CYP) имеет более 1000 изоформ — изоферментов. Изоферменты CYP подразделяются на семейства и подсемейства. Изоферменты с идентичностью аминокислот более 40% объединены в семейства. Всего выделено 36 семейств, 12 — у млекопитающих), изоферменты с идентичностью аминокислот более 55% объединены в подсемейства (выделено 39 семейств). Все изоформы цитохрома Р450 объединены в семейства CYP: CYP1, CYP2, CYP3 и т.д. Внутри семейств выделены подсемейства A, B, C, D, E. В пределах подсемейств изоформы обозначены порядковым номером. Например, CYP2C19 — наименование 19-го по порядку цитохрома подсемейства «С», семейства «2».

В настоящее время практически для всех членов суперсемейства цитохрома Р450 известны специфические субстраты, что позволяет использовать их для выявления той или иной формы цитохрома Р450.

По данным, представленным в обзоре Daniel W. Nebert et al. [Электронный ресурс], ферменты семейств цитохрома 450 CYP1, CYP2, CYP3 и CYP4 являются катализаторами широкого спектра метаболических реакций, причем один фермент часто способен метаболизировать несколько разнообразных соединений. Кроме того, несколько ферментов Р450 могут метаболизировать одно соединение в различных местах. Одно и то же вещество может быть метаболизировано в одном месте различными ферментами Р450 с различной скоростью. Некоторые ферменты Р450, метаболизирующие ксенобиотики, проявляют активность к отдельным эндогенным субстратам (например, арахидоновая кислота). В то же время считается, что большинство из ферментов Р450, метаболизирующих ксенобиотики, не играют важной физиологической роли. Наиболее важными ферментами метаболизма канцерогенов являются представители семейства 1 и 2. Для каждого класса ксенобиотиков существует своя изоформа цитохрома Р450.

Прямое отношение к метаболизму лекарств и ксенобиотиков имеют шесть цитохромов Р450 (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4), которые катализируют 90% всех реакций окисления ксенобиотиков

[Клиническая фармакокинетика, 2009; Экстренная медицинская помощь при отравлениях, 2010], а также CYP1A1, метаболизирующий ПАУ, нитрозамины и другие ксенобиотики.

В таблице 3.1 представлена локализация данных изоформ ферментов семейства CYP. Из таблицы видно, что в печени — основном органе окисления ксенобиотиков — имеется наибольшее содержание CYP3A4.

Таблица 3.1 – Изоформы ферментов 1 фазы биотрансформации (цитохром Р450) ксенобиотиков [Экстренная медицинская помощь при отравлениях, 2010; Lewis* D.F.V. et al., 1999].

| Изофермент | Локализация | Содержание изоформ в печени, % |
|---|---|---|
| CYP1A1 | легкие, печень, лимфоциты, плацента | менее 1 |
| CYP1A2 | печень, тонкий кишечник, легкие | 2 (13*) |
| CYP2C9 | печень, слизистая носа, желудок, сердце, тонкий кишечник | 10-20 |
| CYP2C19 | печень, слизистая носа, сердце, тонкий кишечник, | 1 |
| CYP2D6 | печень, легкие, тонкий кишечник, сердце | 30 (2,5*) |
| CYP2E1 | печень, легкие, тонкий кишечник, | 7 |
| CYP3A4 | печень, слизистая носа, легкие, желудок, тонкий кишечник | 40-55 (28*) |

Изоформы цитохрома Р450 подсемейства 1А (CYP1A) окисляют многие канцерогены с образованием активных метаболитов, способных связываться с нуклеофильными сайтами макромолекул клетки, что может приводить к различным токсическим процессам, в том числе канцерогенезу [Н. В. Зайцева, и др., 2016; Клиническая фармакокинетика..., 2009; Daniel W. Nebert et al. [Электронный ресурс]. Канцерогены, особенно относящиеся к ПАУ (основным компонентам табачного дыма и продуктов сжигания органического топлива), диоксинам (в том числе, 2,3,7,8-тетрахлордибензо-р-диоксин), вызывают индукцию этих цитохромов Р450, что сопровождается многократным увеличением уровня их мРНК и ферментативных активностей.

Подсемейство CYP1A состоит из двух ферментов человека и других млекопитающих: согласно стандартной номенклатуре Р450 они обозначаются CYP1A1 и CYP1A2. Эти ферменты участвуют в метаболической активации

многих проканцерогенов, а также индуцируются рядом соединений, представляющих интерес для токсикологии, включая диоксин. Например, CYP1A1 метаболически активизирует многие соединения, ассоциируемые с раком мочевого пузыря, часто встречающегося у работников производств химических красителей. Высокая концентрация ферментов CP1A1 и CYP1A2 имеет место в легких курильщиков из-за индукции ПАУ, присутствующих в табачном дыме.

Изучен механизм индукции CYP1A1 под влиянием ПАУ и диоксинов. Проникнув в клетку, ПАУ (диоксины) соединяются с Ah-рецептором; образовавшийся комплекс ПАУ-Ah-рецептор проникает в ядро при помощи другого белка (ARNT), а затем стимулирует экспрессию гена *CYP1A1,* связываясь со специфическим диоксин-чувствительным участком (сайтом) гена. CYP1A2 метаболизирует не только ПАУ и диоксины, но ряд ЛС (теофиллин, кофеин и другие препараты). Биотрансформация гетероциклических аминов, образование аддуктов с ДНК связаны с CYP1A2. CYP1A2 обнаруживают в основном в печени. Молекулярные мишени для канцерогенов — белки, липиды, нуклеиновые кислоты. Метаболиты канцерогенов вызывают активацию протоонкогенов, инактивацию раковых супрессорных генов, репарацию ДНК. У курящих людей процессы индукции CYP1A1 протекают наиболее интенсивно; это приводит к биологической активации канцерогенов

CYPB1, участвуя в метаболизме ксенобиотиков, стероидов, липидов, холестерола, вызывают гормональные расстройства, онкозаболевания.

Цитохромы Р450 семейств 2 и 3 осуществляют метаболизм ксенобиотиков, главным образом лекарств [Н. В. Зайцева и др., 2016; В. Г. Кукес, 2004; Клиническая фармакокинетика., 2009]. Изоферменты подсемейства CYP2A участвуют в активации нитрозаминов. CYP2B метаболизируют гетероциклические соединения, обладают способностью к индукции под действием фенобарбитала. CYP2B6 принимает участие в метаболизме эндогенных стероидов: катализирует 16α-16β гидроксилирование тестостерона; метаболизирует ксенобиотики и некоторые ЛС.

У человека четыре фермента принадлежат к подсемейству CYP3A ввиду их сходства с секвенцией аминокислоты: 3A3, 3A4, 3A5 и 3A7. Цитохромы подсемейства 3А составляют 30% всех изоферментов цитохрома Р-450 в печени и 70% всех изоферментов стенки пищеварительного тракта. В печени преимущественно локализован изофермент 3А4 (4), в стенках желудка и кишечника – изоферменты 3А3 (CYP3A3) и 3А5 (CYP3A5). Изофермент 3А7 (CYP3A7) обнаруживают только в печени плода. Фермент *CYP3A4* является основным цитохромом Р450 в печени человека, а также присутствует в

желудочно-кишечном тракте. Аналогично ряду других ферментов, уровень CYP3A4 варьирует в широком диапазоне у различных людей. Фермент CYP3A5 обнаружен в печени 25% пациентов. Ферменты CYP3A метаболизируют ряд лекарств, например, эритромицин и циклоспорин; канцерогенный загрязнитель продуктов питания афлатоксин B1 является субстратом CYP3A [Клиническая фармакокинетика., 2009].

Цитохром CYP2D6 катализирует трансформацию многих реактивных и специфических эпоксидов в дигидродиолы, являющиеся для многих соединений неактивными. Но в некоторых случаях, например, для ПАУ, образуются особо опасные эпоксид-дигидродиолы. Гидролазная реакция трансформирует эпоксид в диол. Медленный метаболизм субстратов CYP2D6 обнаружен у 8% «белых» и 5% негров, что может вызвать серьезные поражения печени, нейропатию при приеме, например, антиангинального препарата пергексина.

Изоферменты CYP2C метаболизируют большинство химических соединений. Изофермент цитохрома P-450 2C9 (CYP2C9) содержится, в основном, в печени. CYP2C9 отсутствует в фетальной печени, его обнаруживают только через месяц после рождения. Активность CYP2C9 не меняется в течение всей жизни. CYP2C9 метаболизирует различные лекарственные вещества. CYP2C9 — главный фермент метаболизма многих нестероидных противовоспалительных средств, в том числе селективных ингибиторов циклооксигеназы-2, ингибиторов ангиотензиновых рецепторов (лозартана и ирбесартана), гипогликемических препаратов (производных сульфонилмочевины), фенитоина, непрямых антикоагулянтов. Следует отметить, что CYP2C9 метаболизирует в основном S-варфарин и S-аценокумарол. Индукторы CYP2C9 — рифампицин и барбитураты. Следует отметить, что практически все сульфаниламидные антибактериальные препараты ингибируют CYP2C9. CYP2C9 обладает генетическим полиморфизмом. «Медленные» аллельные варианты *CYP2C9*2 и CYP2C9*3* (однонуклеотидные полиморфизмы гена CYP2C9*)* изучены в настоящее время наиболее полно. У носителей аллельных вариантов *CYP2C9*2 и CYP2C9*3* отмечают снижение активности CYP2C9; это приводит к снижению скорости биотрансформации ЛС, метаболизирующихся данным изоферментом и к повышению их концентрации в плазме крови. Гетерозиготы (*CYP2C9*1/*2, CYP2C9*1/*3*) и гомозиготы (*CYP2C9*2/*2, CYP2C9*3/*3, CYP2C9*2/*3*) являются «медленными» метаболизаторами CYP2C9.

Изофермент цитохрома P-450 2C19 (CYP2C19) — основной фермент метаболизма ингибиторов протонного насоса. Наибольшее содержание фермента отмечается в почках и печени. CYP2C19 участвует в метаболизме

примерно 20% лекарственных препаратов, в том числе адреноблокаторов. Фермент также утилизирует канцерогены табачных продуктов. CYP2C19 (S-мефенитоин гидроксилаза) катализирует реакции 5-гидроксилирования пиридинового кольца и 5'-деметилирования в бензимидазольном кольце.

В человеческом организме CYP2C19 располагается в гепатоцитах. Этот изофермент катализирует нуклеофильную атаку водой или $OH^-$ с противоположной стороны эпоксидного кольца. Образующиеся диолы имеют трансконфигурацию. Для CYP2C19 характерен генетический полиморфизм. Медленные метаболизаторы по CYP2Cl9 — носители «медленных» аллельных вариантов. Применение у медленных метаболизаторов по CYP2C19 препаратов — субстратов этого изофермента приводит к более частому возникновению нежелательных лекарственных реакций, особенно при использовании препаратов с узкой терапевтической широтой: трициклических антидепрессантов, диазепама, некоторых барбитуратов (мефобарбитала, гексобарбитала).

Цитохром P450scc — член цитохрома суперсемья P450 ферментов (CYP11A1) [A. H. Миненко, 2008; D. R. Nelson, 2009]. Данный фермент лимитирует скорость реакции образования стероидов в яичниках и надпочечниках; является ключевым ферментом биотрансформации ПАУ. Цитохром P-450scc содержится во внутренней мембране митохондрий стероидогенных органов, отвечает, в сопряжении с адренодоксином и NADPH: адренодоксин-оксидоредуктазой, за ключевую стадию синтеза стероидных гормонов млекопитающих: превращение холестерина в прегненолон (pregnenolone – общий предшественник всех стероидных гормонов) в трех реакциях монооксигеназы [Фермент [Электронный ресурс]. Они включают 2 стадии гидроксилирования цепи холестерина, которые производят, во-первых, 22R-hydroxycholesterol и затем 20alpha, 22R-dihydroxycholesterol. В заключительной стадии разрывается связь между углеродом 20 и 22, что приводит к синтезу pregnenolone и isocaproic альдегида. Все три вышеперечисленных белка вместе составляют комплекс раскола цепи холестерина. P450scc всегда активен, однако его деятельность ограничена поставкой холестерина во внутренней мембране. Процесс передачи электрона от NADPH до P450scc плотно не соединен; то есть, во время передачи электрона от adrenodoxin редуктазы через adrenodoxin к P450scc определенная часть электронов протекает за пределами цепи и реагирует с кислородом, что приводит к образованию супероксидных радикалов. Ячейки системы Steroidogenic включают разнообразное множество антиокислительных механизмов для нейтрализации этих радикалов.

Цитохром CYP2E1 участвует в метаболизме ацетона, бензола,

бенз(а)пирена, тетрахлористого углерода. Фермент присутствует непосредственно в печени, и его концентрация существенно различается у разных людей. В результате ферментативных реакций данного цитохрома образуются перекись водорода и свободнорадикальные пероксид и гидроксил (из этанола), что вызывает повреждения органов и, прежде всего печени — гепатоканцерогенез [M. Munaka et al., 2003249]. CYP2E1 индуцируется алкоголем, фенобарбиталом, изониазидом, фенитоином. он играет важную роль в поражении печени под воздействием таких химических веществ, как хлороформ, винилхлорид и четыреххлористый углерод, табачный дым (N-нитрозометиламин).

Микросомальная эпоксидгидролаза (EPXH1) обеспечивает детоксикацию высокоактивных эпоксидов, накапливающихся при деятельности предшествующих ферментов [И. С. Полякова и др., 2011].

Участвует в промежуточном этапе детоксикации, превращая эпоксиды в трансгидродиолы, с которыми образуются конъюгаты с глюкуроновой кислотой и глутатионом: она гидрирует монозамещенные, 1,1-дизамещенные и цис-1,2-дизамещенные эпоксиды и эпоксиды на циклических системах (инактивирует эпоксиды после ферментов 1-й фазы биотрансформации). EPXH1 может находиться в двух функционально различных состояниях — «медленном» и «быстром». Состоящая из 455 аминокислотных остатков с молекулярной массой 52 кД она выполняет большую часть гидролитического расщепления оксиранового кольца ксенобиотиков [Клиническая фармакокинетика., 2009].

EPHX1 экспрессируется в значительных количествах в печени, почках, и может быть индуцирована фенобарбиталом и 3-метилхолантреном. Фермент также распространен в коже, селезенке, головном мозге, сердечной мышце, кишечнике. Метаболиты противосудорожного средства фенитоин являются субстратами EPHX1.

Гидролитическое действие фермента вызывает образование эпоксисоединений в монооксигеназной системе. Электрофильные продукты реакции способны ковалентно связываться с макромолекулами клетки и вызывать побочные эффекты. У животных они выявлены в виде гиперплазии десен или тератогенных эффектов. Такие последствия, особенно сильные, возникают, если в организме содержание EPHX1 меньше 30% от нормы.

*НАДФ(Н) — хинон оксидоредуктаза 1* (NQO1, OMIM 125860) является цитозольным ферментом, который катализирует двухэлектронное восстановление соединений хинона и предотвращает образование свободных радикалов семихинона и активных молекул кислорода, таким образом защищая клетку от окислительного стресса [А. В. Полоников, 2006; E. S. Jaffe

et al., 2001; D.Siegel D. et al., 2004 ]. NQO1 участвует в метаболизме бензола, нитрозаминов и других ароматических нитро- и аминосоединений, В частности, активирует канцерогены, содержащиеся в табачном дыму и некоторых пищевых продуктах: нитрозамины и гетероциклические амины.

Экспрессия NQO1 наблюдается при воздействии антиоксидантов, оксидантов и тяжелых металлов. У человека высокий уровень NQO1 отмечен в эпителиальных клетках, сосудистом эндотелии и адипоцитах, в клетках многих видов рака.

Флавинсодержащие монооксигеназы (К.Ф. 1.14.13.8, FMOs) локализуются в эндоплазматическом ретикулуме; встречаются в тканях в форме одной видоспецифичной неиндуцибельной изоформы, не подвергающейся индукции; являются FAD-, NADPH- и 0[2]-зависимыми микросомальными ферментами [С.А. Куценко, 2004; В. П. Саловарова, 2007; Т. В. Тупицына и др., 2012; J. R. Cashman et al., 2004].

FMO, акцептируя электрон от NADPH, катализируют окисление нуклеофильного гетероатомного центра в молекулах ксенобиотиков определенного строения — азотсодержащие вещества основного характера (гидразины, ариламины), тиокарбамильные соединения (тиоацетамид и т.д.). FMO катализируют окислительные реакции многих N-, S-, P-, Se- и гетероатомсодержащих химикатов и лекарств, образуя нетоксичные метаболиты. Многие из субстратов FMO одновременно являются и субстратами цитохрома Р450.

Среди 5 известных FMO в печени взрослого человека преобладает FMO3, которая участвует в метаболизме триметиламина, в результате окислительных реакций экскретируемого из организма человека с мочой в виде триметиламин-М-оксида. У человека, в отличие от большинства млекопитающих, FMO2 не обладает функциональной (каталитической) активностью, так как экспрессируется в редуцированной форме. Отмечают отсутствие индукции и ингибирования активности FMO некрупными молекулами, что важно при их взаимодействии с лекарствами.

Показано, что из флавинмонооксигеназ (FMO1–5) человека и кролика, FMO1 превращает N-деацетилкетоконазол преимущественно в его N-гидроксилированный метаболит при накоплении других метаболитов менее 5% [R. J. Rodriguez, C. L. Miranda, 2000]; FMO2 кролика — в N-гидроксилированный метаболит и в М1; кДНК-экспрессируемая FMO3 человека и кролика интенсивно метаболизирует N-деацетилкетоконазол, превращая его в N-гидроксилированный метаболит и в метаболиты М1, М2. N-деацетилкетоконазол не является субстратом для FMO5.

FMO обладают про- и антиоксидантными свойствами.

В таблице 3.2 представлены некоторые реактивные продукты 1-й фазы биотрансформации ксенобиотиков.

Таблица 3.2 − Примеры образования активных промежуточных продуктов в 1-й фазе метаболизма ксенобиотиков [Куценко С.А., 2004]

| Исходное вещество | Энзимы | Продукт реакции | Класс соединения |
|---|---|---|---|
| Аллиловый спирт | алкогольдегидрогеназа | акролеин | ненасыщенный альдегид |
| Бенз(а)пирен | Р-450<br>эпоксидгидролаза<br>пероксидаза | бензпирендиол-эпоксид | диол эпоксид |
| Бензол | Р-450<br>пероксидаза | бензохинол | хинол |
| Винилхлорид | Р-450 | хлорэтиленэпоксид | эпоксид |
| Гексан | Р-450<br>алкогольдегидрогеназа | гександион | дикетон |
| Дихлорэтан | Р-450 | хлорацетальдегид | альдегид |
| Диметилнитро-замин | Р-450 | ион метилдиазониума | алкил диазониум |
| Р-аминофенол | Пероксидаза | р-бензохинонимин | хинонимин |
| Тетрахлорметан | Р-450 | тетрахлорметил-радикал | алкильный радикал |
| Хлороформ | Р-450 | фосген | ацилгалоген |

Отмечено, что в ходе микросомального окисления часто образуются реакционноспособные промежуточные продукты, некоторые из которых нестабильны и подвергаются дальнейшему превращению, другие — являются устойчивыми. Ферменты биотрансформации липофильных ксенобиотиков, участвуют не только в детоксикации, но и в образовании более токсичных метаболитов. Например, эпоксидирование приводит к появлению высокореакционноспособных и часто токсичных продуктов (биотрансформация бенз(а)пирена в эпоксид, обладающий мутагенным действием). Образование реактивных метаболитов в ходе реакций 1-й фазы биотрансформации ксенобиотиков и их дальнейшее ковалентное связывание с макромолекулами клетки может привести к синтезу аутоантигенов и развитию аутоаллергии [В. В. Ляхович и др., 2002].После превращений 1-й фазы биотрансформации метаболиты могут включаться в дальнейшие реакции 2-й фазы биотрансформации ксенобиотиков и выделяться в виде конъюгатов.

## 3.2 Вторая фаза биотрансформации ксенобиотиков

Реакции 2-й фазы связаны со спариванием водорастворимой эндогенной молекулы с химическим веществом (или метаболитом 1-й фазы) с целью образования гидрофильных конъюгатов и облегчения их экскреции. Реакции

этой фазы называют реакциями конъюгации или дериватизации.

Ко 2-й фазе биотрансформации ксенобиотиков относятся реакции глюкуронидации, сульфатирования, ацетилирования, метилирования, конъюгации с глутатионом (синтез меркаптуровой кислоты) и с аминокислотами, такими как глицин, таурин, глутаминовая кислота, а также трансформации эпоксидов в дигидродиолы с участием эпоксидгидролаз. Кофакторы этих реакций реагируют с функциональными ферментами 1-й фазы, за исключением метилирования и ацетилирования.

Общая характеристика реакций 2-й фазы биотрансформации ксенобиотиков представлена на таблице 3.3.

Основным органом 2-й фазы метаболизма ксенобиотиков, как и первой фазы, является печень, однако уровень некоторых ферментов биотрансформации высок в желудочно-кишечном тракте, гонадах, легких, мозге и почках [Клиническая фармакокинетика., 2009].

Энзимами, активирующими процесс биотрансформации 2-й фазы, являются: УДФ-глюкоронозилтрансферазы, сульфотрансферазы, ацетил-КоА-амин-N-ацетилтрансферазы, глутатион-S-трансферазы, хинон-редуктаза, цистеинконъюгирующие лиазы и др.

Таблица 3.3 − Характеристика основных реакций конъюгации ксенобиотиков [Куценко С.А., 2004]

| Реакция | Присоединяемый агент | Функциональная группа ксенобиотика |
|---|---|---|
| А. Реакции, протекающие при участии активированных форм присоединяемых агентов | | |
| Конъюгация с глюкуроновой кислотой | УДФ-глюкуроновая кислота | OH; -COOH; $NH_2$; $-NR_2$; -SH; -CH |
| Конъюгация с глюкозой | УДФ-глюкоза | -OH; -SH; COOH; =NH |
| Сульфатация | 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат (ФАФС) | -OH; $-NH_2$; -SH |
| Метилирование | S-аденозилметионин | -OH; $-NH_2$ |
| Ацетилирование | ацетил КоА | -OH; $-NH_2$ |
| Детоксикация цианида | сульфон-сульфид | -CN |
| Б. Реакции, протекающие при участии активированных форм ксенобиотиков | | |
| Конъюгация с глутатионом | глутатион | ареноксиды; эпоксиды; галогенированные алкильные и арильные углеводороды |
| Конъюгация с аминокислотами | глицин; глутамин; орнитин; таурин; цистеин | -COOH |

Ферменты этой фазы биотрансформации осуществляют окончательную

детоксикацию ксенобиотиков и приводят к значительному увеличению их гидрофильности для дальнейшей экскреции из организма [Генетический паспорт, 2009; [Экстренная медицинская помощь при отравлениях; 2010].

Большинство ферментов 2-й фазы биотрансформации локализовано в цитозоле, кроме УДТ, которые являются микросомальными.

Реакции 2-й фазы обычно протекают намного быстрее, чем реакции 1-й фазы, катализируемые цитохромом Р450. Поэтому скорость элиминирования ксенобиотика в большой степени зависит от скорости, с которой протекает реакция 1-й фазы.

В таблице 3.4 дана функциональная характеристика основных ферментов 2-й фазы биотрансформации ксенобиотиков.

*Глюкуронилтрансферазы.* Глюкуронирование — наиболее важная реакция 2-й фазы метаболизма веществ [Клиническая фармакокинетика 2009; R. Burchell, P. Weatheril, 1981]. Представляет присоединение ксенобиотика (или его метаболита) к субстрату с помощью уридиндифосфат-глюкуронозилтрансферазы (УДФ-глюкуронилтрансферазы). Является основным путем биотрансформации ксенобиотиков у многих видов млекопитающих за исключением семейства кошачьих. В качестве кофактора эта реакция требует присутствия уридиндифосфоглюкуроновой кислоты (УДФ).

Таблица 3.4 – Характеристика основных ферментов 2 фазы биотрансформации ксенобиотиков [Кукес В.Г., 2004; Weber W.W., King C.M., 1981.]

| Фермент | Локализация | Функция |
|---|---|---|
| УДФ-глюкуронилтрансферазы | микросомы гепатоцитов | глюкуронирование билирубина, ксенобиотиков |
| Глутатион-S-трансферазы | цитозоль и микросомы гепатоцитов | конъюгация с глутатионом |
| N-ацетилтрансфераза 2 | цитозоль гепатоцитов | ацетилирование ксенобиотиков |
| Сульфонтрансферазы | цитозоль гепатоцитов | сульфатирование гормонов (тиреоидные, стероидные, катехоламины) и ксенобиотиков |

УДТ локализуется в эндоплазматическом ретикулуме клеток печени и других тканей (почки, тонкий кишечник, селезенка, кожа, мозг и т.д.).

Сайтом глюкуронидации обычно является электрон-богатый нуклеофильный атом кислорода, азота или серы.

Субстраты для УДТ содержат такие функциональные группы, как карбоксигруппу, спиртовую или фенольную (в результате реакции формируется О-глюкуроновый эфир), первичные или вторичные аминогруппы

(N-глюкурониды) или свободную сульфгидрильную группу (S-глюкурониды). Глюкуроновые конъюгаты являются полярными соединениями, которые легко экскретируются с мочой или желчью, что зависит от размера агликона.

Глюкуронидация ксенобиотиков печеночными микросомами может быть стимулирована детергентами, которые разрывают липидный бислой, что обеспечивает УДТ свободный доступ к УДФ-глюкуроновой кислоте.

Однако высокая концентрация детергента может ингибировать УДТ, разрушая взаимодействия между ферментом и фосфолипидами.

УДТ катализируют глюкуронирование большого количества ксенобиотиков, включая лекарственные средства и их метаболиты, пестициды и канцерогены. К соединениям, подвергающимся глюкуронированию, относят простые и сложные эфиры; спирты, соединения, содержащие карбоксильные, карбомоильные, тиольные и карбонильные группы, а также нитрогруппы.

Глюкуронидация обычно представляет собой детоксикационный процесс, однако субстратами для УДТ могут служить эндогенные соединения, типа билирубина, стероидных и тиреоидных гормонов.

Стероидные гормоны взаимодействуют с глюкуронидом по Д-кольцу (но не по А-), что может привести к возникновению холестазии. Индукция УДТ может влиять на возникновение рака щитовидной железы у грызунов.

В некоторых случаях глюкуронидация может усилить токсичность ксенобиотика. Например, ароматические амины типа 2-аминонафталена и 4-аминобифенила N-гидроксилируются в печени с последующей глюкуронидацией N-гидроксиметаболита.

N-глюкурониды подвергаются почечной фильтрации, накапливаясь в полости мочевого пузыря, где при кислых значениях pH происходит их гидролиз до соответствующих канцерогенных N-гидроксиариламинов. В таком случае усиление глюкуронизации может способствовать возникновению рака мочевого пузыря.

Глюкуронирование может привести к биоактивации канцерогенов. К канцерогенным глюкуронидам относят N-глюкуронид 4-аминобифенила, N-глюкуронид N-ацетил-бензидина, O-глюкуронид-4-((гидрокисметил)-нитрозоамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанона.

*Глутатион-S-трансферазы.* Конъюгация ксенобиотиков с глутатионом катализируется суперсемейством глутатион-S-трансфераз (GST) [Н. В. Зайцева, 2016; В. Г. Кукес и др., 2007].

Глутатион представляет собой трипептид, состоящий из глицина, цистеина и глутаминовой кислоты, которая связана с цистеином через $\gamma$-карбоксильную группу. В результате нуклеофильной атаки глутатион тиолат аниона на электрофильный атом углерода, кислорода, азота или серы ксенобиотика,

формируется тиоэфир.

ГST обнаружены в большинстве тканей, а именно в печени, почках, тонком кишечнике, легких. 95% от общего содержания фермента локализовано в цитоплазме и около 5% — в эндоплазматическом ретикулуме.

Субстратами для ГST являются гидрофобные соединения, содержащие электрофильный атом, способные реагировать с глутатионом неферментативно. Однако, из-за стереоселективности реакций с ксенобиотиками, в основном они протекают при участии ГST. Механизм, с помощью которого ГST усиливает скорость конъюгации, состоит в депротонировании GSH до GS-. В этой реакции принимает участие тирозинат Tyr-O-, расположенный в активном центре.

Субстраты для глутатионовой конъюгации можно разделить на две группы:

1) достаточно электрофильные для осуществления прямой конъюгации,

2) требующие активации до реакции конъюгации; 2-я группа соединений включает в себя оксиарены, эпоксиды алкенов, ионы нитрония, ионы карбония и свободные радикалы.

ГST представляет собой димер, составленный из комбинации 2-х идентичных или неидентичных субъединиц. ГST представлен суперсемейством мультифункциональных изоферментов, которые способствуют процессам детоксикации, используя различные механизмы, включая:

- каталитическую инактивацию широкого спектра ксенобиотиков через конъюгацию с GSH;
- некаталитическое связывание определенных ксенобиотиков;
- восстановление липид- и ДНК-гидропероксидов через экспрессию активности GSH-пероксидазы 2.

Конъюгации с глутатионом подвергаются ксенобиотики с различной химической структурой: эпоксиды, ареноксиды, гидроксиламины (некоторые из них обладают канцерогенным действием). Изоферменты ГST играют важную роль в метаболизме канцерогенов, липидов, продуктов свободнорадикального окисления, в обмене катехолэстрогенов, в детоксикации афлатоксин В1-8,9-эпоксида. ГST печени человека обладает каталитической активностью по отношению к реактивному метаболиту БП — БП-4,5-оксиду.

Кроме метаболизма канцерогенов и других ксенобиотиков, ГST участвует в биосинтезе биологически активных молекул, включая лейкотриены и простагландины, а также в связывании билирубина, стероидных гормонов, обеспечивая их транспорт, в обеспечении устойчивости к продуктам ПОЛ, алкилированию белков, нуклеиновых кислот.

Активность ГST в эритроцитах человека у различных индивидуумов различается в 6 раз, однако существует чёткая корреляция ее активности у

детей с активностью у их родителей; зависимость активности фермента от пола отсутствует [В. Г. Кукес, 2004].

*N-ацетилтрансферазы.* Ацетилирование относят к одним из ранних механизмов адаптации. В ацетилировании участвуют N-ацетилтрансфераза и кофермент А.

NAT — цитозольные ферменты, содержащиеся в печени и многих других тканях у большинства видов млекопитающих, за исключением лис и собак, неспособных к N-ацетилированию ксенобиотиков. У кроликов, мышей экспрессируется две формы NAT: NAT1 и NAT2. У человека идентифицировано, кроме этих двух классов, еще 3 класса ферментов: арилалкин-N-ацетилтрансфераза (AANAT), L1-протеин-регулятор адгезии клеток (L1 CAM) и гомолог Saccharomyces cerevisiae N- ацетилтрансферазы (ARD1).

Интенсивность ацетилирования в организме человека контролируют β2-адренорецепторы, пантотеновая кислота, пиридоксин, тиамин, липоевая кислота.

Ацетилирование зависит от функционального состояния печени и других органов, содержащих N-ацетилтрансферазу. Выделено два изофермента ариламин N-ацетилтрансферазы — NAT1 и NAT2, которые осуществляют N- и O-ацетилирование ароматических и гетероциклических аминов и гидразинов, в том числе многих канцерогенов [О. В. Шевченко и др., 2012; W. W. Weber, C. M. King, 1981].

NAT1 и NAT2 являются близкими по структуре (79-95% гомологии аминокислотной последовательности, в зависимости от вида). У всех белков в активном центре присутствует цистеин (Cys68).

N-ацетилирование — основной путь биотрансформации для ароматических аминов, в том числе и лекарств, содержащих гидразогруппу (R-NH- NH2), которые превращаются в ароматические амиды (R-NH-COCH3) или гидразиды (R-NH-NH-COCH3) соответственно [С. А. Куценко, 2004].

Первичные алифатические амины редко подвергаются N-ацетилированию, за исключением цистеиновых конъюгатов, образующихся из глутатионовых, которые, в свою очередь, в почках путем N-ацетилирования превращаются в меркаптуровую кислоту.

Многие N-ацетилированные метаболиты менее, чем исходные соединения, растворимы в воде. Однако в отдельных случаях, например, для изониазида, N-ацетилирование облегчает экскрецию метаболитов с мочой.

Реакция N-ацетилирования, катализируемая NAT, требует присутствия ацетил-кофермента А в качестве кофактора. Реакция протекает в два этапа. Первым этапом ацетильная группа Ац-КоА переносится к цистеиновому

остатку внутри активного центра фермента с высвобождением кофермента Затем ацетильная группа Ац-КоА переносится с ацетилированного фермента на аминогруппу субстрата.

Для сильноосновных аминов скорость N-ацетилирования определяется первым этапом, а для слабоосновных — вторым. В определенных случаях NAT могут катализировать реакцию О-ацетилирования.

*Сульфотрансферазы.* Многие ксенобиотики, после реакции О-глюкуронидации подвергаются сульфатной конъюгации [В. С. Баранов и др., 2000]. Реакция катализируется сульфотрансферазами — группой ферментов, обнаруженных в печени, почках, кишечнике, легких, мозге. Кофактором реакции служит 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат (PAPS), который в организме синтезируется из АТФ и неорганического сульфата.

Сульфатная конъюгация включает перенос $SO3^-$ от PAPS к ксенобиотикам [В. С. Баранов и др., 2000]. Субстраты для реакции не ограничиваются спиртами и фенолами, которые 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 и 2-аминонафтален, конъюгирующие с PAPS с образованием соответствующих сульфаматов.

N-гидроксиариламины также являются субстратами для сульфотрансфераз. Во всех случаях реакция включает нуклеофильную атаку атомов кислорода или азота на атом серы в PAPS с расщеплением фосфосульфатной связи. Сульфатные конъюгаты представляют собой хорошо водорастворимые эфиры серной кислоты.

Сульфатные конъюгаты ксенобиотиков экскретируются в основном с мочой. Метаболиты, экскретируемые с желчью, могут быть гидролизованы арилсульфатазами, присутствующими в микрофлоре кишечника, что способствует энтеропеченочной циркуляции ксенобиотика.

Сульфатазы присутствуют и в эндоплазматическом ретикулуме, и в лизосомах, где преимущественно гидролизуют сульфаты эндогенных соединений. Некоторые сульфатные конъюгаты подвергаются дальнейшей биотрансформации. Сульфатирование способствует декодированию тироксина и трийодтирозина и может определять скорость элиминирования тиреоидных гормонов.

Относительно низкая концентрация PAPS в клетке (около 75 мкМ, для сравнения — концентрация УДФ-глюкуроновой кислоты составляет около 350 мкМ) ограничивает возможности сульфатирования ксенобиотиков.

В целом этот путь биотрансформации представляется высокоспецифичным, но низкоемким. Ряд соединений одновременно

являются субстратами и для сульфотрансфераз и для УДФ-глюкуронозилтрансфераз, при этом выбор пути метаболизма может зависеть от концентрации субстрата, доступности кофакторов и т.д.

Например, относительное содержание продуктов метаболизма ацетаминофена зависит от дозы препарата: при низких дозах преобладают сульфатные конъюгаты, а с увеличением дозы происходит насыщение метаболического пути и, возможно, за счет ингибирования активности сульфотрансфераз, снижение относительного количества сульфатных конъюгатов по сравнению с глюкуроновыми.

В организме человека обнаружено три семейства сульфотрансфераз (SULT1, SULT2, SULT3) и около 40 изоферментов, которые кодируются 10 генами. Суперсемейство подразделяется на ряд подсемейств: 1A, 1B, 1C, 1E, 2A, 2B и 3A, исходя из гомологии аминокислотной последовательности.

Сульфотрансферазы с учетом субстратной специфичности подразделяют на следующие классы:

1) арилсульфотрансферазы — сульфатируют большое количество фенольных ксенобиотиков;

2) алкогольсульфотрансферазы — метаболизируют первичные и вторичные спирты, включая неароматические гидроксистероиды;

3) эстрогенсульфотрансферазы — метаболизируют ароматические гидрооксистероиды;

4) тирозинсульфотрансферазы — метаболизируют тирозин, метиловые эфиры, желчные кислоты.

У человека в цитозоле печени обнаружено 3 вида сульфотранфераз: два изофермента фенольной сульфотрансферазы и одна стероид/желчная сульфотрансфераза, называемая также дегидроэпиандростеронсульфотрансфераза (DHEA-ST). Фенольные сульфотрансферазы отличаются по термостабильности — одна из форм является термостабильной, а вторая — термолабильной.

Исследование роли сульфотранфераз в биоактивации 4-аминобифенила показало, что N-OH-аминобифенилсульфотрансферазная активность в печени и кишечнике коррелировала с активностью термостабильной ST, но не с активностями термолабильной ST или DHEA-ST.

Используя арилсульфотрансферазную пробу мРНК (HAST1), была продемонстрирована заметная сульфотрансферазная экспрессия в толстом и тонком кишечнике, легких, желудке и печени человека.

Наибольшую роль в сульфатировании лекарственных средств и их метаболитов играют изоферменты SULT1, из которых особенно важными считаются SULT1A1 и SULT1A3.

К эндогенным субстратам SULT1A1 относится 17Р-эстрадиол, а к экзогенным — такие лекарственные препараты как миноксидил, ацетаминофен, морфин, салициламид, изадрин и др. Маркерным субстратом SULT1 является 4-нитрофенол. SULT1A3 катализирует реакции сульфатирования фенолов моноаминов: дофамина, серотонина, норадреналина. Маркерным субстратом фермента является дофамин.

В целом, сульфатирование эффективно снижает фармакологическую и токсикологическую активность ксенобиотиков. Однако в некоторых случаях сульфатирование увеличивает токсичность чужеродных соединений, поскольку отдельные сульфатные конъюгаты химически нестабильны и деградируют, формируя сильные электрофильные соединения.

Сульфоконъюгация является необходимым этапом активации многих проканцерогенов (ацетиламинофлуорен, ариламины и др.). Многие N-гидроксиариламины и гидроксамовые кислоты обладают мутагенным эффектом в присутствии сульфотрансферазной активности. Для детектирования мутагенного эффекта важно, что сульфатирование имеет место внутри клеток-мишеней, поскольку сульфатные конъюгаты из-за своего заряда не могут проникнуть сквозь клеточные мембраны.

*Метилтрансферазы.* Метилированию с помощью метилтрансфераз могут подвергаться молекулы, содержащие в структуре гидроксильные, сульфгидрильные и аминогруппы [Клиническая фармакокинетика, 2009; В. П. Саловарова и др., 2007]. Путем метилирования конъюгации подвергаются фенолы, амины, серосодержащие соединения, тиоловые яды (ртуть, свинец, мышьяк, олово и др.) и некоторые эндогенные соединения.

В результате метилирования образуются соответствующие О-, N- и S-метильные конъюгаты. В качестве донора метильной группы выступает метионин в активной форме SAM, образующегося при его взаимодействии с АТФ и являющегося субстратом около полусотни метилтрансфераз.

О-метилированию подвергаются соединения, содержащие фенольные группы. Под влиянием ферментов (О-метилтрансфераз) метильная группа кофермента SAM присоединяется к атомам кислорода фенольных гидроксилов.

Для реакции метилирования фенолов кроме кофермента требуется присутствие ионов магния или ионов других двухвалентных металлов.

Соединения, содержащие одну фенольную группу, при наличии указанных ферментов не метилируются. При N-метилировании метильная группа SAM под влиянием N-метилтрансферазы присоединяется к атомам азота метаболитов или чужеродных соединений.

Некоторые чужеродные соединения, содержащие тиоловые группы (-SH), в

организме также подвергаются метилированию. При этом метильная группа SAM в присутствии ферментов (метилтрансфераз) переносится к атомам серы метаболитов или чужеродных соединений с образованием соответствующих S-метилпроизводных этих соединений.

Метилирование ксенобиотиков по сравнению с другими реакциями конъюгации имеет особенность, которая заключается в том, что в результате присоединения метильной группы не образуется полярных метаболитов, но зато устраняются чрезвычайно реакционноспособные SH- и NH-группы.

Катехол-О-метилтрансферазы метаболизируют ряд эндогенных веществ: катехоламины (адреналин, норадреналин, дофамин), эстрагены; фенол-О-метилтрансфераза — тирозин, S-аденозилметилтрансферазы — триптофан, которые участвуют в нейрофизиологической регуляции, в том числе токсикокинетических процессов при стрессовых реакциях воздействия химического фактора.

На активность и скорость синтеза энзимов 1-й и 2-й фазы биотрансформации оказывают влияние многие факторы: генетический, пол, возраст, конституция, характер питания, курение, алкоголь, болезни, прием лекарственных средств, в условиях эксперимента — вид животного [Н. Н. Каркищенко, 2007]. Эти факторы определяют индивидуальные эффекты (например, ферментов Р450) при взаимодействии с ксенобиотиками у конкретных лиц.

Чувствительность к ряду токсикантов наиболее отчетливо проявляется у новорожденных и лиц пожилого возраста. Это связано с тем, что у новорожденных недостаточно развита система метаболизма ксенобиотиков, а в старческом возрасте наблюдается снижение клиренса ксенобиотиков, что повышает предрасположенность лиц этих групп к усилению токсического эффекта по сравнению с лицами молодого возраста.

Нарушение метаболизма ксенобиотиков печенью в старческом возрасте также может являться следствием уменьшения интенсивности печеночного кровотока, хронических патологических процессов в печени, связанных с возрастом.

У человека половые различия выражены не столь существенно, как у лабораторных животных. К воздействию окиси углерода, ртути, свинца, наркотическим и снотворным веществам более устойчивы самки животных, в то время как самцы устойчивее самок к ФОС, никотину, стрихнину, некоторым мышьяковистым соединениям. В процессе биотрансформации в организме могут образовываться еще более токсичные соединения, и именно они, в конечном счете, могут определять быстроту наступления, силу и последствия токсического эффекта.

Вторым фактором, определяющим неодинаковое реагирование животных разного пола на одни и те же яды, является биологическая специфика мужских и женских половых гормонов. Их роль в формировании устойчивости организма к вредным химическим агентам внешней среды подтверждается, например, таким фактом: у неполовозрелых особей различия в чувствительности к ядам между самцами и самками практически отсутствуют и начинают проявляться лишь при достижении ими половой зрелости.

Кроме основного (микросомального) пути, а также вышепредставленных реакций, осуществляемых цитозольными ферментами 2-й фазы биотрансформация, метаболизм ряда ксенобиотиков осуществляется с помощью прочих немикросомальных ферментов, вносящих весомый вклад в обезвреживание организма.

Ферментные системы немикросомального происхождения (алкогольдегидрогеназа, моно- и диаминооксидазы, цитозольная эпоксигидролаза, бутирилхолинэстераза, параоксоназа, ксантиноксидаза и др.), содержащиеся в растворимой фракции гомогенатов печени, почек, легких и других органов, участвуют в окислении, гидролизе и восстановлении многих токсических веществ [Т. В. Желобенко, Д. С. Сергеев [Электронный ресурс].

*Эстеразы и амидазы,* присутствующие в различных компонентах клетки и в плазме, катализируют гидролиз многих сложных эфиров и аминов. Так, карбоксилэстераза, ацетилхолинэстераза и бутирилхолинэстераза осуществляют гидролиз эфиров карбоновых кислот, амидов и тиоэфиров [J. A. Hinson, P. G. Forkert, 1995].

Ключевые *ферменты биогенных аминов моно- и диаминооксидазы* участвуют в реакции дезаминирования первичных, вторичных и третичных алифатических аминов.

*Пептидазы* участвуют в гидролизе амидной связи между аминокислотами в пептидах, в рекомбинантных пептидных гормонах, факторах роста, цитокинах, гидролизе растворимых рецепторов и моноклональных антител.

*Дегидрогеназы,* локализованные в митохондриях и цитозоле, участвуют в процессе дегидрирования ксенобиотиков (спирты, альдегиды, этилен гликоль, ароматические соединения) чаще всего в форме гидроксилирования (алкоголь и альдегиддегидрогеназы).

Реакции окисления спиртов и альдегидов из немикросомальных ферментов катализируют алкоголь- и альдегиддегидрогеназы. Алкогольдегидрогеназа (цитозольный фермент) — ключевой фермент катаболизма (окисления) спиртов до альдегидов [Клиническое значение [Электронный ресурс]. Обладает невысокой субстратной специфичностью. Под влиянием этого энзима метаболизируются не только первичные и вторичные алифатические

спирты, но и ароматические спирты, а также такие соединения, как р-нитробензиловый спирт и т.д. Уровень экспрессии фермента зависит от возраста. Цитозольный фермент алкогольдегидрогеназа (АДГ) включает 4 класса АДГ изоферментов:

— класс I АДГ (α-АДГ, β- АДГ и γ- АДГ) — окисление этанола и других алифатических спиртов небольших размеров;

— класс II АДГ (π-АДГ) (в печени ) — окисление более крупных алифатических и ароматических спиртов;

— класса III АДГ (χ-АДГ) — окисление длинноцепочечных алифатических спиртов (начиная от пентанола) и ароматических спиртов;

— класс IV АДГ (σ- или μ -АДГ) — окисление ретинола.

Физиологическая роль АДГ состоит в разрушении этилового спирта, который образуется в желудочно-кишечном тракте млекопитающих различными микроорганизмами. За сутки в кишечнике человека синтезируется около 1-1,5 г эндогенного (внутреннего) алкоголя, его содержание в крови равно приблизительно 0,034% [Ю. В. Буров, Н. Н. Ведерникова, 1985]. Альдегиддегидрогеназа осуществляет окисление альдегидов до карбоновых кислот.Разрушение этанола происходит в печени, где метаболизируется порядка 75% попавшего в организм алкоголя с помощью алкогольдегидрогеназы. Окисление этанола также осуществляется микросомальной этанолокисляющей системой ферментов семейства цитохрома Р450 (например, изофермента Р450 II Е1) [Н. П. Бочков и др., 2011; З. А. Шангареева и др., 2003]. Образуется ацетальдегид, являющийся очень реакционноспособным соединением, которое неферментативно может ацетилировать SH-, $NH_2$-группы белков и других соединений в клетке и нарушать их функции.

Ацетальдегид опосредованно активирует ПОЛ, так как, связывая SH-группы глутатиона, он снижает количество восстановленного глутатиона в клетке, который необходим для функционирования фермента глутатионпероксидазы, участвующей в катаболизме $H_2O_2$.

Развитие алкогольного поражения печени на фоне алкогольной интоксикации всего организма является следствием несостоятельности ферментативной системы биотрансформации ксенобиотиков, участвующей в метаболизме этанола. Кроме микросомального, окисление алкоголя в ацетальдегид происходит под влиянием перекиси водорода, которая образуется клетками печени [Т. В. Желобенко, Д. С. Сергеев [Электронный ресурс]. Этот путь обеспечивает метаболизм не более 5% этанола, находящегося в организме. Основные детоксикационные и другие процессы, в которых участвуют изофрменты АДГ, представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Интегральные характеристики процессов, протекающих с участием АДГ млекопитающих [Желобенко Т.В., Сергеев Д.С. [Электронный ресурс]

| Класс АДГ | Преимущественная локализация | Детоксикация эндогенных соединений | Детоксикация экзогенных соединений | Участие в катаболизме и синтезе эндогенных соединений |
|---|---|---|---|---|
| I | Печень. В других органах значительно меньше, нет в мозге | Ацетальдегид (при физиологических концентрациях этанола). Некоторые эндогенные алифатические и ароматические альдегиды | Этанол трансформируется (при поступлении извне). Трансформация ксенобиотиков, содержащих гидрокси- и альдегидные группы. Трансформация бензохинонов. Соединения, родственные метилазобензену | Катаболизм нейромедиаторов (норадреналина, серотонина). Синтез ретиноидов. Участие в метаболизме гидроксистероидов. Влияние на синтез холестерина, желчных кислот. |
| II | Печень. Нет в мозге | — | Более ограниченный спектр трансформируемых ксенобиотиков по сравнению с АДГI; бензохиноны | Катаболизм нейромедиаторов (норадреналина, серотонина); возможно участие в синтезе ретиноидов |
| III | В большинстве органов. Есть в мозге | формальдегид (окисление). Продукты пероксидации липидов. Некоторые эндогенные алифатические и ароматические альдегиды | | Участие в переносе одноуглеродных фрагментов; возможно участие в метаболизме омега-гидрокси-жирных кислот стероидов, ретиноидов |
| IV | Слизистая желудка, глаза | Сходно с АДГI | Сходно с АДГI | синтез ретиноидов (участие в большей мере, чем АДГI) |

Ацетилирование ядерных, цитоплазматических ферментов и структурных белков приводит к снижению синтеза экспортируемых печенью в кровь белков, например альбумина.

Нарушение функций альбумина в сочетании с повреждающим действием ацетальдегида на мембраны сопровождается поступлением в клетки по градиенту концентрации ионов натрия и воды, происходит осмотическое

набухание этих клеток и нарушение их функций.

Фермент *глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа* (Г-6-ФД, G6PD) играет критическую роль в образовании и поддержании NADPH [Недостаточность Г-6-ФД [Электронный ресурс].

Недостаточность Г-6-ФД в эритроцитах человека обусловливает блокирование первого этапа обмена глюкозо-6-фосфата в пентозном цикле, в результате чего уменьшается количество восстановленных нуклеотидов (НАДФ2 и НАДН2), а также восстановленной формы глутатиона, что способствует окислительному стрессу и дестабилизации мембран эритроцитов.

Низкий уровень или отсутствие активности G6PD может привести к тяжелому гемолизу, вызванному лекарствами или ксенобиотиками из-за отсутствия нормального уровня восстановленного глутатиона в эритроците.

Установлено, что тиозосульфон вызывает два типа распространения гемолитической анемии среди популяций, проходивших курс лечения. Индивидуумы с дефицитом G6PD и медленной ацетиляцией как минимум в 40 раз более восприимчивы к гемолизу, вызванному тиозосульфоном, чем индивидуумы с нормальным уровнем G6PD и быстрой ацетиляцией.

В обзорном докладе Т. А. Невзоровой «Биохимия ядов» отмечено, что из немикросомальных ферментов *дегидродиолдегидрогеназа* участвует в окислении ПАУ, молибденовые гидроксилазы — альдегидоксидаза и ксантиндегидрогеназа/ксантиноксидаза, сульфитоксидаза — окисляют токсичный сульфит до относительно безопасного сульфата.

*Ксантиндегидрогеназа* и *ксантиноксидаза* участвуют в процессах, связанных с оксидативным стрессом, пероксидном окислении липидов. Альдегидоксидаза — в пероксидном окислении липидов, катаболизме биогенных аминов и катехоламинов. Моноаминоксидаза – в окислительном дезаминировании первичных, вторичных и третичных аминов, включая серотонин. Флавинмонооксигеназа окисляет нуклеофильный азот, серу и фосфор в молекулах ксенобиотиков.

*Пероксидазы.* Обширная группа пероксидаз участвует в разрушении перекиси водорода и других перекисей, превращая их в воду и спирты [В. П. Саловарова и др., 2007].

В ходе этих реакций возникают побочные продукты, обладающие окислительными свойствами, способные взаимодействовать с такими химическими веществами, как ароматические амины, фенолы, гидрохиноны, алкены, полициклические ароматические углеводороды. Они осуществляют прямой перенос пероксидного кислорода к ксенобиотику, участвуют в окислении аминов или фенолов пероксидом водорода с образованием

свободных радикалов, в превращении ксенобиотиков в токсичные метаболиты.

Простагландин-Н-синтетаза активирует образование простагландинов (гидроперекисей жирных кислот) из арахидоновой кислоты.

В ходе последующего восстановления гидроперекисей окисляются другие субстраты и среди них ксенобиотики. Этот механизм (кооксидация) может лежать в основе метаболизма целого ряда чужеродных соединений, особенно в тканях с низкой активностью Р-450 (мозговом слое почек, эндотелии мочевого пузыря и т.д.).

*Эпоксидная гидролаза* обеспечивает детоксикацию преимущественно эпоксидов, образующихся на предшествующих стадиях биотрансформации [С. К. Абилев, 2012]. Присоединяет воду к эпоксидам алкенов и оксидам аренов.

Эпоксидгидролаза гидролизует связь углерод — кислород в оксирановом кольце. Ранее она называлась эпоксидгидразой или эпоксидгидратазой.

Известно 5 форм эпоксидгидролазы: холестериновая, лейкотриеновая, гепоксилиновая, микросомальная и растворимая. Две последние участвуют в метаболизме ксенобиотиков. Из этих двух форм фермент EPHX1– это микросомальная эпоксидгидролаза, которая описана ранее, а EPHX2 — цитозольная эпоксидгидролаза. Изоформа EPHX2 имеет молекулярную массу 62 кД, состоит из 534 аминокислотных остатков [Клиническая фармакокинетика..., 2009].

Эпоксидгидролаза играет важную роль в детоксикации эпоксидов, образовавшихся на первом этапе биотрансформации ПАУ, афлатоксинов и других соединений. Низкая ее активность повышает риск возникновения рака легких у курящих, карциномы печени — среди людей, контактирующих с афлатоксинами. Высокая активность этого фермента снижает риск развития рака легких, однако ассоциируется с развитием рака яичников [С. К. Абилев, 2012].

Практически все эпоксисоединения (окиси алкенов — соединения XX, окиси аренов — XXI и эпоксидиолы — XXII), относящиеся к ксенобиотикам, формируются в биологических системах в процессе катализа CYP450. Эти реакции относятся к одному из случаев нуклеофильного замещения, в котором уходящая группа (кислород окисного кольца) является частью молекулы, претерпевшей замещение. При раскрытии эпоксидных циклов в водном растворе в присутствии кислоты образуются 1,2-гликоли.

Водорастворимая эпоксидгидролаза EPHX2 гидрирует широкий спектр эпоксидов, но не циклические системы [Генетический паспорт., 2009]. Промежуточные метаболиты могут связываться с нуклеиновыми кислотами, поражая геном и запуская процессы мутагенеза и канцерогенеза.

*Бутирилхолинэстераза.* Детоксическая функция бутирилхолинэстеразы проявляется при воздействии многих лекарственных и токсических веществ [И. Д. Курдюков и др., 2012; Е. В. Рудакова, 2014].

Экспрессия обнаружена во всех клетках (кроме эритроцитов). Наиболее высокие концентрации БХЭ определяются в коже, печени, легких, тонком кишечнике, что свидетельствует об участии БХЭ в детоксикации токсинов, поступающих в организм с пищей или воздухом.

БХЭ гидролизует аспирин, сукцинилхолин, мивакуриум, героин; превращает пролекарство CPT-11 (иринотекан) в активный противоопухевый препарат SN-38.

БХЭ стехиометрически связывается с ФОВ, что препятствует их воздействию на АХЭ вследствие быстрого взаимодействия ФОВ с БХЭ с последующим «старением» фосфонилированного фермента. Профилактическое введение животным БХЭ значительно повышает их выживаемость при действии летальных доз ФОВ.

Помимо ФОС и ФОВ, ингибиторами БХЭ и других сериновых эстераз являются фенилметилсульфонилфторид и фторид натрия.

Низкая активность БХЭ может стать причиной неблагоприятных эффектов гуперзина А и донепезила, применяемых при лечении болезни Альцгеймера. Дефицит БХЭ также связан с повышенной чувствительностью к фосфорорганическим пестицидам и отравляющим веществам.

Встречается повышенная активность БХЭ (в 2-3 раза) при нормальном уровне белка, так называемый Йоханнесбургский вариант, носители которого чрезвычайно устойчивы к действию сукцинилхолина. Поскольку в cDNA мутаций не выявлено, предполагается наличие мутации в области энхансера.

Мутантный фермент с низкой аффинностью может стать причиной летального исхода при введении миорелаксанта сукцинилхолина. Склонность к так называемому сукцинилхолиновому апноэ передается по наследству.

*Карбоксилэстеразы.* Карбоксилэстеразы катализируют реакции гидролиза разнообразных эфирных соединений — водорастворимых субстратов [Н. П. Бочков и др., 2011; Е. В. Рудакова, 2014; Е. А. Шестеренко и др., 2013].

Карбоксилэстеразы млекопитающих (КЭМ) подразделяются на 5 основных групп (КЭМ1—КЭМ5) в соответствии с гомологией аминокислотной последовательности. КЭ локализованы в цитозоле и микросомах различных тканей, в меньшей степени находятся в периферической крови. Максимальный уровень экспрессии КЭ обнаружен в микросомах печени.

Основная биологическая роль КЭ млекопитающих заключается в метаболизме ксенобиотиков. Широкая субстратная специфичность карбоксилэстераз определяет возможность клетки метаболизировать

ароматические и алифатические эфиры, фосфорорганические инсектициды, ФОВ и др.

Энзим расщепляет сложноэфирные, амидные и тиоэфирные связи широкого спектра соединений, отличающихся по химической структуре. Фермент ингибируется аналогами паратиона — хлортионом, диазиноном, систоном и фоздрином.

КЭ участвуют в трансформации холестерола и жирных кислот в печени и периферических тканях; контролируют липолиз, при этом гидролиз эфиров холестерина предотвращает их накапливание в макрофагах человека и таким образом снижает риск развития атеросклероза и метаболического синдрома.

КЭ влияет на липотоксичность и проявления сахарного диабета.

КЭ человека (а также гомологи у других млекопитающих) участвуют в синтезе тестостерона и метаболизме ретинола. КЭ участвуют в транспортировке и удерживании протеинов в эндоплазматическом ретикулуме.

Карбоксилэстеразы связываются с С-реактивным протеином и удерживают этот протеин до его высвобождения в цитоплазму, а также связываются в эндоплазматическом ретикулуме с Р-глюкуронидазами — энзимами второй фазы метаболизма ксенобиотиков.

Благодаря широкой субстратной специфичности и высокой стереоселективности КЭ являются перспективными биокатализаторами энантиоселективного гидролиза и синтеза обширного ряда ациклических, карбоциклических и гетероциклических соединений.

Большинство идентифицированных в настоящее время КЭМ принадлежит к семейству КЭМ1 или КЭМ2. Они, в свою очередь, разделены на пять подсемейств. Семейство КЭМ1 включает основные формы изоэнзимов карбоксилэстеразы млекопитающих. Большинство членов этого семейства экспрессируются в печени.

К семейству КЭМ1А принадлежат основные формы карбоксилэстеразы человека, обезьян и кроликов, к подсемействам КЭМ1В —основные изоформы карбоксилэстеразы крыс, хомяков, мышей, а к КЭМ1С —собак, кошек и свиней. КЭМ1 гидролизует преимущественно эфиры с короткой спиртовой и длинной ацильной группой, КЭМ2 — эфиры с длинной спиртовой и короткой ацильной группой.

Например, КЭМ1 гидролизует кокаин с образованием бензоилэкгонина и метанола, а КЭМ2 — с образованием бензойной кислоты и метилового эфира экгонина. КЭМ1 катализирует реакции трансэстерификации: например, ее ацилтрансферазная активность способствует образованию эфиров холестерина из жирных ацил-КоА производных и свободного холестерина [В.

И. Шмурак и др., 2012]. КЭМ1 гидролизует меперидин (демерол) с образованием неактивных продуктов, активирует пролекарства капецитабин, темокаприл, циклезонид.

В семейство КЭМ2 входят карбоксилэстеразы человека (КЭМ2А1), крыс (КЭМ2А10), мышей (КЭМ2А8), экспрессирующиеся преимущественно в тонком кишечнике. КЭМ1 и КЭМ2 совместно осуществляют детоксикацию пиретроидных инсектицидов. КЭМ2 гидролизует пролекарство CPT-11 (иринотекан) с образованием активного противоопухолевого препарата SN-38, ингибирующего топоизомеразу I.

Семейство КЭМ3 человека имеет около 40% идентичности аминокислотной последовательности как с КЭМ1, так и с КЭМ2 и экспрессируется в печени и ЖКТ. К этому семейству относится карбоксилэстеразоподобный протеин (КЭМ4А2), который экскретируется с мочой. В семейство КЭМ5 входят изоэнзимы КЭМ, имеющие иную структуру по сравнению с изоформами других семейств КЭМ.

Следует отметить, что КЭ имеют много общих субстратов (нитрофенилацетат, нафтилацетат, иринотекан, кокаин и др.) и ингибиторов (диизопропилфторфосфат, тетраизопропилпирофосфорамид, параоксон, ФОВ, крезилбензодиоксафосфориноксид и др.) с БХЭ. Отличие между ними состоит в том, что БХЭ лучше взаимодействует с положительно заряженными соединениями (экотиопат, VX, бутирилтиохолин), а КЭ — с нейтральными.

*Параоксоназа* — это арилэстераза, способная инактивировать антихолинэстеразное средство параоксон [В. Г. Кукес, 2004; И. Д. Курдюков и др., 2012; И. Д. Курдюков, Я. А. Дубровский и др., 2012], найдена в тканях у млекопитающих, в плазме и сыворотке крови человека. Содержание свободной параоксоназы в плазме крови в несколько раз превосходит количество фермента в органах и тканях.

Из известных 3 изоформ фермента наибольшее значение имеет PON-1. Впоследствии название параоксоназа закрепилось за целым семейством ферментов, несмотря на то, что параоксоназа-3 обладает очень низкой параоксоназной активностью, а PON-2 ею не обладает.

Параоксоназа не имеет естественных субстратов или функций, но использует такие субстраты как карбоксильные эфиры, карбаматы и органические фосфаты и паратион, которые могут быть причиной отравлений.

PON-1 инактивирует ФОС, органофосфаты, карбаматы, эфиры уксусной кислоты, БОВ (зарин, зоман, табун). Параоксоназа является слабой защитой при сильном воздействии паратионом, но при повторяющемся низком уровне воздействия эта система дает преимущество по сравнению с неизменной постоянной системой холинэстераз в тканях, подверженных воздействию.

PON-1 человека является кальций-зависимым ферментом: имеет два металлсвязывающих центра. Это так называемая «гистидиновая диада» — сопряжённый комплекс остатков His115 и His134, благодаря чему His115 способен депротонировать молекулу воды. Образующийся гидроксильный радикал атакует молекулу субстрата и вызывает её гидролиз. «Каталитический» ион кальция в этом процессе стабилизирует образующийся интермедиат, а другой ион кальция необходим для проявления каталитической активности белка.

Помимо шести участков β-складчатости, в молекуле фермента имеется 3 α-спиральных домена. Два из них богаты гидрофобными остатками аминокислот (лейцина, пролина, фенилаланина и др.), что позволяет им играть роль своеобразного якоря для закрепления молекулы фермента на поверхности частиц липопротеинов высокой плотности.

Физиологической функцией PON-1 является гидролиз гомоцистеинтиолактона, что предотвращает гомоцистеинилирование белков и предупреждает развитие атеросклероза. PON-1 гидролизует и другие эндогенные и природные лактоны. Существует в двух формах — свободной и мембраносвязанной. Обладает антиоксидантными и антиатерогенными свойствами, препятствуя окислению липидов в ЛПНП путем их гидролиза, дифференцировке моноцитов в макрофаги, захвату макрофагами окисленных ЛПНП и превращению макрофагов в пенистые клетки. В организме PON1 тесно связана с комплексом липопротеидов высокой плотности. Антиатерогенные свойства ЛПВП зависят частично от антиоксидантной активности параоксоназы 1, ассоциированной с апобелками ЛПВП (апо A-I и апо J).

Реакции восстановления, катализированные немикросомальными ферментами, включают: восстановление сульфидов в меркаптаны; гидроксамовых кислот в амиды; N-оксидов в амины; дегидроксилирование ароматических или алифатических гидроксилпроизводных, а также восстановление хинонов, азо- и нитросоединений, алкенов, некоторых металлов, и других соединений.

### 3.3 Третья фаза биотрансформации ксенобиотиков

В настоящее время особо выделяет третью фазу биотрансформации: так называемую фазу эвакуации, в которой основную роль отводят специфическим транспортным системам — специфическим белкам [Н. Н. Каркищенко, 2007; В. Г. Кукес и др., 2007].

Транспортеры 3-й фазы присутствуют во многих тканях, включая печень, кишечник, почки и мозг, где обеспечивают барьер против проникновения

ксенобиотиков. Они играют важную роль в регуляции абсорбции, распределения и экскреции многих лекарств и других ксенобиотиков, участвуют в выведении вновь образованных продуктов 2-й фазы биотрансформации из клетки. Транспортные белки также препятствуют всасыванию ксенобиотиков в кишечнике.

Наиболее изученными среди этих транспортеров являются члены семейства аденозинтрифосфатов — АТФ-связывающие кассетные транспортеры (ABC-транспортеры).

Из 48 белков человека ABC-транспортеров важнейшим является Р-гликопротеин, участвующий в экскреции ксенобиотиков (в желчь, кровь), который действует как трансмембранная помпа, удаляющая лекарственные средства и другие ксенобиотики из клеточной мембраны и цитоплазмы.

P-gp использует энергию, перенесенную из гидролиза АТФ, для удаления широкого ряда химических соединений, включая большое число клинически используемых лекарств.

Особенно важную роль данный пептид играет в эндотелиальных клетках капилляров головного мозга, регулируя поступление ксенобитиков (ЛС) из крови в паренхиму головного мозга, а также в субапикальной части клеток эпителия сосудистых сплетений желудочков головного мозга, где он участвует в элиминации токсических продуктов метаболизма из крови в цереброспинальную жидкость [И. С. Полякова и др., 2011; I. Cascorbi et al., 2001].

При нарушении работы Р-гликопротеин опосредованного транспорта продуктов метаболизма недостаточность выведения метаболитов в условиях мощного оксидантного стресса создает условия для накопления и токсического воздействия ксенобиотиков на структуры головного мозга.

Кроме того, показано, что P-gp используются раковыми клетками в качестве защиты от химиотерапевтических препаратов [K. G. Chen, B. I. Sikic, 2012].

Транспортеры органических анионов, катионов представляют собой трансмембранные белки, ответственные за перенос через мембрану эндогенных веществ и ксенобиотиков с различными химическими свойствами, в том числе ЛС и их метаболитов, общее свойство которых — гидрофильность.

Данные транспортеры участвуют в абсорбции, распределении и выведении из организма лекарственных средств и других ксенобиотиков, функционируя в тесной связи с ферментами биотрансформации [В. Г. Кукес и др., 2007].

Как отмечено ранее (гл. 2.2), транспортеры органических анионов формируют суперсемейство $N^+$-независимых транспортных систем и представлены двумя семействами: переносчиков анионов — OAT (organic anion-transporters) и органических анион-транспортирующих полипептидов — OATP (organic anion-transporting polypeptides).

ОАТ-транспортеры структурно отличаются от ОАТР. Различаются оба семейства и субстратами: ОАТР переносят органические анионы с более крупными и более гидрофобными молекулами, тогда как ОАТ — более мелкие и гидрофильные.

Функциональный механизм ОАТ состоит в обмене α-кетоглутарата на органические анионы через мембрану, который осуществляется за счет непрямого сцепления с градиентом натрия, поддерживаемым Na-K-АТФ-зой [S. R. Vavricka et al., 2002].

Многие из ОАТ принимают большое участие в функционировании почек. ОАТР экспрессируются в печени, почках, головном мозге и кишечнике, играя важную роль в регуляции биодоступности и распределении ксенобиотиков в организме, главным образом в гепатоцитах при их выведении в желчь. Субстратами ОАТР являются многие органические вещества, включая стероидные конъюгаты, тиреоидные гормоны, пептиды и ксенобиотики. ОАТР отвечают за фармакокинетику ряда ЛС.

Суперсемейство транспортёров органических катионов представлено одним семейством — ОСТ. ОСТ, как ОАТ и ОАТР, обнаруживают в печени, почках, головном мозге и кишечнике, где участвуют во всасывании, распределении и в выведении ксенобиотиков и эндогенных метаболитов.

В проксимальных почечных канальцах ОСТ играют наибольшую роль в активной секреции гидрофильных эндогенных и экзогенных соединений в мочу.

К субстратам транспортёров органических анионов и катионов относят ряд широко применяемых ЛС, включая β-лактамные антибиотики, диуретики, нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), противовирусные и противоопухолевые средства, ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы (статины).

Кроме транспортёров органических анионов и катионов, во всасывании, в распределении и выведении ЛС и других ксенобиотиков могут принимать участие и другие транспортёры (транспортёры системы олигопептидов, нуклеозидов, транспортёры множественной лекарственной устойчивости и т.д.).

### 3.4 Воздействие ксенобиотиков на процессы биотрансформации

Решающее значение в процессах детоксикации и развития токсического эффекта имеют свойства ксенобиотиков (включая ЛС), влияющих на активность энзимов биотрансформации и транспортёров [В. Д. Кукес и др., 2007; Клиническая фармакокинетика..., 2009; В. В. Ляхович, И. Б. Цирлов, 1981; Медицинские проблемы [Электронный ресурс].

Существует три основных вида формирования токсических эффектов химическими агентами, которые связаны с процессами биотрансформации:

ксенобиотики делятся на не влияющие на активность энзимов метаболизма, ингибиторы и индукторы.

Одно и то же вещество может выступать как индуктор и как ингибитор метаболизма другого вещества, в зависимости от того в каком порядке ксенобиотики поступают в организм — сукцессии или комбинации.

В настоящее время описано более 250 химических соединений, вызывающих индукцию микросомальных ферментов.

Индукторами процессов биотрансформации являются хлорорганические пестициды; полициклические углеводороды, диоксины, этиловый и другие спирты; никотин; ионы некоторых тяжелых металлов, барбитураты, кетоны, некоторые стероиды и другие вещества.

Несмотря на разнообразие химического строения, все индукторы имеют ряд общих признаков; их относят к числу липофильных соединений, и они служат субстратами для ферментов биотрансформации. Чаще всего имеют длительный период полувыведения.

Индукция ферментов биотрансформации ведёт к ускорению биотрансформации и, как правило, к снижению активности ксенобиотика. Индукция транспортёров может приводить к различным изменениям концентрации химического вещества в плазме крови, в зависимости от функций данного транспортёра. Один и тот же индуктор может повышать активность фермента или транспортёра у различных индивидуумов в 15-100 раз.

Многочисленные индукторы монооксигеназных систем можно отнести к одному из двух классов. Представители первого класса (барбитураты, некоторые лекарства и инсектициды) вызывают выраженную пролиферацию гладкого эндоплазматического ретикулума в гепатоцитах и увеличение активности цитохрома Р450.

В результате возрастает мощность таких процессов, как деметилирование ксенобиотиков (нитроанизол), гидроксилирование (барбитураты), эпоксидирование (альдрин).

Некоторые индукторы способны специфично активировать отдельные изоформы Р-450. К числу таковых относятся, в частности, прегненолол-16а-карбонитрил (ПКН), активирующий 3А1 изоформу Р450, этанол, индуцирующий 1А2 изоформу Р-450, клофибрат — 4А изоформу.

Стимуляция метаболизма, вызываемая индукторами второго класса (ПАУ — 3-метилхолантрен, бенз(а)пирен; диоксины и др.), не сопровождается пролиферацией гладкого эндоплазматического ретикулума, но при этом существенно возрастает активность Р450, УДФГ-трансферазы, глутатионтрансфераз, гидроксиолаз. Самым сильным из известных

индукторов монооксигеназ является диоксин ТХДД.

Ксенобиотики, как правило, вызывают индукцию более чем одной ферментативной системы (барбитураты, полигалогенированные бифенилы и др.): Р450, УДФГТ, GST и др. Кроме того, индукция того или иного энзима, вызванная разными индукторами, не одинаково сказывается на скорости метаболизма различных ксенобиотиков.

Зачастую усиление метаболизма ксенобиотиков приводит к снижению их токсичности. Так, повторное введение фенобарбитала белым крысам самцам приводит к увеличению резистентности животных примерно в полтора раза к таким высоко токсичным ФОС, как зарин, зоман, ДФФ и др. Понижается чувствительность экспериментальных животных к цианидам.

Вместе с тем токсичность других веществ под воздействием индукторов существенно возрастает. Например, усиливается гепатотоксическое действие алкалоида монокротолина и циклофосфамида, канцерогенная активность 2-нафтиламина.

Вследствие индукции усиливается также токсичность четыреххлористого углерода, бромбензола, иприта и др.

Последствием индукции также может быть изменение соотношения интенсивности метаболизма ксенобиотиков в разных органах и тканях, в результате чего основным органом-мишенью биопревращения ксенобиотика — индуктора у экспериментального животного – становится иной орган, чем у животных, их не получавших. Так, после введения крысам 3-метилхолантрена (индуктора) основным органом метаболизма 4-ипомеанола (токсичный дериват фурана) становятся не легкие, а печень.

Индукторы из группы производных барбитуровой кислоты способны одновременно активировать синтез одних изоферментов (например, цитохромР450зависимых оксидаз) и угнетать активность других. В этой связи трудно предсказать последствия влияния индукторов на токсичность ксенобиотиков.

У человека индукция микросомальных ферментов нередко становится следствием различных привычек (курение, прием алкоголя и т.д.), профессионального и экологического контакта с веществами (ПАУ, органические растворители, диоксины, галогенированные инсектициды и т.д.), длительного приема некоторых лекарств (барбитураты, антибиотики типа рифампицин и т.д.).

Некоторые химические вещества способны ингибировать как ферменты 1-й (изоферменты цитохрома Р-450) и 2-й фаз биотрансформации (N-ацетилтрансфераза и др.), так и транспортёры. При снижении активности ферментов метаболизма возможно развитие побочных эффектов, связанных

с длительной циркуляцией этих соединений в организме.

Ингибирование транспортёров, как и их индукция, может приводить к различным изменениям (преимущественно к повышению) концентрации ксенобиотиков в плазме крови в зависимости от функций данного транспортёра.

Токсические факторы, оказывающие ингибирующее влияние на ферменты окислительных систем микросом, тормозят метаболизм ряда лекарственных средств и других ксенобиотиков, что приводит к усилению и удлинению их фармакологического эффекта, способствует проявлению отрицательного действия на организм. К ингибиторам метаболических процессов относятся оксид углерода, фенолы, бензол, соединения тяжелых металлов, особенно свинца, никеля, кадмия, ртути, цинка, мышьяка [102].

Ксенобиотики — ингибиторы метаболизма подразделяются на следующие группы [В. Г. Кукес, 2004]:

— конкурентные ингибиторы ферментов (альтернативные субстраты). Вещества, обладающие высоким аффинитетом (сродством) к определённым изоферментам, например цитохрома Р-450, ингибируют биотрансформацию с более низким аффинитетом к этим изоферментам. В частности, этиловый спирт — ингибитор метаболизма метанола или этиленгликоля; никотинамид — угнетает N-деметилирование аминопирена и т.д.;

— неконкурентные ингибиторы. Происходит прямая инактивация изоферментов. Это, как правило, алкилирующие агенты, угнетающие активность энзима, но не конкурирующие с субстратом;

— «суицидные ингибиторы» — вещества, образующиеся в процессе метаболизма ксенобиотика при участии данного фермента и одновременно являющиеся его ингибиторами;

— реакционноспособные промежуточные метаболиты, ингибирующие активность энзимов нескольких типов в месте их образования — метаболиты четыреххлористого углерода, дихлорэтана и т.д.;

— ингибиторы синтеза кофакторов и простетических групп энзимов.

К числу таких относятся, например, кобальт, блокирующий синтез гема, являющегося простетической группой цитохромР450зависимых оксидаз; вещества истощающие запасы глутатиона в клетках.

По способу влияния продуктов биотрансформации на органы(системы)-мишени ксенобиотики классифицируются в виде 3 групп. В первую группу входят вещества, органами-мишенями которых являются сами органы, где происходят метаболические процессы (табл. 3.6).

Таблица 3.6 − Ксенобиотики, вызывающие токсический эффект в органе, осуществляющем его биотрансформацию [Куценко С.А., 2004]

| Химическое соединение | Орган-мишень | Энзимы | Метаболиты | Эффект |
|---|---|---|---|---|
| Ароматические амины:<br>бензидин<br>нафтиламин | мочевой пузырь<br>печень | ПО, NAT, СТ,<br>Р-450 | диимины<br>свободные радикалы | канцерогенез |
| Арилгидроксамовые кислоты:<br>Ацетаминофлюорен | Печень | Р-450, СТ | N,O-сульфэфиры | канцерогенез |
| Биспиридины:<br>паракват, дикват | легкие<br>печень | ФПР | свободные радикалы | повреждение органа |
| Фураны:<br>3-метилфуран | легкие<br>печень<br>почки | Р-450 | эпоксиды | повреждение органа |
| Галогенсодержащие ароматические соединения:<br>бромбензол, ПГБФ<br>хлорбензол | легкие<br>печень<br>почки | Р-450 | ареноксиды<br>хиноны | повреждение органа |
| Галогеналканы:<br>а) галотан,<br>$CCl_4$<br>б) $CHCl_3$<br>трихлорэтан<br>в) дихлорэтан<br>дибромэтан | легкие<br>печень<br>почки | Р-450 | радикалы | повреждение органа |
| | печень<br>почки | Р-450 | ацилгалогены | повреждение органа |
| | легкие<br>кишечник<br>яички | GST | ионы эписуль-фониума | канцерогенез |
| Галогеналкены:<br>дихлорэтилен<br>трихлорэтилен | легкие<br>печень<br>почки | Р-450 | ацилгалогены<br>альдегиды<br>эпоксиды | повреждение органа,<br>канцерогенез |
| ПАУ:<br>бенз(а)пирен | легкие<br>кожа<br>молочная железа | Р-450<br>ПО, ЭГ | ареноксид<br>хиноны | повреждение органа,<br>канцерогенез |
| Пирролины:<br>монокроталин | Печень | Р-450 | пирролы | канцерогенез |
| Сульфтионовые соединения:<br>тиоацетамид<br>сероуглерод | печень<br>легкие | Р-450<br>ФМО | S-оксиды<br>S,S-диоксиды<br>атомарная сера | канцерогенез<br>повреждение органа |
| Нитроароматические соединения:<br>нитрофурантион | легкие<br>печень | ФПР | радикалы | повреждение органа |

Примечание. ПО – пероксидаза, NAT – амин-N-ацетилтрансфераза, СТ – сульфотрансфераза, ФМО – флавинсодержащие монооксигеназы, ФПР – флавопротеинредуктаза, ЭГ – эпоксигидраза.

Ко второму типу относятся ксенобиотики, первично метаболизируемые в органе (печени), который не в состоянии биотрансформировать этот исходный

токсикант в реакционноспособный метаболит.

Однако в других органах-мишенях может происходить биоактивация его первичных промежуточных продуктов (химически инертных) во вторичные метаболиты, которые обладают реакционной способностью, достаточной для того, чтобы вызывать повреждение органа, в котором они образуются (табл. 3.7).

Таблица 3.7 – Ксенобиотики, вызывающие токсический эффект вторичными метаболитами его биотрансформации, образуемыми в других органах-мишенях [Куценко С.А., 2004]

| Химические соединения | Первичный метаболит | Орган-мишень (энзимы) | Токсичный метаболит | Эффект |
|---|---|---|---|---|
| Ароматические углеводороды: бензол | фенол, гидрохиноны, катехолы | клетки костного мозга (МП) | Хиноны | повреждение клеток |
| Галогеналканы: гексхлорбутадиен | конъюгат глутатиона | почки (ГТП, ДП, Л) | тионацил-галоиды тиокетоны | повреждение органа |
| Нитроароматические соединения: 2,6-динитротолуол | динитробензиловый спирт глюкурониды | печень (Р-450, СТ) | Гидроксиламины, S-эфиры | канцерогенез |

Примечание. ГТП – γ-глутамилтранспептидаза, ДП – дипептидаза, Л –β-лиаза, МП – миелопероксидаза.

Обязательным этапом метаболизма данного вещества является превращение его метаболитов в других органах, например, в кишечнике.

Орган-мишень содержит энзимы, отсутствующие в печени, например, энзимы катаболизма конъюгатов глутатиона (почки), пероксидазы (почки, лейкоциты, костный мозг), некоторые подтипы цитохром Р-450.

Третья группа — химические соединения, вызывающие повреждение органов и тканей, которые либо вообще не участвуют, либо участвуют в минимальной степени в биоактивации ксенобиотиков (табл. 3.8).

Органами-мишенями могут быть и периферические нервные стволы, практически не содержащие энзимы метаболизма ксенобиотиков, и легкие, отличающиеся достаточно высокой метаболической активностью, и др.

Общим между ними является то, что они не в состоянии метаболизировать конкретное химическое вещество, вызывающее их повреждение.

Основой для развития токсического процесса являются: поступление большого количества метаболита с притекающей кровью, активный захват метаболитов, недостаточность механизмов детоксикации, высокая чувствительность клеток органа к метаболиту, недостаточность механизмов репарации повреждений.

Энзимы, участвующие в окислении ксенобиотиков, выявляются также в

митохондриях и растворимой фазе цитозоля. Процесс дегидрирования ксенобиотиков проходит в организме чаще в форме гидроксилирования.

Таблица 3.8 – Ксенобиотики, при биотрансформации которых образуются метаболиты, не подвергающиеся биотрансформации в других органах-мишенях [Куценко С.А., 2004]

| Химические соединения | Орган биоактивации (энзимы) | Метаболиты | Орган-мишень | Эффект |
|---|---|---|---|---|
| Алканы: Гексан | печень (Р450, АДГ) | 2,5-дикетоны | нервные стволы | повреждение органа |
| Ароматические амины: α-нафтиламин | печень (Р450, ФМО, УДФГТ) | N-глюкурониды | эпителий мочевого пузыря | канцерогенез |
| Гликоли: Этиленгликоль | печень (АДГ, АлДГ) | оксалат | почечные канальцы | повреждение органа |
| Галогеналкены: Винилхлорид | гепатоциты (Р450) | эпоксид | эндотелий сосудов печени | канцерогенез |
| Гидразины: диметилгидразин | гепатоциты (Р450) | диазометан | эндотелий сосудов печени | канцерогенез |
| N-нитрозамины: диметилнитрозамин | гепатоциты (Р450) | α-гидрокси-n-нитрозамины | эндотелий сосудов печени | канцерогенез |
| Пирролины: пирролизидиновые алкалоиды | печень (Р450) | пирролы | эндотелий сосудов легких | повреждение органа |

Примечание. АДГ – алкогольдегидрогеназа, АлДГ – альдегиддегидрогеназа.

Среди прочих веществ такому превращению подвергаются многочисленные спирты и альдегиды (при участии алкоголь- и альдегиддегидрогеназ). Благодаря высокой активности этих энзимов, печень — основной орган метаболизма спиртов. Энзимы идентифицированы также в почках и легких.

Ферменты, метаболизирующие ксенобиотики, функционируют амбивалентно: по типу детоксикации или метаболической активации [С. К. Абилев, 2012].

В большинстве случаев липидорастворимые химические вещества превращаются в более легко выделяемые из организма водорастворимые метаболиты (детоксикация).

Однако во многих случаях одни и те же ферменты способны трансформировать другие инертные химические вещества в молекулы с высокой реакционной активностью. Эти промежуточные молекулы могут впоследствии взаимодействовать с такими клеточными макромолекулами как

белки и ДНК.

Иногда в результате конъюгации и других метаболических процессов организм может «ошибаться» и сам синтезировать яд (соединение более токсичное, чем исходное).

Процесс превращения биологически малоактивных веществ в высокотоксичные или соединения, индуцирующие канцерогенез, мутагенез и т.д., называют метаболической активацией (токсификацией).

Примером может служить метаболизм метилового спирта, токсичность которого определяется продуктами его окисления — формальдегидом и муравьиной кислотой.

Еще один пример летального синтеза связан с метаболизмом известного инсектицида паратиона (тиофоса), когда происходит замещение атома серы на атом кислорода, в результате которого образуется параоксон — вещество более токсичное, чем тиофос.

Только блокада «летального» метаболического превращения может предотвратить развитие этой «токсической травмы».

В случае химических мутагенов биотрансформация может существенно менять уровень их конечных генетических эффектов.

Установлено, что канцерогенные и мутагенные свойства большинства ПАУ связаны с их превращением в активные метаболиты.

Например, немутагенный бенз(а)пирен в организме окисляется с образованием эпоксидов (ареноксидов) — высокоактивных электрофильных соединений, которые легко образуют ковалентную связь с нуклеофильными центрами биомакромолекул.

Ареноксиды бенз(а)пирена в свою очередь служат субстратом для другого микросомного фермента — эпоксидгидратазы, катализирующей гидратацию эпоксидов в соответствующие дигидроксиды.

Из 7,8-дигидроксида под действием гидроксилазы вновь образуется эпоксид (7,8-дигидрокси 9,10-эпоксид) бенз(а)пирена, который считается главным канцерогенным метаболитом и наиболее реакционноспособным соединением. Из углеводородов винилхлорид обладает наибольшим канцерогенным и мутагенным действием на животных и человека.

В организме он окисляется микросомными монооксигеназами и превращается в эпоксид — хлорэтиленоксид, из которого путем внутримолекулярной перестройки образуется хлорацетальдегид [H. M. Bolt, 1986]. Тот, в свою очередь, связываясь с глутатионом, трансформируется в S-формилметилглутатион или окисляется альдегиддегидрогеназой до хлоруксусной кислоты.

Из всех метаболитов винилхлорида наибольшую мутагенную активность

проявляет хлорэтиленоксид. Воздействие ариламинов представляет серьезный риск рака мочевого пузыря.

Имеется чрезвычайно высокая корреляция между фенотипом с медленной ацетиляцией и частотой рака мочевого пузыря, а также степенью инвазивности этого вида рака в стенку мочевого пузыря. И наоборот, имеется значительная ассоциация между фенотипом с быстрой ацетиляцией и частотой колоректальной карциномы [E. Davenas, et al., 1987].

Детоксикационная роль основного органа детоксикации — печени — заключается в микросомальной биотрансформации, главным образом, среднемолекулярных ксенобиотиков и эндогенных токсикантов с гидрофобными свойствами, которая может сопровождаться повышением образования активных форм кислорода, в том числе продуктов перекисного окисления липидов.

Развитие токсических эффектов ряда химических веществ наиболее часто наблюдается при активации 1-й фазы и снижении активности 2-й фазы биотрансформации [С. А. Куценко, 2004].

Повышенное образование активных форм кислорода может вызывать различные патологические реакции.

Последствия оксидативного стресса, обусловленного АФК, включают в себя перекисное окисление липидов клеточных мембран, разрыв нитей ДНК, окисление белков.

Следует учитывать, что повышение ферментной активности CYP в ответ на воздействие субстратов может иметь в основе различные механизмы — транскрипционный (синтез ферментного белка de novo), посттранскрипционный (стабилизация мРНК) и посттрансляционный (стабилизация белка, модификация фермента).

Так, по первому механизму повышается уровень CYP1 в ответ на действие ПАУ, CYP2B1/2 — при действии фенобарбитала, CYP3A1 — при метаболизме дексаметазона.

Стабилизацию мРНК CYP1A2 вызывает 20-метилхолантрен, а стабилизацию и модификацию ферментного белка CYP2E1 — этанол.

К наиболее опасным супертоксикантам относятся диоксины, вызывающие экспрессию генов *AhR, CYP1A1* и *CYP1B1r.*

Диоксины влияют на повышение определенных форм цитохрома Р450, синтез глутатионтрансфераз, арилгидроксилаз и других ферментов биотрансформации.

При действии диоксинов происходят изменения клеточного метаболизма, связанные с образованием свободных радикалов, эпокисей, ускоряются процессы окисления, в первую очередь, фосфолипидов, гормонов, липидов,

витаминов клеточных мембран, меж- и внутриклеточных структур, ПОЛ («окислительный стресс»), биоактивация предшественников мутагенов и канцерогенов, нейротоксических ядов.

Отмечено, что цитохром Р450, являясь ключевым звеном в процессах детоксикации и выведения из организма химических соединений, может само инактивироваться.

Под действием реакционноспособных метаболитов, образующихся в результате активации субстратов (суперокисные, гидроксильные радикалы, перекись водорода и другие АФК), в ходе реакций некоторые изоформы цитохром Р450 подвергаются инактивации [И. И. Карузина, 1999; W.. Beyer, I. Fridovich, 1987].

Действие АФК на различные белки выражается в модификации определённых аминокислот, среди которых цистеин, тирозин, гистидин, триптофан наиболее подвержены окислительной модификации.

Таким образом, окислительная самоинактивация цитохрома Р450 в процессе катализа может лежать в основе механизма, регулирующего его обновление в клетке.

## 3.5 Влияние генетического полиморфизма на биотрансформацию ксенобиотиков

Изучение генетических различий в метаболизме ксенобиотиков, в том числе различных лекарственных средств и химических веществ, содержащихся в окружающей среде, проводится на протяжении более четырех десятилетий [W. Kalow, 1962, 1999; G. J. Brewer, 1971].

Получены данные, что ферменты, участвующие в детоксикации ксенобиотиков, подвержены влиянию генетического полиморфизма [В. С. Баранов и др., 2000; Выявление мутаций в генах [Электронный ресурс]; Генетический паспорт..., 2009; Н. Н. Каркищенко, 2007; В. Г. Кукес, 2004].

Генетический полиморфизм является ведущим в индивидуальных процессах биотрансформации ксенобиотиков, в том числе лекарств. Он характерен, как для ферментов 1-й фазы метаболизма (изоферменты цитохрома Р450, дигидрогеназа, бутирилхолинэстераза и др.), так и для ферментов 2-й фазы (N-ацетилтрансфераза, тиопурин S-метилтрансфераза и др.) и других процессов биотрансформации, может быть причиной метаболических нарушений, обуславливающих патологические процессы в организме.

В таблицах 3.9-3.10 представлены отдельные «неблагоприятные» аллельные варианты генов, кодирующих 1-ю и 2-ю фазы биотрансформации ксенобиотиков.

Неблагоприятные аллельные варианты генов у человека лежат в основе нарушения способности метаболизировать ксенобиотики, а также наследственной предрасположенности к различным заболеваниям, в том числе онкопатологии (табл. 3.11).

Таблица 3.9 – Некоторые «неблагоприятные» аллельные варианты генов, кодирующих 1-ю фазу биотрансформации [Кукес В.Г., 2004]

| Ген | Аллельные варианты | Изменение активности фермента |
|---|---|---|
| *CYP2D6* | «медленные» аллельные варианты: *CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5, CYP2D6*6, CYP2D6*7, CYP2D6*8, CYP2D6*9, CYP2D6*10, CYP2D6*41* | снижение активности изофермента цитохрома Р-450 2D6 (CYP2D6) |
| | копии функциональных аллелей *CYP2D6*1, CYP2D6*2*\ | повышение активности изофермента цитохрома Р-450 2D6 (CYP2D6) |
| *CYP2C9* | «медленные» аллельные варианты: *CYP2C9*2, CYP2C9*3* | снижение активности изофермента цитохрома Р-450 2С9 (CYP2C9) |
| *CYP2B6* | «медленные» аллельные варианты: *CYP2B6*5 CYP2B6*6* | снижение активности изофермента цитохрома Р-450 2В6 (CYP2B6) |
| *CYP3A4* | «медленные» аллельные варианты: A290G,CYP3A4*4 | снижение активности изофермента цитохрома Р-450 3А4 (CYP3A4) |
| *NQO1* | 609 C>T | снижение активности НАДФ(Н)-хиноноксидоредуктазы |
| *DPDG* | Asp97 1Ala, Cys24Arg, Arg886His | снижение активности дигидропиримидин дегидрогеназы |
| *BCHE* | «медленные» аллельные варианты: A209G и др. | снижение активности бутирилхолинэстеразы |

Таблица 3.10 − Некоторые «неблагоприятные» аллельные варианты генов, кодирующих 2 фазу биотрансформации [Клиническая фармакокинетика …, 2009; Кукес В.Г. и др., 2007; UGT1A1 [Электронный ресурс]]

| Ген | Аллельные варианты | Изменение активности фермента |
|---|---|---|
| *UGT1A1* | «медленные» аллельные варианты: *UGT1A1*1B, UGT1A1*28, UGT 1A1*60* | снижение активности изофермента глюкуронилтрансферазы 1А1 |
| *NAT2* | «медленные» аллельные варианты: *NAT 2*5, NAT 2*в, NAT 2*7, NAT2*14* и др. | снижение активности ацетилтрансферазы 2 |
| *TPMT* | «медленные» аллельные варианты: *TPMT*2, TPMT*3, TPMT*8* | снижение активности тиопуринметилтрансферазы |
| *GSTT1* | нулевые аллели | снижение активности глутатионтрансферазы Т1 |
| *GSTM1* | нулевые аллели | снижение активности глутатионтрансферазы М1 |

Таблица 3.11 – Ассоциация полиморфных вариантов генов биотрансформации ксенобиотиков с изменением (нарушением) состояния здоровья [Выявление мутаций [Электронный ресурс]; Гены биотрансформации [Электронный ресурс; Кукес В.Г. и др., 2007; Могиленкова Л.А., Рембовский В.Р., 2016; Райс Р.Х., Гуляева Л.Ф., 2003; Спицын В.А. и др., 2006; Шевченко О.В. и др., 2012; Burger H. et al., 2011; Lee W. et al., 2004]

| Фермент | Ген (полиморфизма) | Ксенобиотики | Предрасположен-ность/резистентность к патологии |
|---|---|---|---|
| Первая фаза биотрансформации ксенобиотиков (семейства цитохрома Р450) | | | |
| CYP 1A 1 | *CYP 1A1 (n; *2A; *2B; *4 C4887A, A4889G, T6235C)* | полициклические ароматические углеводороды, бензо[а-пирен, диоксины (ТХДД и др.), нитрозамины | злокачественные новообразования (рак легких, полости рта, лейкозы и др.) |
| CYP 1A2 | *CYP 1A2 (*1A, C164A); *1B: 1545 T>C* | гетероциклические амины, ариламины, ароматические амины, диокины, пищевые мутагены, афлатоксин В1, диазепам, верапамил и др. | слабая индуцибельность (онкологические заболевания); риск развития инфаркта миокарда |
| CYP 2A6 | *CYP 2A6 (*2, *3, *4: Leu160His конверсия, делеция)* | гетероциклические амины, ариламины, ароматические амины, нитрозамины, пищевые мутагены, афлатоксин в1, табачный дым и др. | уменьшение риска развития рака легкого (*4); табачной зависимости (*2 и *3) |

Продолжение табл. 3.11

| Фермент | Ген (полиморфизма) | Ксенобиотики | Предрасположенность/резистентность к патологии |
|---|---|---|---|
| CYP 2B6 | *CYP 2B6 2A6 (*2, *4,*5, *6; 64C>T)* | лекарства (циклофосфамид и др.) | снижение клиренса, нарушения функций ЦНС, затруднение лечения табачной зависимости |
| CYP 2C8 | *CYP 2C8* | бензо(а)пирен, толбутамид, r-мефенитоин | снижение клиренса |
| CYP 2C9 | *CYP 2C9 2A6 (*2, *3; 430C>T, 1075 A>C* | толбутамид, r- и s-мефенитоин, варфарин, диазепам и др. ЛС | снижение клиренса, злокачественные новообразования (*2), глубокая депрессия (*3), эпилепсия |
| CYP 2C19 | *CYP 2C19 (*2; 681G>A)* | r- и s-мефенитоин, барбитураты и др. | снижение клиренса, острый лейкоз |
| CYP 3A4 | *CYP 3A4 (*1B5')* | афлатоксин B1, нифедипин, тестостерон, циклоспорин и др. | злокачественные новообразования (рак легкого, простаты и др.) |
| CYP 3A5 | *CYP 3A5 (*3A; 6986 A>G)* | нифедипин, тестостерон и др. | гипотония, снижение риска развития гипертонии, рака легкого |
| CYP 2E | *CYP 2E1* | хлорзоксазон, n-нитрозодиметиламин, этанол | гепатома печени, алкогольная болезнь, злокачественные опухоли |
| *вторая фаза биотрансформации ксенобиотиков* | | | |
| UGT1A1 | *UGT1A1*28* | стероиды, билирубин, некоторые ЛС | Гипербилирубиемия |
| GSTM1 | *GSTM1 (0/0)* | мышьяк и другие ксенобиотики | делеция, злокачественные новообразования, бронхиальная астма, хронический бронхит |
| GSTT1 | *GSTT1 (0/0)* | бензопирены и другие канцерогены, мышьяк | делеция (фермент не продуцируется), злокачественные новообразования, бронхиальная астма |
| GSTP1 | *GSTP1 (*B; *C: Ile105Val, 313A> G, Ala114Val, 341 C>T)* | канцерогены, пестициды | злокачественные новообразования, спонтанные аборты |
| NAT1<br>NAT2 | *NAT2 (*4* (норма), *12 – быстрые; *5A, *5B, *5C, *6, *7 – медленные ацетиляторы)* | гетероциклические амины<br>ароматические амины, табачный дым, пестициды | быстрое/медленное ацетилирование, канцерогенез |

Продолжение табл. 3.11

| Фермент | Ген (полиморфизма) | Ксенобиотики | Предрасположенность/резистентность к патологии |
|---|---|---|---|
| NAT2 SULTIAL | *NAT2, SULTIAL* | гетероциклические амины | рак толстой кишки и молочной железы |
| EPHXI | *EPHXI (Tyr 113His; 337 T>C; His139Arg, 415A>G)* | афлатоксин B1, производные эпоксида | изменение стабильности фермента, хронический бронхит,эмфизема, обструктивная пневмония, злокачественные опухоли |
| *немикросомальная детоксикация ксенобиотиков* | | | |
| ALAD δ-ALAD (δ-аминолевулинатдегидратаза) VDR (рецептор вит. D | *ALAD (*2)*<br><br>*VDR* | свинец | уровень свинца в крови, свинцовая интоксикация |
| HLA-DHβ1 | *HLA-DHβ1* | бериллий | хронический беррилиоз |
| CPOX | *CPOX (молекул. аномалия)* | ртуть | атипичный метаболизм порфирина |
| CERUMEN | *CERUMEN* | фтор | флюороз |
| PON | *PON1 (A192G и M155L)* | ФОВ, эфиры уксусной кислоты, карбоматы | нервно-токсическое поражение (снижение активности изоформы a192), ишемическая болезнь сердца (gln 192 arg), болезнь Паркинсона, атеросклероз, церебральный инфаркт, кардиоваскулярные заболевания (leu55met) |
| ADHIB | *ADH1B*2* | этанол и другие спирты | понижение риска алкогольного цирроза печени, риска развития инсультов, у пациенток повышение частоты рака груди |
| ALDH2 | *ALDH2 (*48His; *504Lys)* | этанол и другие спирты, альдегиды | меньшее употребление алкоголя, реже страдают алкоголизмом (*48his);усиление влияния (*504lys) на биотрансформацию алкоголя;повышение злокачественных заболеваний, алкогольная болезнь, цирроз печени |

| Продолжение табл. 3.11 | | | |
|---|---|---|---|
| *третья фаза биотрансформации ксенобиотиков* | | | |
| *ABC* (Р-гликопроте-ины) | *ABCG2 (421C>A)*<br><br>*ABCB1 (MDR1; 3435 C>T)* | удаление ксенобиотиков из клеточной мембраны и цитоплазмы | резистентность к химиотерапии эффективность лекарственной терапии |
| OATP (анионные транспор-теры) | *SLCO1A2 (*A5I6C*)* | транспорт анионов | снижение транспорта органических анионов |
| OCT (катионные транспор-теры) | *SLC22A* (808G>T) | транспорт катионов | снижение нефротоксичности |

Изоферменты 1-й фазы метаболизма ксенобиотиков (цитохрома Р450) кодируются суперсемейством генов. Существуют сотни генов, кодирующих эти ферменты: у животных, растений, бактерий и дрожжей [Генетический паспорт ..., 2009; В. Г. Кукес и др., 2007; Daniel W. Nebert et al. [Электронный ресурс]. У человека выявлено 57 генов и более 59 псевдогенов системы цитохрома Р450. Они подразделяются на 18 семейств и 43 подсемейства (табл. 3.12). 22 подсемейства человеческих генов Р450 картированы до места расположения хромосом для большей части генома.

Таблица 3.12 – Гены, кодирующие ферменты семейств цитохромов Р450 [Генетический паспорт …, 2009; Кукес В.Г. и др., 2007; Куценко С.А., 2004].

| Семейство цитохромов Р450 | Функции | Название генов |
|---|---|---|
| CYP1 | метаболизм лекарств и стероидов (особенно эстрогена) | *CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1* |
| CYP2 | метаболизм лекарств и стероидов | *CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP2J2, CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1, CYP2W1* |
| CYP3 | метаболизм лекарств и стероидов (включая тестостерон) | *CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43* |
| CYP4 | метаболизм арахидоновой кислоты | *CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4V2, CYP4X1, CYP4Z1* |
| CYP5 | синтез тромбоксана $A_2$ | *CYP5A1 (синтаза тромбоксана $A_2$)* |
| CYP7 | биосинтез желчных кислот, участие в метаболизме стероидов | *CYP7A1, CYP7B1* |
| CYP8 | различные | *CYP8A1 (синтез простациклина), CYP8B1 (биосинтез желчных кислот)* |
| CYP11 | биосинтез стероидов | *CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2* |
| CYP17 | биосинтез стероидов, 17-альфа гидроксилаза | *CYP17A1* |
| CYP19 | биосинтез стероидов (ароматаза, синтезирующая эстроген) | *CYP19A1* |

| Продолжение табл. 3.12 | | |
|---|---|---|
| CYP20 | не установлены | *CYP20A1* |
| CYP21 | биосинтез стероидов | *CYP21A2* |
| CYP24 | биодеградация витамина Д | *CYP24A1* |
| CYP26 | гидроксилирование ретиноловой кислоты | *CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1* |
| CYP27 | Различные | *CYP27A1* (биосинтез желчных кислот), *CYP27B1* (1-альфа-гидроксилаза витамин $D_3$, активирующая витамин $D_3$), *CYP27C1* (функция не установлена) |
| CYP39 | 7-альфа-гидроксилирование 24-гидроксихолестерола | *CYP39A1* |
| CYP46 | холестерол 24-гидроксилаза | *CYP46A1* |
| CYP51 | биосинтез холестерола | *CYP51A1* (14-альфа деметилаза ланостерола) |

Суперсемейство гена цитохрома Р450 млекопитающих было разделено на три группы: гены, участвующие, главным образом, в метаболизме чужеродных химических веществ; гены, участвующие в синтезе различных стероидных гормонов, и гены, участвующие в других важных эндогенных функциях [Н. П. Бочков и др., 2011].

Наиболее важными для прогнозирования токсичности являются ферменты Р450, метаболизирующие ксенобиотики, в том числе лекарственные средства.

Локализация генов, участвующих в биотрансформации лекарственных средств и других ксенобиотиков (табл. 3.13).

Таблица 3.13 – Локализация генов *CYP*

| Изоферменты | Локус |
|---|---|
| *CYP1A1* | 15q22-q24 |
| *CYP1A2* | 15q22-qter |
| *CYP1B1* | 2q22- q22 |
| *CYP2A6* | 19q13.2 |
| *CYP2B6* | 19q13.2 |
| *CYP2C8* | 10q24.1 |
| *CYP2C9* | 10q24.1-24.3 |
| *CYP2C18* | 10q24.1-24.3 |
| *CYP2C19* | 10q24.1-24.3 |
| *CYP2D6* | 22q13.1 |
| *CYP2E1* | 10q24.3- qter |
| *CYP3A4* | 7q22.1 |

В отличие от семейств генов, кодирующих энзимы цитохрома Р450, которые участвуют, главным образом, в физиологических процессах организма, семейства генов, кодирующих ферменты Р450 метаболизма ксенобиотиков,

обладают выраженной видовой специфичностью и часто содержат большое количество активных генов в одном подсемействе.

У человека обнаружено 12 аллелей гена *CYP1A1, CYP1B1 – 24, CYP1A2 –* 33 и более аллелей.

Подсемейство генов *CYP1A* состоит из 2 генов, кодирующих два типа ферментов человека и других млекопитающих: согласно стандартной номенклатуре Р450 они обозначаются *CYP1A1* и *CYP1A2* [Генетический и фенотипический полиморфизм человечества [Электронный ресурс];

Гены биотрансформации [Электронный ресурс]; В. Г. Кукес, 2004; Фармакология, 2008]. Эти ферменты представляют значительный интерес, так как они участвуют в метаболической активации многих проканцерогенов, а также индуцируются рядом соединений, представляющих интерес для токсикологии.

Ген *CYP1A1* локализован на 15 хромосоме, в локусе 15q22-q24, кодирует фермент арилуглеводородкарбоксилазу (АНН), представляющий собой белок, состоящий из 512 аминокислотных остатков, имеющий массу 58 кДальтон. АНН участвует в метаболизме эстрогенов (гидроксилирование эстрадиола, приводящее к его активации), ПАУ, в том числе содержащихся в табачном дыме, с образованием канцерогенов (бенз(а)пирена и др.), в биоактивации нитрозаминов.

Регуляция экспрессии генов цитохрома Р450 1А по генотипу Ah рецептора различается при индукции химическими канцерогенами и под влиянием физиологических факторов.

Полиморфизм гена рецептора Ah отмечается у человека и животных. Отмечено, что изменения в генной кодировке рецептора Ah у подопытных животных вызывают различия в химической и токсической реакциях.

Известно порядка 10 мутаций гена *AhR,* влияющих на активность CYP. Повышенная активность обнаруживалась при наличии мутации у людей в кодирующей области гена *AhR* (аллель *G1721* A), причем у мужчин в большей степени, чем у женщин [J. Smart and A. K. Daly, 2000].

CYP1A1 метаболически активизирует многие соединен.

Примерно у 1/10 части популяции отмечается высокая индукция CYP1A1. Вариант G полиморфизма I462V (A1506G – аллель *2 (*2C или *m2), A2454G, Ile462Val – замена нуклеотида аденина на гуанин, приводящая к замене аминокислоты изолейцина на валин в белке), вызывает повышение активности CYP1A1 и соответственно ускорение метаболизма психотропных лекарственных препаратов, риск алкогольного цирроза печени, канцерогенное действие табачного дыма. Данный полиморфизм служит онкологическим маркером.

Ферменты подсемейства CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43 кодируются соответственно генами *CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43.* В гене *CYP3A43* выявлены три полиморфных варианта, один их которых приводит к редуцированному белку за счет раннего стоп-кодона. Унимодальное распределение метаболического профиля CYP3A4, наблюдаемое в больших выборках, говорит об участии комплекса факторов в формировании ферментативной активности. Для CYP3A5 наблюдается бимодальное распределение, которое объясняется наличием аллеля *3A5*3C.* Данный аллель вносит определенный вклад в активность всего подсемейства, но не определяет все межиндивидуальные различия.

Ген *CYP11A1* кодирует цитохром P-450scc, который как гемпротеин в процессе своего топогенеза должен связывать гем [А. Н. Миненко, 2008].

Ген *CYP11A* располагается на длинном плече 15-й хромосомы в участке 15q24 [Роль генетических факторов [Электронный ресурс]. Усиление активности гена повышает продукцию андрогенов.

Одним из двух основных вариантов полиморфизма промоторной области гена является наличие разного количества пентануклеотидных повторов TTTTA, начиная с позиции -528.

Основными вариантами, наблюдаемыми в популяции, являются: 216R, 226R, 236R и 241R. Наиболее распространен вариант 216R (около 60%). Следующим по частоте является вариант 226R (около 30%). Для всех полиморфных вариантов наблюдается повышенная продукция андрогенов (за исключением 216R).

С полиморфизмом гена *CYP11A* может быть связано наличие признаков метаболического синдрома. Вариант 216R является благоприятным для репродуктивной функции. С вариантом полиморфизма 216R — ассоциируется повышение риска развития синдрома поликистозных яичников у женщин.

Трофические гормоны увеличивают экспрессию гена *CYP11A1* через транскрипционные факторы, такие как фактор steroidogenic 1 (SF-1) а изоформой активации белка 2 (AP 2) [Фермент раскола цепи [Электронный ресурс]. Мутации в гене *CYP11A1* могут приводить к дефициту стероидов.

Ген *CYP2D6* кодирует аминокислотную последовательность семейства 2D6 цитохрома P450 2D6 [В. Г. Кукес и др., 2007; А. А. Моисеев, 2013]. Локализация гена - 22q13.1.

Описано более 80 полиморфизмов гена *CYP2D6.* Ген *CYP2D6* впервые выявлен при изучении полиморфизма данного гена в связи с клинической изменчивостью реакции пациентов на антигипертензивный препарат дебризоквин.

Описано свыше десятка мутаций, перестановок и делеций, оказывающих

влияние на данный ген. «Медленными» метаболизаторами по CYP2D6 являются носители (как гомозиготы, так и гетерозиготы) функционально дефектных аллельных вариантов гена *CYP2D6*. Результат этих вариантов: отсутствие синтеза CYP2D6 (аллельный вариант *CYP2D6x5),* синтез неактивного белка (аллельные варианты *CYP2D6x3, CYP2D6x4, CYP2D6x6, CYP2D6x7, CYP2D6x8, CYP2D6x11, CYP2D6x12, CYP2D6x14, CYP2D6x15, CYP2D6x19, CYP2D6x20),* синтез дефектного белка со сниженной активностью (варианты *CYP2D6x9, CYP2D6x10, CYP2D6x17).*

В результате изменений в гене *CYP2D6* у людей может отмечаться не только пониженный или повышенный метаболизм дебризохина, но и сверхбыстрый метаболизм этого вещества. Большинство изменений в гене *CYP2D6* связаны частично или полностью с общим дефицитом функции фермента.

Описаны индивидуумы, которые обладают несколькими функциональными копиями гена *CYP2D6,* что приводит к сверхбыстрому метаболизму субстратов CYP2D6.

С полиморфизмом гена *CYP2D6* связано развитие рака легких и болезни Паркинсона. Индивидуумы с интенсивным метаболизмом дебризохина (фенотип EM) могут иметь повышенную восприимчивость к раку легких, а с пониженным метаболизмом (фенотип PM) ассоциируются с риском болезни Паркинсона. Фермент CYP2D6 метаболизирует NNK — нитрозамин, содержащийся в табаке.

Активность CYP2C19 в значительной степени определяется этнической принадлежностью [Генетический и фенотипический полиморфизм человечества [Электронный ресурс].

Ген *CYP2C19* расположен в локусе 10q24.1-24.3. У гена *CYP2C19* имеется 8 аллелей, большинство из которых *(CYP2C19*3, *4, *5, *6, *7 и *8)* редко определяются у лиц европеоидной и негроидной рас. Напротив, в Азии, прежде всего среди японцев и китайцев, распространены аллели *CYP2C19*2* (m1 мутация) и CYP2C19 *3 (m2 мутация).

Аллель *CYP2C19*3* обусловливает большую распространенность медленных инактиваторов в данной этнической подгруппе по сравнению с другими. Среди азиатского населения медленными инактиваторами являются примерно 13-23%, среди белого населения и афроамериканцев — около 1-6%.

Мутация в гене *CYP2C19* является главной причиной дефицита активности фермента CYP2C19, с чем связан повышенный риск токсичности при употреблении противосудорожного лекарства S-мефенитоин.

Трудность определения реальной молекулярной основы дефицита

заключается в наличии шести или более генов подсемейства человеческого фермента CYP2C. От 2% до 5% кавказоидов и до 25% азиатов обладают этим дефицитом.

Наличие «медленных» аллелей в генах, кодирующих изоферменты 1-й фазы биотрансформации *(CYP2D6; CYP2C19),* приводит либо к отсутствию синтеза этих ферментов, либо к синтезу ферментов с низкой активностью.

Медленные метаболизаторы (гомозиготы по мутантным аллелям *CYP2D6*3*4; CYP2C19*2*3)* погибают сразу после инъекции обычной и даже небольшой дозы наркотиков, а быстрые метаболизаторы погибают, как правило, через несколько лет после начала употребления наркотиков.

«Медленные» метаболизаторы по CYP2D6 являются носителями (гомозиготами) мутантных аллелей гена цитохрома 2D6 [Клиническая фармакокинетика..., 2009]. Эти мутации вызывают отсутствие синтеза CYP2D6 или синтез дефектного белка, не обладающего активностью или со сниженной активностью. Таких мутантных аллелей выявлено более 30, однако 95 % всех «медленных» метаболизаторов по CYP2D6 оказываются носителями трёх «медленных» аллельных вариантов: CYP2D6*3A, CYP2D6*4A, CYP2D6*5. Эти аллельные варианты наследуются по аутосомно-рецессивному типу.

Распространённость «медленных» метаболизаторов среди населения сильно колеблется: от 1 % среди арабского населения до 30% среди жителей Гонконга. Распространённость «медленных» метаболизаторов в Европе в среднем составляет 5-10%, среди афроамериканцев – 2%, белого населения США – 6%, китайцев – 1%, среди японского населения «медленные» метаболизаторы по CYP2D6 практически не встречаются.

У «медленных» метаболизаторов по CYP2D6 чаще развиваются некоторые злокачественные новообразования: рак мочевого пузыря, желудка, глотки, лёгких (в особенности у курильщиков), первичный рак печени.

Число «быстрых» метаболизаторов по CYP2D6 в Европе составляет 5-7%, среди русских – 3,4%, скандинавов – 1,5%.

У «быстрых» метаболизаторов выявляется «дупликация» гена *CYP2D6,* которая наследуется по аутосомнорецессивному типу. У «быстрых» метаболизаторов по CYP2D6 при применении ЛС отмечается снижение их терапевтической эффективности за счёт ускорения метаболизма лекарственных субстратов CYP2D6, что приводит к снижению их концентрации в плазме крови. Например, ондансетрон у больных, являющихся «быстрыми» метаболизаторами по CYP2D6, не предотвращает рвоту при проведении химиотерапии злокачественных опухолей.

Распространенность медленных метаболизаторов по CYP2C19 среди европейцев составляет 2-5%, русских – 2,1-2,3%, азиатского населения – 15-

20%, белого населения США – 4%, коренного населения Северной Америки – 23%.

Применение у «медленных» метаболизаторов по CYP2C19 лекарственных субстратов CYP2C19 приводит к более частому возникновению побочных эффектов, в особенности при применении ЛС с узкой терапевтической широтой, таких, как трициклические антидепрессанты, диазепам, некоторые барбитураты. С другой стороны, у «медленных» метаболизаторов по CYP2C19 ингибиторы протонного насоса (омепразол, пантопразол, лансопразол) вызывают более выраженный антисекреторный эффект.

Отмечен более высокий риск развития злокачественных новообразований головы и шеи у «медленных» метаболизаторов по CYP2C19.

Полиморфизмы гена *CYP2E1:* RsaI (-1019 C->T), PstI (-1293 G>C), DraI (T>C) и Tag 1 (9896 C->G) цитохрома 2E1 [Клиническое значение [Электронный ресурс]. Ген *CYP2E1* локализован в локусе 10q24, кодирует фермент, метаболизирующий многие химические вещества, включая ряд канцерогенов с низким молекулярным весом (табачный дым) [А. Андреева и др. [Электронный ресурс].

Вариант T RsaI (RsaI c2) ассоциирован с алкогольной болезнью печени. Вариант C PstI (PstI+) соответствует повышенному риску развития онкологических заболеваний. Вариант C DraI также является онкологическим маркером. В европейских популяциях частоты встречаемости вариантов RsaI и PstI составляют 1-3%, варианта DraI – около 10%.

Повышенная частота C2 аллеля гена *CYP2E1,* связанного с высокой транскрипционной и ферментативной активностью, свидетельствует о высоком риске развития гепатоцеллюлярной карциномы у японцев, злоупотребляющих алкоголем [M. Munaka et al., 2003].

Установлена зависимость между присутствием отдельных структурных вариаций в гене *CYP2E1* и пониженным риском рака легких.

Кластер генов, кодирующих флавинсодержащие монооксигеназы, находится на q-плече в бэндах 1q23-q25 хромосомы 1.

Генетические полиморфизмы генов микросомальных ферментов FMO мало изучены. У человека известны пять генов *(FM01, FM02, FM03, FM04, FM05)* и один псевдоген *(FM06P)* системы флавинсодержащих монооксигеназ [Н. П. Бочков и др., 2011; Т. В. Тупицына и др., 2012].

Выявлено 16 полиморфизмов гена *FMO3*. Показано, что нарушение превращения триметиламина в триметиламин-N-оксид ассоциировано с многочисленными мутациями в гене *FMO3*.

Так, при мутациях (#602079) гена *FM03* (136132, КФ 1.14.13.8) развивается триметиламинурия (синдром рыбного запаха). Для гомозигот также

характерны тахикардия, тяжелые гипертензионные кризы (например, после употребления содержащего тирамин сыра).

Полиморфные локусы rs10912745 и rs4916375 ассоциированы с риском развития ишемического кардиоэмболического инсульта. У мутантных ферментов P153L и N61S снижена более чем в 10 раз каталитическая эффективность N-оксигенации триметиламина по сравнению с FMO3 дикого типа [C. K. Yeung et al., 2007 ].

Выявлена слабая ассоциация между гипертонией и полиморфными гаплотипами по 3 мутациям в гене *FMO3* [D.M. Lambert et al., 2000].

Ген *NQO*1, кодирующий НАДФ(Н) хинон оксидоредуктазу, локализован на 16 хромосоме в локусе 16q22.1 [А. В. Полоников, 2006]. В гене *NQO1* идентифицировано более 20 частых однонуклеотидных полиморфизмов. Наиболее значимы замены P187S (rs1800566) и R139W (rs4986998) в 6 и 4 экзонах гена соответственно.

Гетерозиготы 187PS имеют в 3 раза более низкую ферментативную активность, чем гомозиготы дикого типа 187PP, у гомозигот 187SS фермент полностью инактивируется.

Экспрессия NQO1 находится под контролем регуляторного элемента ARE, с которым связывается транскрипционный фактор Nrf2, ген также активируется под действием окислительного стресса вследствие активации сигнального каскада AhR рецептора ПАУ.

Ген *EPHX1* располагается в 1 хромосоме (локус 1q42.1), содержит 9 экзонов, кодирует микросомальную эпоксидгидролазу [Клиническая фармакокинетика., 2009], которая катализирует большую часть реакций водной конъюгации. Ген локализируется в печени, почках и других органах.

Выявлено 33 точечных мутации. Мутация T337C (Tyr113His, генотип *S/S)* приводит к снижению синтеза эпоксидгидратазы на 40%. Она наследуется по аутосомнорецессивному типу.

Снижение активности EPHX1 наблюдают только у гомозигот по этой мутантной аллели. Отмечена положительная корреляция медленного аллеля гена *EPHX1* с заболеваниями органов дыхания; в сочетании с курением у таких носителей чаще развиваются респираторные заболевания, эмфизема легких и обструктивная пневмония — rs10912745 и rs4916375. При замене гистидина 139 на аргинин (A415G — быстрый аллель F) выработка фермента увеличивается.

Некоторые полиморфные варианты гена *EPHX1* ассоциированы с нарушением репродуктивной функции и онкологическими заболеваниями.

Выявлено протективное влияние «нормальных» (отсутствие мутаций и гетерозиготного состояния в 3-ем и 4-ом экзонах) генотипов *EPHX1* на риск

развития ХОБЛ как у некурящих лиц, так и у курильщиков [С. Е. Вахрушева, 2012].

Существует ряд полиморфизмов внутри генов, кодирующих суперсемейства ферментов 2-й фазы биотрансформации, метаболизирующих ксенобиотики (УДФ-глюкуронсультрансферазы, глутатион-S-трансферазы, N-ацетилтрансферазы, эпоксид гидролазы и метилтрансферазы) [Генетический паспорт., 2009; И. В. Голденкова-Павлова и др., 2006; В. Г. Кукес, 2004; М. В. Никишина, 2007; В. А. Степанов, 2014; Daniel W. Nebert et al. [Электронный ресурс]; N. Hettenbach, 2008; UGT1A1 [Электронный ресурс].

Создана аналогичная геному ферментов цитохрома Р450 терминологическая система для УДФ-глюкоронозилтрансферазы.

Глюкуронирование является наиболее важной реакцией 2-й фазы метаболизма ксенобиотиков и представляет собой конъюгацию с субстратом УДФ-глюкуроновой кислоты, катализируется 2 семействами УДФ-глюкуронилтрансфераз (UGT), включающими более 20 изоферментов.

У людей имеется два генных семейства, кодирующих изоформы глюкуронозилтрансферазы (UGT1 и UGT2), включающих B3GAT1, B3GAT2, B3GAT3; UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10;UGT2A1, UGT2A2, UGT2A3, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15, UGT2B17, UGT2B28. Локус UGT1A находится во второй хромосоме (2q37) и кодирует UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10. Гены *UGT2B* картированы в 4-й хромосоме (4ql3 и 4q27).

Мутация изоформы *UGT1A1* приводит к гипербилирубинемии, что связано с последующими нарушениями метаболизма.

Накопились данные об ассоциации изоформы гена *UGT2B7,* участвующей в метаболизме ЛС и других ксенобиотиков, с рядом комплексных заболеваний человека (системная красная волчанка, эпилепсия, ожирение). Данный тип при генетическом отборе включен в число маркеров формирования генетического разнообразия популяции населения (снижение предковых аллелей и рост гетерозиготности) [В. А. Степанов, 2014].

Полиморфизм генных семейств глутатион-S-трансферазы наиболее изучен [Клиническая фармакокинетика., 2009; Полиморфизмы генов [Электронный ресурс]. Классификация генома GST построена на основе структурных, иммунологических и функциональных свойств.

По идентичности аминокислотного состава у млекопитающих выделяют 6 классов GST: α-, μ-, κ-, θ-, π- и σ-GST. В организме человека в основном экспрессируются GST классов μ (GSTM), θ (GSTT) и π (GSTP).

GST разных классов могут обладать перекрывающейся субстратной

специфичностью. Субъединицы в пределах одного класса имеют около 70% гомологии. Субъединицы разных классов имеют менее 50% гомологии аминокислотной последовательности.

Гедеродимеры могут формироваться только при участии субъединиц, принадлежащих к одному классу. Семейства цитозольных GST имеют общее эволюционное происхождение, причем предковый ген наиболее близок к θ-классу.

Микросомальные формы фермента возникли из отдельной эволюционной ветви, они восстанавливают органические гидроперекиси в спирты, изомеризуют некоторые стероиды и простагландины, играют ключевую роль в обезвреживании канцерогенов и других ксенобиотиков, продуктов ПОЛ.

Для гена *GSTA1* описано 3 распространенных полиморфизма в области промотора (-567T>G, -69C>T и -52G>A), снижающих экспрессию.

До половины европейцев гомозиготны по делеции гена *GSTM1,* около 15% – по делеции гена *GSTT1.* Наиболее частые полиморфизмы гена *GSTP1* – 313A>G (замена Ile105Val) и 341C>T (Ala114Val).

Аллель GSTP1 105Val достаточно распространен: его имеют около половины населения, причем 10-15% из них составляют гомозиготы, аллель 114Val более редок (соответственно 15% и 2-3%).

Изменение структуры фермента снижает его сродство к большинству субстратов (алкилирующим средствам и антрациклинам), но в отношении препаратов платины картина обратная: в экспериментах in vitro инактивация этих цитостатиков ускорялась в 2-4 раза [А. А. Моисеев, 2013].

Установлено, что исследование полиморфных аллелей генов *GSTT1, GSTP, GSTM* целесообразно осуществлять с профилактической целью для выявления повышенного риска развития онкологических заболеваний при контакте с канцерогенами, в том числе рака легких, пищевода и гортани — у регулярно курящих лиц.

Наибольшее значение в метаболизме ксенобиотиков имеют GST класса μ, обозначаемые как GSTM. В настоящее время выделено 5 изоферментов GSTM: GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4 и GSTM5.

Ген *GSTM1* экспрессируется в печени, почках, надпочечниках, желудке; слабая экспрессия данного изофермента найдена в скелетных мышцах, миокарде. GSTM1 не экспрессируется в плодной печени, фибробластах, эритроцитах, лимфоцитах и тромбоцитах.

*GSTM2* («мышечная» GSTM) экспрессируется во всех вышеперечисленных тканях (особенно в мышечной), кроме фибробластов, эритроцитов, лимфоцитов, тромбоцитов и фетальной печени.

Экспрессия *GSTM3* («мозговая» GSTM) осуществляется во всех тканях

организма, особенно в ЦНС.

Полиморфизм гена *GSTM1.* Хорошо изучен член суперсемейства фермента глутатион-*S*-трансферазы, обозначаемый GST mu или GSTM1.

Варианты аллелей генов включают:

I/I – гомозиготный носитель нормального гена *GSTM1;*

I/D – гетерозиготная форма полиморфизма;

D/D – гомозиготный носитель делеции гена *GSTM1.*

Выявлены межэтнические различия в роли вариантов генов GSTM1. Обнаруженный полиморфизм в данном гене вызывает полное отсутствие функционального фермента у почти половины всех исследовавшихся европеоидов, у представителей негроидной расы - 60%.

В случае делеции (отсутствия) гена *GSTM1* соответствующий фермент GST не образуется, в результате чего способность организма избавляться от некоторых вредных соединений значительно снижается. 70% больных раком ободочной кишки – носители нулевой аллели *GSTM1.*

Данная глутатион-*S*-трансфераза представляет особый интерес для токсикологов, так как важная роль в инактивации канцерогенов принадлежит GSTM1, что подтверждается статистически значимым увеличением частоты злокачественных заболеваний среди носителей нулевых аллелей гена *GSTM1,* у которых отсутствует экспрессия GSTM1.

Ген *GSTM1* локализован на хромосоме 1 (1p13.3), участвует в детоксикации токсичных метаболитов, образуемых ферментом CYP1A1, из химических веществ, в частности, при курении сигарет. Так, повышенная восприимчивость к раку легких может быть связана с отсутствие этого фермента.

Так, при классификации индивидуумов на основе либо варианта гена *CYP1A1,* либо снижения или присутствия функционального гена *GSTM1* показано, что риск развития рака легких под влиянием курения варьирует значительно: индивидуумы, у которых наблюдается одно редкое изменение гена *CYP1A1* в отсутствии гена *GSTM1,* обладают повышенным риском (в 9 раз) развития рака легких при воздействии относительно низкого уровня сигаретного дыма.

Риск развития рака легких зависит от сочетания мутантного аллеля *CYP1A1* и «нулевого аллеля» *GSTM1.* Более того, некурящие люди с «нулевым» генотипом *GSTM1* не подвержены риску развития рака мочевого пузыря, а среди заболевших этим видом рака почти 25% курящих людей, у которых выявлена делеция в этом гене [С. К. Абилев, 2012].

Ген *GSTT1* картирован на хромосоме 22(22q11.2), кодирует аминокислотную последовательность фермента тета-1 глутатион S-трансферазы, который содержится в эритроцитах и участвует в метаболизме

многих ксенобиотиков (в частности промышленных канцерогенов) посредством присоединения глутатиона к субстратам [Гены системы детоксикации [Электронный ресурс].

Варианты аллелей генов включают:

I/I – гомозиготный носитель нормального гена *GSTT1;*

I/D – гетерозиготная форма полиморфизма;

D/D – гомозиготный носитель делеции гена *GSTT1.*

В случае делеции (отсутствия) гена *GSTT1* фермент тета-1глутатион-*S*-трансфераза не образуется, в результате чего способность организма к детоксикации значительно снижается. Это приводит к повышению риска развития различных форм рака, а также ишемической болезни сердца.

Во всех случаях риск развития заболеваний многократно увеличивается при курении, а также при воздействии некоторых химических канцерогенов. У некурящих делеция *GSTT1,* видимо, является защитным фактором. Исследование пациентов с раком легких показало, что наличие делеции гена *GSTT1* у некурящих приводит к пятикратному понижению риска развития заболевания. Риск ишемической болезни сердца у некурящих носителей делеции GSTT1 был понижен в 1,5 раза.

Частота встречаемости делеции гена *GSTT1* в популяции: 16-25%. Преобладающий генотип в популяции: I/I.

Ген *GSTP1* локализован в локусе 11q13, кодирует аминокислотную последовательность фермента π-1глутатион-*S*-трансферазы, которая содержится в эритроцитах и участвует в метаболизме ксенобиотиков посредством присоединения глутатиона к субстратам.

Фермент GSTP1 отвечает за детоксикацию электрофильных и кислых ксенобиотиков, выполняет антиоксидантную роль в организме человека. Локализуется главным образом в печени и структурах гематоэнцефалического барьера. Участвует в инактивации пестицидов и гербицидов, широко используемых в сельском хозяйстве. GSTP1 также очищает эритроциты от ксенобиотиков.

Полиморфизм гена *GSTP1* связан с заменой нуклеотида аденина (A) на гуанин (G), что приводит к замене аминокислоты в пептидной цепи молекулы фермента, вызывая снижение его активности и, следовательно, увеличение накопления в организме токсичных веществ.

Варианты аллелей гена:

A/A – нормальный вариант полиморфизма в гомозиготной форме;

A/G – гетерозиготная форма полиморфизма;

G/G – мутантный вариант полиморфизма, связанный с увеличением риска заболеваний, в гомозиготной форме.

Частота встречаемости варианта G полиморфизма в популяции: 45%. Преобладающий генотип в популяции: A/A.

За счет этого носители генотипа G/G имеют повышенный риск развития различных форм рака. При курении риск развития рака легких и рака ротовой полости значительно увеличивается. Полиморфизм также влияет на предрасположенность к лейкемии и болезни Паркинсона. У лиц, имеющих вариант G, может быть повышена чувствительность к препаратам, используемым для химиотерапии рака.

Второй вариант полиморфизма гена *GSTP1* связан с заменой нуклеотида цитозина (C) на тимин (T), что приводит к замене аминокислоты в пептидной цепи молекулы фермента, вызывая снижение его активности и, следовательно, увеличение накопления в организме токсичных веществ. За счет этого носители генотипа *T/T* имеют повышенный риск развития различных форм рака.

Частота встречаемости варианта T полиморфизма в популяции: 35%. Преобладающий генотип в популяции: C/C.

Варианты аллелей гена:

C/C – нормальный вариант полиморфизма в гомозиготной форме;

C/T – гетерозиготная форма полиморфизма;

T/T – мутантный вариант полиморфизма, связанный с увеличением риска заболеваний, в гомозиготной форме.

Гены сульфотрансфераз *(SULT)* кодируют ферменты реакции сульфатирования. В организме человека обнаружено три семейства ферментов SULT. Идентифицировано около 40 изоферментов сульфотрансферазы. В организме человека SULT кодируются 10 генами [Клиническая фармакокинетика, 2009]. Ген изоферментов SULT1 локализован в 16 хромосоме (локус 16p11.2).

Выявлено, что изоферменты сульфотрансферазы семейства 1 — SULT1A1 и SULT1A3 — самые важные в данном семействе при метаболизме лекарств. Изоферменты SULT2 участвуют в биологической активации канцерогенов, например ПАУ. Изоферменты сульфотрансферазы семейства 3 (SULT3) катализируют N-сульфатирование ациклических ариламинов.

*Гены N-ацетилтрансфераз* (*NAT1 и NAT2*). Ацетилирование генетически детерминировано. NAT1 ацетилирует небольшое количество ариламинов и не обладает генетическим полиморфизмом.

NAT2 — основной фермент ацетилирования многих ЛС и других ксенобиотиков; для него характерен генетический полиморфизм.

Гены *NAT1* и *NAT2* являются близкими по первичной структуре (79-95% гомологии аминокислотной последовательности, в зависимости от вида).

Расположены на 8 хромосоме, но регулируются независимо друг от друга [Daniel W. Nebert et al. [Электронный ресурс]. Оба белка кодируются данными генами, которые не содержат интронов. Ферменты, кодируемые NAT, полиморфны, что фенотипически проявляется наличием в популяции «быстрых», «медленных», также выделяют и «средних» ацетиляторов [И. В. Голденкова-Павлова и др., 2006; М. В. Никишина, 2007; D. A. P. Evans, 1989].

*NAT1* экспрессируется в большинстве тканей организма, тогда как *NAT2*, по-видимому, только в печени и кишечнике. Эти ферменты отличаются по субстратной специфичности, хотя и имеется перекрывание.

Субстратами, предпочтительно N-ацетилируемыми человеческой NAT1, являются парааминосалициловая кислота, парааминобензойная кислота, сульфаметоксазол. Субстраты, преимущественно N-ацетилируемые при участии NAT2, включают изониазид, гидралазин, сульфаметазин, дапсон. Некоторые ксенобиотики, например, 2-аминофлуорен одинаково хорошо метаболизируются обоими ферментами.

Отмечено, что по специфическим субстратам NATI около 8% европеоидов являются медленными ацетиляторами [М. В. Никишина, 2007].

Ген *NAT2* локализован на коротком плече хромосомы 8 (8p23.1-21.3), отвечает за большинство вариантов токсической реакции на химические вещества, содержащиеся в окружающей среде. Кодирует аминокислотную последовательность цитозольного фермента N-ацетилтрансферазы 2 типа, который вырабатывается в печени, кишечнике и некоторых других органах и участвует во 2-й фазе метаболизма ксенобиотиков — детоксикации посредством ацетилирования – присоединения ацетил-группы.

Известно около 20 мутантных аллелей гена *NAT2,* представляющих собой сочетание нескольких точечных миссенс-мутаций. Все они наследуются по аутосомно-рецессивному типу.

Как правило, 95% представителей популяций имеют 5-6 наиболее распространенных аллельных вариантов, остальные аллели достаточно редкие, на их долю приходятся оставшиеся 5% индивидуумов.

В зависимости от носителей соответствующих аллельных вариантов подразделяют на «быстрых» и «медленных» ацетиляторов. Например, точковая мутация в 341 нуклеотиде приводит к аминокислотной замене Ile114 – Thr и снижает максимальную скорость N-ацетилирования без изменения связывания субстрата или стабильности фермента. Эта мутация часто встречается среди кавказской популяции, но редко среди азиатской.

Внутри фенотипа медленного ацетилирования существуют значительные вариации в скорости ацетилирования ксенобиотиков, поскольку различные мутации оказывают различное действие на активность и/или стабильность

NAT2. У «медленных» ацетиляторов значительным оказывается N-ацетилирование «NAT2-субстратов» при помощи NAT1.

К быстрым ацетиляторам относятся в частности аллели *4, *12, к медленным — *5a, *5b, *5c, *6, *7. Нормальным считается вариант *4.

Генетический полиморфизм *NAT2* оказывает токсическое и фармакологическое действие на метаболизм лекарств, которые N-ацетилируются этим ферментом.

«Медленные» ацетиляторы, которые к тому же дефицитны по G6PD, особенно склонны к гемолизу под действием определенных сульфонамидов. «Быстрые» ацетиляторы предрасположены к миелотоксическим эффектам амонафидов, поскольку N-ацетилирование замедляет выведение этих антинеопластических лекарств.

От активности фермента, активирующего процессы ацетилирования, зависит эффективность очистки организма от многих токсинов и онкогенов, что определяет связь аллельных вариантов с большим или меньшим риском различных заболеваний [D. A. P. Evans, 1989; M. Nacak [Electronic resource]. Показано, что «быстрые» и «медленные» ацетиляторы имеют разную степень риска развития рака мочевого пузыря и молочной железы, диабета, системной красной волчанки и других заболеваний.

Основной причиной изменения активности N-ацетилтрансферазы являются однонуклеотидные замены в структурной области гена *NAT2.*

Самые распространённые мутации гена *NAT2:* в 481 позиции цитозин заменяется тимином (встречается в кластере аллелей *NAT2*5 — NAT2*5A, NAT2*5B),* в 590 позиции гуанин заменяется аденином (встречается в кластере аллелей *NAT2*6–NAT2*6A и NAT2*6B).*

Для европейской популяции наиболее распространенными мутантными аллелями являются *NAT2*5B* и *NAT2*6A.* Аллель *NAT2*5B* образуется сочетанием трех точечных мутаций: 341T → C, 481C → T, 803A → G; аллель *NAT2*6A* − сочетанием двух: 282C → T, 590G → A. Оба варианта составляют до 70-75% всех аллелей *NAT2* и около 95% всех мутантных аллелей у европейцев, японцев и испанцев.

В гетерозиготном состоянии быстрые ацетиляторы являются доминирующими.

Аллельные варианты, относящиеся к быстрым ацетиляторам (аллели *4, *12 в гомозиготной или в гетерозиготной форме), связаны с повышенным риском колоректального рака.

Особенно повышен риск данного заболевания у людей, употребляющих большое количество мясной пищи, прошедшей интенсивную тепловую обработку, что связано с образованием в мясных продуктах

гетероциклических аминов, обладающих канцерогенным действием. У женщин, рацион которых содержит большое количество сильно проваренного или прожаренного мяса, повышен риск рака груди.

Быстрый тип ацетилирования характерен также для больных витилиго, для пациентов со спаечной болезнью, ангиной, аллергическим дерматитом, больных сахарным диабетом. Обнаружена предрасположенность носителей генотипов *5/*5 и *6/*6 к сахарному диабету.

Курильщики, обладающие аллелем *4 в гомозиготной форме, имеют повышенный риск рака легких.

«Медленные ацетиляторы», к которым относятся 50-60% европеоидов и 30-40% афроамериканцев, подвержены повышенному риску развития рака мочевого пузыря при контакте с амино- и аминоазосоединениями, что, как правило, бывает связано с профессиональной деятельностью.

Все эти вещества — промутагены, проявляющие генетическую активность в самых различных тест-системах.

Рак головы, шеи, пищевода, гортани, связанный с курением, значительно чаще встречается у медленных ацетиляторов. Риск аллергического контактного дерматита увеличен для носителей аллеля *4.

Вдыхание частиц асбеста, связанное с производством, более опасно для лиц с гомозиготным аллелем *4. У рабочих асбестового производства было выявлено повышение риска развития рака легкого у индивидуумов, имеющих фенотип медленного ацетилирования в сочетании с нулевым генотипом гена *GSTM1.*

Медленный тип N-ацетилирования характерен также для ревматоидного артрита, вирусного гепатита, системной красной волчанки, экземы, обструктивного бронхита, бронхиальной астмы.

У гомозиготных носителей аллеля *5 повышен риск бронхиальной астмы, особенно ее атопического компонента (увеличенный уровень общего IgE, гранулоцитоз).

Гены *SULT* (у человека 13) локализованы на 2, 4, 16, 19 хромосомах [S. J. Hebbring et al., 2009]. Из них наиболее изучены гены семейства SULT1A1, локализованные в 16 хромосоме, локусе 16p11.2, которые кодируют фермент термостабильную фенолсульфотрансферазу, катализирующую метаболизм многих лекарственных средств, нейромедиаторов, ксенобиотиков.

Ферменты SULT сульфатируют большой спектр промутагенов и проканцерогенов, инактивируют эстрогены и их метаболиты [Н. В. Зайцева и др., 2016; S. J. Hebbring. et al., 2009]. Полиморфизм гена *SULT1A1* связан с повышенным риском ряда онкологических заболеваний (рак молочной железы, эндометрия, легких и др.).

Ген глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы *(G6PD)* локализован в Х хромосоме, состоит из 13 экзонов и 12 интронов [G6PD-Ген [Электронный ресурс]. В гене *G6PD* выявлено 16 Alu последовательностей, что составляет 24% нуклеотидной последовательности гена ( E. Y. Chen at al., 1991).

Alu повторы встречаются в трех точках гена: три Alu элемента и один неполный Alu элемент локализованы в 5'нетранслируемой области гена, 12 Alu элементов расположено в самом большом втором интроне. Недостаточность фермента, обуславливающая гемолитическую анемию, наследуется как сцепленный с Х-хромосомой рецессивный признак.

Различные точечные мутации объясняют высокую степень гетерогенности среди индивидуумов с дефицитом G6PD [Daniel W. Nebert et al. [Электронный ресурс]. Гетерозиготные женщины встречаются чаще, чем гемизиготные мужчины. Все эритроциты мутантного происхождения у гомозигот ХХ и у гемизигот ХУ чувствительны к провоцирующим факторам: лекарствам, промышленным окислителям.

Дефицит G6PD отмечается у более 300 миллионов людей во всем мире. Более 10% афроамериканских мужчин обладают менее сильным фенотипом, в то время как у некоторых групп населения Сардинии отмечается более сильный «средиземноморский тип» с частотой один житель из каждых трех.

Гены, кодирующие ферменты метилирования чужеродных ксенобиотиков, практически не изучены. Имеются данные о полиморфизме гена цитоплазматической тиопурин-S-метилтрансферазы (TPMT), катализирующей в основном S-метилирование ароматических и гетероциклических сульфгидрильных лекарственных соединений (цитостатиков, производных тиопурина), и мембраносвязанной тиол-S-метилтрансферазы (TMT), катализирующей преимущественно алифатические сульфгидрильные вещества [Клиническая фармакокинетика..., 2009; TPMT [Электронный ресурс]. Выявлен ряд мутаций гена *TPMT,* определяющих её низкую активность.

В европейской популяции в гене *TPMT* чаще всего встречаются два полиморфизма: G460A (*3B) и A719G (*3C), приводящие к снижению активности фермента в 1,4 и в 9 раз соответственно.

Распространенность в европейских популяциях A719G составляет 4%. Оба полиморфизма составляют 80% всех мутантных аллелей гена *TPMT.* Сочетание обоих аллелей приводит к полной потере активности фермента [T. Hung-Liang et al., 1996].

Распространённость гомозигот по мутантным аллелям, определяющим низкую активность TPMT, среди европейского населения составляет 3,7%, среди афроамериканцев 4,6%. Повышенная чувствительность к тиопуринам отмечается не только у гомозигот, но и у гетерозигот по мутантным аллелям

гена *TPMT*.

Ген *COMT* кодирует белок — цитозольный фермент, катализирующий присоединение метильной группы к различным катехоламинам (адреналин, норадреналин, дофамин), локализован на хромосоме 22q11.21 [R. Winqvist et al., 1992].

Активность COMT регулирует количество активного дофамина и норадреналина в различных областях мозга, влияет на настроение и другие психические процессы. Является одним из факторов, определяющих стрессоустойчивость [База знаний [Электронный ресурс].

Участок ДНК в составе гена *COMT,* в котором происходит замена гуанина (G) на аденин (A) в позиции 472, называется генетическим маркером G472A. Частота встречаемости аллеля *A* в европейской популяции составляет 52%.

Данный маркер ассоциирован с такими заболеваниями, как шизофрения и другие психические расстройства, алкоголизм, рак молочной железы [M. Jungestrom, S. Wingren, 2001; H. M. Lachman et al., 1996; M. Bergman-Jungestorm, S. Wingren, 2001; J. J. Tiihonen et al., 1999; J.-M. Woo et al., 2002].

Степень активности фермента COMT определяется следующими аллелями:

G/G – нормальная ферментативная активность;

G/A – сниженная ферментативная активность;

A/A – значительно сниженная ферментативная активность (в 3-4 раза, по сравнению с G/G генотипом).

Полиморфизм гена *COMT* влияет на развитие алкоголизма, так как COMT участвует в метаболизме допамина, вызывающего этанолиндуцированную эйфорию. У унаследовавших аллель *A* людей уровень инактивации допамина снижен, поэтому они более подвержены развитию алкогольной зависимости. Полиморфизм COMT также влияет на эффективность ряда лекарственных препаратов. Например, при лечении амфетамином, пациенты с генотипом *A/A* входят в группу риска неблагоприятного ответа на терапию.

Ген *MTHFR* кодирует фермент метилентетрагидрофолатредуктазу, участвующую в метилировании тяжелых металлов, пестицидов.

Ген *MTHFR* имеет 758 полиморфных вариантов [К. Д. Иевлева и др., 2016]. Из них 74 — ассоциированы с патологическими состояниями, в том числе обусловливающими повышение уровня гомоцистеина в клетках, о роли которого в патогенезе различных заболеваний будет сказано далее (в гл. 8 и 9).

*Полиморфизмы генов ALDH. Гены алкагольдегидрогеназы человека включают:* ALDH1 (ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH1B1, ALDH1L1, ALDH1L2), ALDH2, ALDH3A (ALDH3A1, ALDH3A2, ALDH3B1, ALDH3B2),

ALDH4A1, ALDH5A, ALDH6A1, ALDH7A1, ALDH8A1, ALDH9A1, ALDH16A1, ALDH18A1.

Генетические варианты генов *ALDH* могут способствовать изменениям в метаболизме алкоголя, которые связаны с торможением окисления ацетальдегида и его накоплением.

В клетках печени присутствуют 2 альдегиддегидрогеназы: цитозольная (ALDH1) и митохондриальная (ALDH2 – Arg47His) [В. С. Баранов и др., 2000; Биохимия, 2009; Клиническое значение. [Электронный ресурс]. Большинство европейцев имеют оба основных изофермента.

Гены *ALDH1* и *ALDH2* расположены в кластере на хромосоме 4q22-23М на хромосоме 12q24.2 соответственно.

Ген *ADHIB* кодирует фермент алкагольдегидрогеназу, которая у взрослого человека экспрессируется в печени. Алкогольдегидрогеназа 1В окисляет спирты до альдегидов.

Полиморфизм *ADH1B*2* (R47H G->A) алкогольдегидрогеназы — благоприятная мутация для употребляющих алкоголь [Клиническое значение. [Электронный ресурс]. Лица с этим аллелем имеют повышенную чувствительность к этанолу и менее подвержены алкоголизму [Т. В. Желобенко, Д. С. Сергеев [Электронный ресурс], так как мутация 47Н приводит к повышенной скорости распада этанола и ускорению удаления спирта из крови.

Распространенность мутации составляет 4-8% в европейских популяциях. Встречаемость варианта ADH1B*2 гораздо ниже у больных алкоголизмом.

Наличие варианта ADH1B*2 соответствует значительному понижению риска алкогольного цирроза печени, является защитным фактором, понижающим риск инсультов. Вместе с тем в три раза более высокая частота варианта ADH1B*2 отмечается у пациенток с раком груди.

Ген *ALDH2* состоит из 13 экзонов, кодирует митохондриальную альдегиддегидрогеназу. ALDH2 участвует в превращении токсичных альдегидов в карбоновые кислоты, легко удаляемые из организма; играет важную роль в катаболизме алкоголя.

Неблагоприятные варианты генов альдегиддегидрогеназы *ALDH2* повышают риск развития таких осложнений злоупотребления алкоголем, как алкогольная болезнь и цирроз печени. Известно более 20 мутантных аллелей.

Полиморфизм *ALDH2*2* (E487K G->A) связан со сниженной активностью фермента альдегиддегидрогеназы, что способствует быстрому развитию различных форм рака, связанных с чрезмерным потреблением алкоголя. Отсутствие активности фермента ALDH2 является причиной более сильного воздействия алкоголя, наблюдаемого у азиатских и северных народностей.

Полиморфизм *ALDH2*2* встречается у 50% представителей монголоидной

расы и практически не встречается у представителей кавказской и негроидной рас.

У пациентов с мутацией *ALDH2*2* происходит накопление ацетальдегида в крови, приводящее к быстрому развитию алкогольной болезни и/или циррозу печени.

Исследование пациентов, находящихся на различных стадиях алкогольного повреждения печени, показало, что гетерозиготный генотип G/A *ALDH2*2* приводит к более серьезному повреждению печени. В частности, у пациентов с мутацией *ALDH2*2,* регулярно принимавших небольшие количества алкоголя, повреждения печени были сильнее, чем у пациентов без этой мутации, принимавших более 100 г этанола в день.

Отмечена связь варианта 487K с количеством потребления алкоголя и уровнем ЛПВП-холестерина. При наличии варианта 487K риск инфаркта миокарда повышается в 1,6 раз. Прием алкоголя увеличивает риск развития периодонтита и его более тяжелых форм.

Наличие в генотипе человека аллеля, кодирующего активную форму алкогольдегидрогеназы (p.48His, c.143A, ADH1B*2) и/или неактивную форму альдегиддегидрогеназы (p.504Lys, c.1510A, ALDH2*2), повышает концентрацию альдегида, вызывающего ряд таких неприятных симптомов, как тошнота, головокружение, гиперемия кожных покровов лица, субъективно оцениваемые «неприятные ощущения» в теле и т.д., что приводит к более редкому употреблению алкоголя и употреблению его в меньших количествах. Чувствительность к алкоголю среди лиц с этим мутациями возможно связана с традиционным питанием [A. V. Avksentyuk et al., 1995; S. U. Luu et al., 1995].

Так, около 70%-80% населения Китая и Японии являются носителями одной или обеих упомянутых мутаций: для коренного населения Юго-Восточной Азии характерно сочетание «быстрых» ферментов первого этапа с «медленными» ферментами второго этапа метаболизма этанола. В результате при приеме спиртного этанол быстро перерабатывается в токсичный ацетальдегид (первый этап), а его дальнейшее удаление (второй этап) происходит очень медленно. Такой вариант метаболизма алкоголя приводит к тому, что при приеме одних и тех же доз этанола концентрация альдегида в крови азиатского населения в 10-30 раз выше, чем у европейцев [S. U. Luu et al., 1995].

Ген *EPHX2,* кодирующий фермент эпоксидгидролазу 2, располагается в восьмой хромосоме, локусе 8p21–p12 [Клиническая фармакокинетика, 2009]. EPHX2, локализованная в цитоплазме и пероксисомах, играет небольшую роль в метаболизме ксенобиотиков.

Ген *БХА* расположен на хромосоме 3 в регионе 3q26.1-q26.2, занимая локус

длиной 64660 п.н. на минус-нити, кодирует фермент бутирилхолинэстеразу человека [Н. П. Бочков и др., 2011; Н. Н. Каркищенко, 2007; Клиническая фармакокинетика, 2009; И. Д. Курдюков и др., 2012; Е.В Рудакова, 2014].

Уровень экспрессии гена БХЭ очень высок — в 4 раза выше среднего. Встречаются множественные мутации БХЭ. «Медленные» аллельные варианты гена (A209G и др.) вызывают снижение ее активности.

Снижение синтеза БХЭ, связанное с заменой в нуклеотидной последовательности в 209-м положении аденина на гуанин, представляет наиболее распространенную мутацию. В результате синтезируется фермент, у которого в 70-м положении аспартат заменён на глицин. Его обычно называют атипичной бутирилхолинэстеразой 1. Наследуется эта аномальная реакция по аутосомно-рецессивному типу.

Мутантный фермент с низкой аффинностью может стать причиной летального исхода при введении миорелаксанта сукцинилхолина. С помощью ингибирования БХЭ анестетиком дибукаином определяют повышенную чувствительность к сукцинилхолину.

Дибукаин угнетает нормальную БХЭ на 80% (дибукаиновое число 80), тогда как атипичную БХЭ лишь на 20% (дибукаиновое число 20). Если дибукаиновое число 40-60, то обследуемое лицо следует отнести к гетерозиготным по атипичной БХЭ, у него будет среднее удлинение сукцинилхолинового блока. Если дибукаиновое число 20, то человек относится к гомозиготным по атипичной БХЭ, у него будет выраженное продление сукцинилхолинового блока. Повышенная чувствительность к суксаметонию наблюдается у гомозигот.

Разные мутации гена *БХЭ* ведут к апноэ разной длительности, и гомозиготы встречаются с разной частотой (от 1 : 3000 до 1 : 150000 ). Частота гомозигот по всем мутантным аллелям, определяющим сниженную активность

БХЭ: у европейцев – 1 : 2500, у чехов и словаков – 1 : 400, у жителей Ирана и Ирака – 1 : 400. Распространенность гетерозигот следующая: у европейцев 2-4 : 100, у чехов и словаков – 7 : 100, у жителей Ирана и Ирака – 10 : 100.

Примерно 1 из 2500 американцев является гомозиготным носителем мутации D70G. «К-вариант», встречается гораздо чаще: носителем является 1 житель США из 4, а 1 из 64 - гомозиготный носитель [В. И. Шмурак и др., 2012]. У носителей «К-варианта» снижено количество циркулирующей в крови БХЭ (примерно на 33%), тогда как молярная активность (число оборотов) БХЭ не меняется.

Мутация в молекуле БХЭ обнаружена в положении A539T, хотя полагают, что причиной снижения количества БХЭ является неизвестная пока еще мутация в промоторе или энхансере.

Гены карбоксилэстеразы. Наиболее изучены *CES1, CES2, CES3*, которые кодируют семейство КЭ, осуществляющих гидролиз липофильных химических соединений (алифатических и ароматических эфиров) до соответствующих водорастворимых свободных кислот и спиртов или аминов, способствуя их элиминированию [И. Д. Курдюков и др., 2012; Е. В. Рудакова, 2014; Е. А. Шестеренко и др., 2013].

Гены *КЭ* человека находятся в локусе 16q13-q22.1. Наибольший уровень экспрессии имеет ген *CES2,* несколько меньший — *CES1* (соответственно в 4,5 и в 3,4 раза выше среднего). Ген *CES3* на 40% идентичен по своей последовательности генам *CES1* и *CES2* и имеет невысокий уровень экспрессии.

Ген *CES1* кодирует КЭ, инактивирующие эфир метилфенидат, назначаемый детям при синдроме дефицита внимания и гиперактивности.

Медленное выведение и высокая концентрация препарата в крови обусловлены двумя мутациями на разных аллелях *CES1: G143E* в оксианионной полости фермента и Asp260fs (frameshift, сдвиг рамки считывания, в результате получается укороченный фермент). В обоих случаях практически отсутствует активность фермента.

Мутации G143E и Asp260fs обусловливают неэффективность препарата озельтамивира, который используется для лечения и профилактики гриппа А и Б, птичьего гриппа A/H1N1, а также пролекарства, трандолаприла, селективного ингибитора ангиотензинпревращающего фермента.

Гены параоксоназы *(PON-1, PON-2, PON-3)* картированы в локусе 7q21.3, рядом с геном *АХЭ* (7q22) и недалеко от гена циститного фиброза CSTR (7q31.2), кодируют фермент параоксоназу [Г. Н. Владимиров и др., 2009; В.Г. Кукес и др., 2007; И. Д. Курдюков и др., 2012].

Гены *PON-1* и *PON-2* имеют по девять экзонов каждый, однако PON-1 имеет 10 альтернативных промотора и 4 валидированных сайта полиаденилирования, тогда как у гена *PON-2* — 4 альтернативных промотора и 11 сайта полиаденилирования [В. С. Баранов, Е. В. Баранова [Электронный ресурс].

В начале 70-х годов XX века появились первые сообщения о наличии различий в активности параоксоназы среди населения [Клиническая фармакокинетика, 2009]. Она обладает широкой субстратной специфичностью, первичным субстратом в норме для нее являются окисленные липиды.

PON-1 и PON-3 содержатся в плазме крови, PON-2 является внутриклеточным ферментом.

В 90-е годы были идентифицированы мутации гена *PON.* Известно более

200 единичных нуклеотидных полиморфизмов гена *PON-1,* наиболее распространенными и изученными являются замены в кодирующей области 2 генов: L55M и Q192R. Ген *PON-2* имеет два распространенных полиморфизма: G148A и C311S.

В гене *PON-1* распространена мутация замены лейцина (L) на метионин (M). Частота встречаемости Leu55 и Met55 составляет, соответственно, 0,65 и 0,35 в США и европейских странах, тогда как в Японии – 0,94 и 0,06. Вариант Leu55 имеет более высокую активность по отношению к фенилацетату. Данный эффект объясняется пониженной стабильностью M-изоформы фермента, а также другим полиморфизмом C/T в положении − 108, по которому связывается транскрипционный фактор Sp1.

Аллель Met ассоциирована со сниженным метаболизмом ФОС [И. Д. Курдюков и др., 2012]. Существуют противоречивые сведения о роли полиморфизма L55M PON-1 в развитии ИБС [Л. И. Колесникова и др., 2013].

Носители Met-аллеля имеют повышенный риск этой патологии. Однако носители Leu-аллеля могут быть склонны к снижению антиоксидантной защиты и соответственно к развитию ИБС.

Аллель M и M/M-генотип увеличивают риск развития болезни Паркинсона, особенно в сочетании с B-аллелем гена *GSTPI.* CC(-108) генотип является протективным фактором, снижающим риск развития инфаркта миокарда.

Полиморфизм Q192R существенно влияет на каталитическую активность PON-1. В человеческой популяции наибольшее значение имеет замена глутамина (Q) на аргинин (R) в 192 положении (мутация Gln192Arg). Эта мутация наследуется по аутосомно-рецессивному типу [Клиническая фармакокинетика, 2007].

Носители мутации параоксоназы Gln192Arg, особенно гомозиготы, более чувствительны в отношении фосфорорганических соединений.

Группы пациентов с хроническими ФОС-индуцированными патологиями (результат длительного контакта с диазоксоном) имеют высокую встречаемость *PON-1* 192R полиморфизма. Распространённость гомозигот по этой мутации среди испанского населения составляет 16%, среди североевропейского населения – 9%.

Наибольшая распространённость данной мутации зафиксирована в Японии и составляет 41,4%. Именно это обстоятельство явилось причиной больших жертв при применении зарина во время террористического акта в Токийском метро в марте 1995 г.

192R-форма параоксоназы гидролизует параоксон в несколько раз быстрее, чем 192Q-форма. Данный полиморфизм связан с субстратной специфичностью фермента. Развитие дислипопротеинемии выше у носителей

гомозигот PON1*R/*R.

Риск развития сердечно-сосудистых заболеваний связан с пониженной активностью по параоксону [M. Wang, et al., 2011] и зависит главным образом от концентрации PON1 в крови. Аллель Gln192 (Q) значимо эффективнее в защите от ЛПНП от окисления, чем мутантный вариант Arg 192 (R).

Встречаемость гена Gln192 варьирует от 0,75 у жителей Кавказа до 0,3 у азиатского населения. Мутация в гене *PON1* (полиморфизм Q192R A>G) может являться полезной с точки зрения предупреждения развития атеросклероза.

Хотя при варианте 192Arg (192R) синтезируется более активная форма параоксоназы, однако она хуже защищает ЛПНП от окисления, что может увеличивать риск развития атеросклероза сосудов.

Показана ассоциация аллеля 192Arg с повышенным сердечно-сосудистым риском (ИБС, ишемический инсульт и др.) [Р. Г. Газизова, 2007; Т. В. Мартынович и др., 2014].

В некоторых случаях развивается устойчивость к действию инсулина, что увеличивает риск развития диабета. У больных сахарным диабетом наличие этого аллеля в 9 раз увеличивает риск развития ИБС.

Сердечно-сосудистый риск имеет обратную зависимость от уровня липопротеидов высокой плотности. Отмечен синергический эффект двух и более полиморфизмов на токсическую реакцию. Примерно в 98% случаях вариант аллеля Arg192 связан с вариантом Leu55.

Варианты полиморфизмов гена *PON1* (Leu54Met (-107C>T) и Gln192Arg) используются как маркеры повышенного риска кардиоваскулярных и атеросклеротических заболеваний. Снижение антиокислительной активности от ПОЛ наблюдается у носителей Leu55- и Arg192 аллелей *PON1.*

Частоты встречаемости вариантов -107C>T, Leu54Met и Gln192Arg в европейских популяциях составляют 40-45%, 30-35% и 40-45% соответственно.

Носительство RR191 генотипа гена *PON1* оценено как независимый фактор риска развития инфаркта миокарда у мужчин до 45 лет. Кроме того, обнаружен ряд полиморфизмов PON1 в области промотора, необходимых для связывания транскрипционных факторов.

Существенным для активности фермента оказался полиморфизм C/T в позиции -108, связанный с повышенным риском развития рака простаты [M. C. Blatter Garin et al., 1997].

Замена пролина на лейцин в позиции 90 значительно снижает активность фермента. Замена изолейцина на валин в позиции 102 также характеризуется низкой параоксоназной активностью.

Встречается замена триптофана в позиции 194, оказывающая заметное влияние на параоксоназную активность в сыворотке крови.

Ещё одним важным полиморфизмом является A(-162)G, при котором заметно снижается активность параоксоназы в сыворотке крови [V. H. Brophy et al., 2001]. Замена изолейцина на валин в позиции 102 характеризуется низкой параоксоназной активностью и может быть связана с повышенным риском развития рака простаты.

Регуляция экспрессии гена *PON-1* у человека осуществляется широким спектром веществ: статины, фибраты, желчные кислоты, этанол, полифенолы, ацетилсалициловая кислота [В. С. Баранов, Е. В. Баранова [Электронный ресурс]. Атерогенная диета и воспалительные процессы оказывают влияние на характер экспрессии этого гена.

Транспортные белки 3-й фазы биотрансформации — Р-гликопротеины, принадлежащие к семейству плазменно-мембранных белков, кодируются генами *MDR* (в частности геномом человека *ABCD1,* именуемым также MDR1) [Н. Н. Каркищенко, 2007; Клиническая фармакокинетика, 2009; В. Г. Кукес и др., 2007].

Анионные транспортеры OATP кодируются генами *SLCO, OAC — SLC22A1,* катионные транспортеры (OCT) — SLC22A [В. Г. Кукес и др., 2007].

У человека ген *MDR1* (multidrug resistance 1) локализован в локусе 7q21.1, состоит из 28 экзонов, кодирует P-gp, который входит в семейство АТФ-связывающей кассеты транспортеров [И. С. Полякова и др., 2011].

Одной из наиболее значимых мутаций в гене *MDRI* является замена последовательности нуклеотидов в позиции 3435 в 26-м экзоне (C3435T) [I. Cascorbi et al., 2001]. Данная мутация не сопровождается изменением структуры кодируемого Р-гликопротеина, но при наличии 3435 TT-генотипа установлено снижение генной экспрессии в 2-3 раза.

Мембранные белки Р-гликопротеиды с молекулярной массой 170000 и MRP (белок полирезистентности) с молекулярной массой 190000, относящиеся к семейству ABC-переносчиков, в избытке экспрессируются полирезистентными линиями перевиваемых опухолевых клеток.

Р-гликопротеин, кодируемый геном *ABCB1,* имеет наибольшее значение для устойчивости к ЛС — цитостатикам.

Описано более 50 аллелей гена *ABCB1,* наиболее распространены полиморфизмы в экзонах 12 (1236C>T), 21 (2677G>T/A) и 26 (3435C>T). Лишь полиморфизм в 21-м экзоне влияет на аминокислотную последовательность, причем возможны 2 варианта: Ala893Ser и Ala893Thr.

Основное внимание уделяется полиморфизму 3435C>T: хотя он и не меняет структуру белка, но в ряде экспериментов снижал стабильность мРНК,

уменьшая количество Р-гликопротеина.

Среди полиморфизмов гена *ABCG2,* кодирующего белки, устойчивые к химиотерапии рака молочной железы, наиболее известны 421C>A (с заменой Gln141Lys и вероятным снижением активности) и 376C>T (с появлением стоп-кодона). Первый встречается среди 10% европейцев и 30% азиатов, второй выявлен лишь у азиатов.

Активность Р-гликопротеина зависит от множества факторов, основной из которых — полиморфизм гена *MDRI,* кодирующего Р-гликопротеин.

В настоящее время активно изучают клиническое значение четырёх полиморфных маркёров, представляющих собой замену в нуклеотидной последовательности ДНК одного нуклеотида на другой (так называемые однонуклеотидные полиморфизмы).

Наибольшее клиническое значение имеет полиморфный маркёр C3435T, представляющий собой замену в нуклеотидной последовательности цитозинового нуклеотида на тимидиновый в положении 3435.

Частота аллелей и генотипов по полиморфному маркёру C3435T значительно варьирует в различных этнических группах.

В исследованиях in vitro было показано, что у индивидуумов с генотипом *TT* отмечают снижение экспрессии гена *MDRI* в двенадцатиперстной кишке, в CD56+-лейкоцитах, в почках.

Очевидно, что снижение экспрессии гена *MDRI* в кишечнике и почках должно приводить к снижению количества гликопротеина-Р в этих органах и, следовательно, к более полному всасыванию и замедленному выведению ЛС. В результате у индивидуумов с ТТ-генотипом обнаруживают высокие концентрации ЛС-субстратов гликопротеина-Р в плазме крови, в частности, иммуносупрессантов (циклоспорина, такролимуса).

Кроме того, у лиц с ТТ-генотипом наблюдают усиление проникновения ЛС через гематоэнцефалический барьер, что может приводить не только к повышению риска развития нежелательных лекарственных реакций со стороны ЦНС, но и в случае, если мишени ЛС находятся в головном мозге, – к повышению эффективности терапии.

Важную роль в метаболизме лекарственных средств играют белки-переносчики семейства OATP, кодируемые генами *SLCO* (ранее название SLC21).

В геноме животных и человека выявлено более 150 генов, которые состоят из 11 членов. Семейство OATP содержит 12 белков, среди которых три — OATP1B1, OATP1B3.

OATP2B1 — находятся на базолатеральной мембране гепатоцитов, обеспечивая захват печенью препаратов и естественных метаболитов

[Nakanishi T, I. Tamai, 2012].

Гены, кодирующие семейство OATP1, расположены на коротком плече 12 хромосомы (12p12).

В настоящее время наиболее хорошо изучено влияние генетического полиморфизма *SLC01B1* (OATP-C) на фармакокинетику и фармакодинамику статинов. Доказано, что носительство определённых аллельных вариантов данного гена, кодирующего полипептид С, который транспортирует органические анионы (OATP-C или SLCO1B1), приводит к сниженной активности. Это проявляется увеличением периода полувыведения, площади под фармакокинетической кривой и снижением клиренса ряда статинов (питавастатинар, правастатина, розувастатина), перорального гипогликемического ЛС репаглинида, а также нового гиполипидемического ЛС эзетимиба и его активного метаболита.

Описано порядка 20 полиморфизмов гена *SLC01A2,* кодирующего OATP-A [В. Г. Кукес и др., 2007], но из них только одна нуклеотидная замена, A5I6C, приводит к замещению аминокислоты Glu на Asp в положении 172, что вызывает снижение транспортной активности.

Также как OATP-A, OATP-C обладает широкой субстратной специфичностью и участвует в выведении из организма желчных кислот, сульфатных и глюкуроновых конъюгатов, тиреоидных гормонов, пептидов, ЛС (правастатин, метотрексат, рифампин).

Полиморфизм гена *SLC01B1* влияет на фармакокинетику веществ, метаболизируемых в печени. Скринингом кодирующей области гена было идентифицировано более 20 нуклеотидных замен, причем ряд аллельных вариантов сопровождается снижением транспортной активности OATP-C.

Идентифицировано 4 переносчика семейства OAT (OAT1-OAT4), встречающиеся у многих организмов.

Гены *SLC22A1,* 2 и 3 расположены на 6 хромосоме (6q26), кодируют белки OCT1, OCT2 и OCT3, которые отвечают за попадание в клетки органических катионов. Белок OCT1 содержится главным образом в печени, OCT2 — в почках, OCT3 — во многих органах и тканях [G. Ciarimboli et al., 2012].

Структурно OAT представляют собой белки длиной 526-568 аминокислотных остатка, и содержат 12 трансмембранных доменов. Кроме того, эти транспортеры имеют гликозилированный участок между трансмембранными доменами 1 и 2 (на наружной стороне мембраны), сайты фосфорилирования между трансмембранными доменами 6 и 7, а также после 12-го домена (на внутренней стороне мембраны).

Фосфорилирование соответствующих сайтов может играть важную роль в регуляции активности OAT [В. Г. Кукес и др., 2007; D. H. Sweet et al., 2001].

ОАТ1 участвует в выведении через почки в мочу многих ЛС. Обнаружено значительное количество замен нуклеотидов в генах транспортеров: 17 у ОАТ1, 16 у ОАТ3, но при этом не выявлено изменений общей транспортной активности в опытах in vitro.

Не исключено, что такие различия могут иметь место избирательно для узкого круга соединений, в том числе ЛС и других ксенобиотиков – субстратов ОАТ. У носителей распространенного полиморфизма гена *SLC22A2* 808G>T, ведущего к замене аланина в 270-м положении на серин (Ala270Ser) и снижению сродства белка-переносчика ОСТ2 к ряду субстратов, отмечено снижение риска нефротоксичности [H. Burger et al., 2011].

Основные «неблагоприятные» аллели генов, кодирующих транспортеры ксенобиотиков (Pgp и транспортеров органических анионов), представлены в таблице 3.14.

Среди полиморфизмов гена, кодирующего Р-гликопротеин, наибольшее клиническое значение имеет С3435Т, связанный с изменением уровня экспрессии.

Таблица 3.14 – Носительство «неблагоприятных» аллельных вариантов, кодирующих транспортеры ксенобиотиков [В. Г. Кукес и др., 2007]

| Ген | Аллельные варианты | Изменение активности транспортеров ксенобиотиков |
|---|---|---|
| *MDR1* | С3435Т, G2677Г, G2677A, C1236T | Снижение активности гликопротеина-Р |
| *OATP-C* | *OATP-C*1b, OATP-C*15*, T521C, G11127A | Снижение активности транспортера органических анионов С (OATP-C) |

При оценке реакции на действие химических токсикантов отмечено, что характерным является более сильная токсичная реакция на большее воздействие.

Вместе с тем имеются чувствительные индивидуумы — это лица с повышенной реакцией на относительно малую дозу или воздействие, а также устойчивые индивидуумы — с пониженной реакцией на более высокую дозу или воздействие

Лица с экстремально различной ответной реакцией по сравнению с большинством индивидуумов в популяции представляют важные генетические варианты для выяснения базовых механизмов, ответственных за заболевания, вызванные воздействием окружающей среды (фенотип). В этом плане активно проводятся исследования связи особенностей нарушения состояния здоровья с влиянием химического фактора на лиц, имеющих

генетические мутации [Генетический паспорт..., 2009; С. Р. Мингазова, 2011; В. А. Спицин и др., 2006; Ю. И. Черняк, 2005].

Следует учитывать, что реакции на химический агент, содержащийся в окружающей среде, в том числе процессы биотрансформации, могут быть значительно усилены при комбинации двух и более токсико- или фармакокинетических дефектов у индивидуума, например, комбинированный эффект полиморфизма изоформ генов *CYP* и делеции GST; NAT2 и полиморфизма G6PD.

Высокую генотоксическую чувствительность имеют лица с генотипами 1-й и 2-й фазы биотрансформации (CYP1A1 C/C и GSTM1 «0/0», GSTT1 «0/0») [Полиморфизмы генов [Электронный ресурс].

Установлено, что при приеме определенных лекарств индивидуумы с комбинацией дефицита G6PD и фенотипом с медленной ацетиляцией (NAT2) подвергались более сильному воздействию, чем индивидуумы только с дефицитом G6PD или только с фенотипом с медленной ацетиляцией.

Дефицит G6PD в сочетании с медленной ацетиляцией как минимум в 40 раз усиливает восприимчивость к гемолизу, вызванному тиозосульфоном, чем у лиц с нормальным уровнем G6PD и быстрой ацетиляцией [Библиотека НЕФТЬ-ГАЗ [Электронный ресурс].

Отмечено, что риск одинаковых уровней негативного воздействия токсичных химикатов ксенобиотиков на здоровье людей в зависимости от полиморфизма генов биотрансформации может варьировать в границах двух или трех порядков. То есть биомониторинг не может быть эффективным без информации о генетическом строении индивидуума.

В случае идентичного воздействия опасного химического вещества на разных индивидуумов, уровень гемоглобина (или других биомаркеров) может варьировать в зависимости от «метаболического отпечатка» конкретного человека [В. С. Баранов и др., 2000].

Так, аддукты гемоглобина среди работников, подвергавшихся воздействию анилина и ацетанилида, были на самом высоком уровне у людей с дефицитом G6PD и медленной ацетиляцией по сравнению с другими возможными комбинированными токсикогенетическими эффектами.

На повышенную чувствительность к НДМГ указывает наличие у больных профессиональным токсическим гепатитом генетических маркеров предрасположенности организма к развитию профессиональных заболеваний по вариантам Ile/Val гена *CYP1A1,* Tyr/His гена *EPHX1;* комбинации *4/*7 гена *NAT2;* а также медленного фенотипа микросомальной эпоксидгидролазы; комбинации генотипов IleVal/ClCl генов *CYP1A1* и *CYP2E1;* комбинации медленных фенотипов [О. В. Макарова, 2004].

В процессе биотрансформации НДМГ с участием цитохрома Р450 в монооксигеназной системе печени образуются фермент-субстратные комплексы, распад которых сопровождается образованием супероксиданион радикалов, обуславливающих токсичность.

По данным В. И. Мининой и соавт. (2011), факторы теплоэнергетического комплекса (сажа, металлы, летучие органические соединения — ПАУ) вызывают негативное воздействие на генетический аппарат рабочих, что выражается в высоком уровне хромосомных аберраций (ХА).

Нулевые генотипы *GSTM1* и *GSTT1* также ассоциированы с более высоким уровнем хромосомных аберраций, индуцированных химическими мутагенами. Причем у лиц, которые курят, мутагенный и канцерогенный риски выражены особенно сильно.

С. Р. Мингазова (2011) отмечает, что протективными маркерами развития профессионального бронхита явились аллель *2С гена *CYP1A1,* генотип *Л*С гена *CKTP1* и фенотип Т7 гена *EPHX1.* Сочетание дефицитного генотипа *GSTT1*0*0* с *GSTM1*0*0* (p=0,013) или с *CYP2E1*1A*5B* (p=0,048) ассоциировано с выраженными обструктивно-рестриктивными нарушениями функции внешнего дыхания.

Генотип *1А*2С гена *CYP1A1* ассоциирован с более легким течением пылевого бронхита (генотип *1А*2С встречался с частотой: 35,3% у больных с легкой степенью тяжести заболевания, 22,2% – со средней степенью тяжести, 12,5% – с тяжелым течением).

Для оценки особенностей формирования наследственной предрасположенности к развитию профессионального хронического бронхита (ПХБ) проведен анализ полиморфных локусов генов, кодирующих ферменты 1-й и 2-й фаз биотрансформации (CYP1A2, CYP2F1, NQO1, GSTP1, UGT2B7) и АОС (CAT), с учетом этнической принадлежности, стажа работы на вредных производствах, статуса и индекса курения [Л. З. Ахмадишина и др., 2014].

Выявлены следующие генотипы риска развития ПХБ: СС локус (465С > Т) NQO1, СС локус (2146С > Т) UGT2B7, Т/delT локус (-2467- delT) CYP1A2.

Статистически значимые связи с курением определены для полиморфного локуса *UGT2B7* (2146С > Т) и для локуса *CYP2F1;* со стажем работы — для локусов *IL1RN* (VNTR), *VDBP* (1307С>А), *CYP1A1* (3798Т>С).

Развитие ПХБ у некурящих рабочих детерминировано комбинацией ДНК-локусов *TIMP3* (~1296Т>С), *LTA* (252А>G), ILIO (-627С>А), *VDBP* (1292Т>G) [Г. Ф. Корытина, 2012].

Генетическими маркерами устойчивости организма к воздействию производственных факторов являются генотип *AG* гена *GSTP1* (313А>G'), генотип n/ins гена *CYP2F1* (c.I415insC), генотип *AG* гена *MMP9* (2660А>G) и гаплотип

С-Т гена *CAT* по локусам -262C>T и 1167 C>T.

3. А. Шангареева и соавт. (2003) показали, что для пациентов, страдающих алкогольным поражением печени, характерно повышение частот мутантных аллелей генов *CYP2E1, CYP1A1, mEPHX,* GSTT1 и *GSTM1,* особенно рисковую значимость имеет увеличение гетерозиготных генотипов генов *CYP2E1, CYP1A1, mEPHX.*

Продукты, образующиеся в ходе метаболизма ряда ксенобиотиков с участием глутатионовых S-трансфераз, способствуют атерогенезу и нестабильности тромбоцитов [Н. П. Бочков и др., 2011].

«Нулевой» генотип гена *GSTM1* играет протективную роль в развитии инфаркта миокарда, причем эффект более выражен у курильщиков [D. T. Wright et al., 1994].

Вероятно, наличие «нулевого» генотипа по генам *GST* способствует регуляции ферментов, активно участвующих в метаболизме атерогенных субстратов с учетом широкой субстратной специфичности.

Имеются данные о скоординированной экспрессии *GSTM1* и *GSTM3* в легочной ткани человека [S. Anttila et al., 1995], а также о более высокой активности CYP1A2 у индивидуумов с нулевым генотипом *GSTM1* [S. MacLeod,et al., 1997].

В результате однонуклеотидной замены аденина на гуанин в гене *GSTP1,* приводящей к замене аминокислот изолейцина (Ile105) на валин (Val105), происходит изменение активности кодируемого этим геном фермента.

Замена изолейцина на валин в 105 положении расположенная в субстратсвязывающем Н участке фермента, приводит к различным изменениям его кинетических параметров.

При мутации Val105 в 7 раз увеличивается каталитическая активность р-глутатион-*S*-трансферазы по отношению к полициклическим ароматическим соединениям, но к 1-хлор-2,4-динитробензену – снижается в 3 раза [T. Ishii et al., 1999]. Отмечается повышение содержания гидрофобных аддуктов в тканях легких и полициклических ароматических углеводородов — ДНК аддуктов в лимфоцитах крови.

Вариантами устойчивости организма к действию гепатототропных ядов (НДМГ, стирол) являются: нормальный генотип (Ile/Ile) гена *CYP1A1,* нормальный генотип (Tyr/Tyr) гена *EPHX1,* а так же нормальный фенотип микросомальной эпоксидгидролазы; комбинация нормальных генотипов *(Ilelle/ClCl)* генов *CYP1A1* и *CYP2E1;* комбинация нормальных генотипов (Ilelle/C 1C1/CC/N) генов *CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6* и нормального фенотипа микросомальной эпоксидгидролазы; сочетание нормальных генотипов (+/+/N) генов *GSTM1, GSTT1* и нормального фенотипа микросомальной

эпоксидгидролазы, что свидетельствует о естественном отборе лиц, адаптированных к влиянию данного токсиканта [О. В. Макарова, 2004].

Точечные гетерозиготные мутации 105I/V и 114A/V гена *GSTP1* и *113T/H* гена *EPHX1* усиливают возможность развития ХОБЛ как у курящих, так и у некурящих лиц [С. Е. Вахрушева, 2012], что свидетельствует о напряжении процессов детоксикации ксенобиотиков у лиц с данными мутациями и может служить генетическим маркером для предиктивной диагностики риска развития ХОБЛ не только у курильщиков, но и лиц, работающих на опасных химических производствах и контактирующих с иными поллютантами окружающей среды.

Анализ распределения лиц в популяции населения в зависимости от генотипа, влияющего на скорости метаболизма ксенобиотиков, позволил выделить следующие группы:

- Распространенные (активные) метаболизаторы, имеющие нормальный ген того или иного фермента метаболизма.
- Медленные метаболизаторы — носители мутаций гена того или иного фермента метаболизма, приводящих либо к синтезу дефектного фермента, либо вообще к отсутствию синтеза определенного фермента, результатом чего является снижение ферментативной активности или даже ее отсутствие по конкретному субстрату.
- Сверхактивные или быстрые метаболизаторы — носители мутаций гена того или иного фермента метаболизма, приводящих к синтезу фермента с высокой метаболизирующей активностью.

Наличие делеций или «медленных» аллелей может приводить к дисбалансу процессов детоксикации. Например, наличие «медленных» аллелей в генах, кодирующих изоферменты 1-й и 2-й фазы метаболизма ксенобиотиков, приводит либо к отсутствию синтеза этих ферментов или к синтезу ферментов с низкой активностью. Вместе с тем выявление низко-функциональных аллелей генов системы детоксикации не может служить основанием для постановки и подтверждения какого-либо диагноза.

Отсутствие низко-функциональных аллелей генов системы детоксикации также не свидетельствует, что курение не является безопасным для здоровья их носителей.

Многочисленными исследованиями показано, что образующиеся реактивные метаболиты в ходе реакций 1 фазы биотрансформации ксенобиотиков и их дальнейшее ковалентное связывание с макромолекулами клетки может привести к образованию аутоантигенов, вызывающих клеточный или гуморальный иммунный ответ [В. В. Ляхович и др., 2002].

Таким образом, генетический полиморфизм играет ключевую роль в про-

цессах детоксикации ксенобиотиков. Ввиду того, что конечная токсичность любого посредника, образуемого предыдущей фазой детоксикации, зависит от реакций последующей фазы, сочетанная роль полиморфизмов генов, кодирующих различные ферменты, играет важную роль в определении восприимчивости к химической болезни.

Установлено, что нарушение метаболического равновесия между реакциями 1-й и 2-й фаз биотрансформации, является основным фактором развития химически обусловленных заболеваний: нейродегенеративных болезней, канцерогенеза, поражения сердечно-сосудистой, дыхательных систем и других органов, в том числе аутоиммунного характера, связанного с генетической детерминантой. Отмеченные факты подтверждены материалами клинико-эпидемиологических исследований.

В настоящее время проводятся исследования влияния полиморфизмов генов, регулирующих процессы биотрансформации, на развитие мультифакториальных заболеваний, имеющих особенности распространения и их течения в различных популяциях, которые могут быть спровоцированы действием внутренних и внешних факторов, в том числе химического.

Основные сведения о роли генетического фактора в формировании различных мультифакториальных заболеваний, в частности, обусловленных неблагоприятными полиморфизмами генов 1 и 2 фаз биотрансформации ксенобиотиков, представлены далее (гл. 9).

Имеющиеся данные о сложном механизме процессов биотрансформации и ее генетическом регулировании требуют уточнения ее роли в системе поддержания гомеостаза организма в сочетании с другими защитными механизмами.

# 4. СИСТЕМЫ ВЫВЕДЕНИЯ КСЕНОБИОТИКОВ И ПРОДУКТОВ ИХ ПРЕВРАЩЕНИЯ ИЗ ОРГАНИЗМА

Токсические вещества выводятся из организма тем же путем, что и при поступлении: через легкие, органы пищеварения, кожу, а также через мочевыделительную систему. Попавшие в организм ксенобиотики и продукты их биотрансформации выводятся из организма с мочой, желчью, калом, выдыхаемым воздухом, потом [Биохимия, 2009; Медицинские проблемы [Электронный ресурс]; Общая токсикология, 2002].

Выведение водорастворимых химических токсикантов и их метаболитов в основном осуществляет мочевыделительная система (почки, мочеточники, мочеиспускательный канал и мочевой пузырь), а жирорастворимых — легкие.

При выделении веществ в окружающую среду, организм использует те же механизмы, что и при резорбции. Поэтому общие закономерности, определяющие качественные и количественные характеристики экскреции, не отличаются от закономерностей, управляющих резорбцией и распределением токсикантов в организме. Однако ведущим процессом является не диффузия или активный транспорт, а фильтрация чужеродных веществ через биологические барьеры.

По практическому значению экскреторные органы располагаются следующим образом: почки – кишечник – легкие – кожа.

Основным местом фильтрации ксенобиотиков и, соответственно, органом выделения являются почки.

Детоксикационные возможности почек непосредственно связаны с их активным участием в поддержании химического гомеостаза организма путем биотрансформации ксенобиотиков и эндогенных токсикантов с последующим их выведением с мочой. В основе процесса выделения через почки лежат три механизма:

- фильтрация через гломерулярно-капиллярный барьер (низкомолекулярные вещества, находящиеся в растворенном состоянии в плазме крови);
- секреция эпителием почечных канальцев (органические кислоты, мочевая кислота, сильные органические основания, тетраэтиламмоний, метил- никотинамид и т.д.);
- реабсорбция клетками эпителия (пассивная обратная диффузия всех жирорастворимых веществ; неионизированных молекул органических кислот).

Водорастворимые соединения плохо подвергаются реабсорции в канальцах почек.

Жирорастворимые соединения после фильтрации в гломерулах могут снова всасываться в канальцах, что снижает количество выводимого яда. На реабсорцию влияют pH мочи, pK вещества.

Экскреция ксенобиотиков через почки происходит с помощью двух основных механизмов: пассивной фильтрации и активного транспорта. В результате пассивной фильтрации в почечных клубочках образуется фильтрат, который содержит многие токсичные вещества, в том числе неэлектролиты, в той же концентрации, что и в плазме. Количество вещества, которое покинет организм с мочой, зависит от интенсивности обратной резорбции. Если химическое вещество не подлежит активному захвату почечной тканью, то в случае связывания с белками его экскреция будет затруднена, поскольку капиллярная мембрана почечных клубочков почти не проницаема для белка. В первичную мочу путем фильтрации будут поступать лишь свободные молекулы. То есть в этой ситуации диссоциация комплекса вещество – белок проходит быстро и связывание ксенобиотика протеинами крови мало сказывается на его выделении через почки. Образование прочной связи ксенобиотика с белком может стать лимитирующим фактором почечной экскреции.

О механизмах, лежащих в основе выведения ксенобиотиков через почки, можно судить и по соотношению их концентраций в моче и плазме крови. Если это соотношение близко 100 — в основе процесса лежит фильтрация; если существенно меньше 100 — фильтрации сопутствует реабсорбция значительной части токсиканта; если больше 100 – превалируют механизмы секреции ксенобиотика.

При многих отравлениях с помощью специальных средств, усиливающих отделение мочи, добиваются быстрейшего удаления ядовитых соединений из организма. Вместе с тем приходится считаться и с повреждающим воздействием на почки некоторых выводимых с мочой ядов (например, ртути). Кроме того, в почках могут задерживаться продукты превращения токсичных веществ, как это имеет место при тяжелых отравлениях этиленгликолем. При его окислении в организме образуется щавелевая кислота и в почечных канальцах выпадают кристаллы оксалата кальция, препятствующие мочеотделению. Эти явления наблюдаются тогда, когда концентрация выводимых через почки веществ высока.

Опыты показали, что основная масса чужеродных веществ почками выводится всего двумя системами: для органических кислот и для органических оснований. Иначе говоря, все антропогенные органические вещества, образующие во внутренней среде отрицательно заряженные ионы (основания), выводятся одной системой, а образующие положительно

заряженные ионы (кислоты) — другой.

Выведение токсических веществ через ЖКТ начинается уже в полости рта. В слюне обнаруживаются многие электролиты, тяжелые металлы и др. Заглатывание слюны способствует поступлению этих веществ в желудок. Через желудочно-кишечный тракт выделяются плохо растворимые или нерастворимые в воде соединения, в основном через желудок, тонкий и толстый кишечник, реже через слизистую ротовой полости.

В отношении ксенобиотиков, попавших в кровоток, печень выступает и как основной орган их метаболизма, и как орган экскреции. Печень выделяет в желчь экзогенные (ксенобиотики, ЛС и их метаболиты) и эндогенные вещества, такие как желчные кислоты, желчные пигменты, электролиты. Выделяющиеся вещества проходят через барьер, образуемый эндотелием печеночных синусов, базальной мембраной и гепатоцитами.

Процесс экскреции ксенобиотиков печенью осуществляется в два этапа:

— захват гепатоцитами;

— выделение в желчь.

Оба этапа могут проходить либо в форме простой диффузии, либо активного транспорта. Механизм выделения определяется строением вещества.

В соответствии со значением коэффициента $С_Ж/С_П$ ($С_Ж$ – концентрация в желчи; $С_П$ – концентрация в плазме крови) ксенобиотики могут быть разделены на три группы.

Вещества, выделяющиеся печенью путем простой диффузии, могут оказаться в желчи лишь в концентрации, равной его концентрации в плазме крови ($С_Ж = С_П$). Так, для ионов $Na^+$, $K^+$, $Cl^-$ коэффициент $С_Ж/С_П$ приблизительно равен 1,0.

Для веществ, попадающих в гепатоциты, а затем и в желчь, с помощью механизмов активного транспорта, коэффициент может быть существенно выше 1,0. Как правило, активно выделяются печенью амфифильные вещества, содержащие в молекуле как полярные, так и неполярные группы. У некоторых соединений, нашедших применение в клинической практике, значение коэффициента очень велико (прокаинамид-этобромид – 118, хинин – 19,7). Наконец, некоторые химические вещества плохо проникают в гепатоциты и желчь. Для них коэффициент $С_Ж/С_П$ меньше 1,0. Среди таковых: макромолекулы (инсулин, фосфолипиды).

Многие яды и образующиеся в печени их метаболиты с желчью поступают в кишечник, часть их выделяется из организма с калом, а часть повторно всасывается в кровь. Металлы, задерживающиеся в печени, могут связываться с желчными кислотами (марганец) и с желчью выделяться через кишечник. Таким образом, через кишечник с калом удаляются вещества, при их

пероральном поступлении не всосавшиеся в кровь; вещества, выделенные из печени с желчью, а также поступившие в кишечник из крови через его стенку.

Молекулярная масса соединения является важнейшим фактором, определяющим путь его элиминации. 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, 500-700 – у человека. Кроме того, преимущественно через почки выделяются вещества, хорошо растворяющиеся в воде, даже с молекулярной массой выше «пороговых» значений.

Через легкие с выдыхаемым воздухом удаляются летучие вещества, не подвергающиеся или подвергающиеся медленным превращениям.

Основным механизмом экскреции через легкие является диффузия ксенобиотика, циркулирующего в крови, через альвеолярно-капиллярный барьер. Переход летучего вещества из крови в воздух альвеол определяется градиентом концентрации или парциального давления между средами. Решающими факторами, влияющими на элиминацию, являются:

— объем распределения ксенобиотика;
— растворимость в крови;
— эффективность легочной вентиляции;
— величина легочного кровотока.

Электролиты и органические соединения, подвергаясь медленной биотрансформации в организме, выделяются с воздухом через легкие в виде основных продуктов распада: воды и углекислоты. Наиболее быстро выделяются из крови химические токсиканты с малым коэффициентом растворимости газа или пара в крови.

Другой способ легочной экскреции реализуется с помощью альвеолярно-бронхиальных транспортных механизмов. В просвет дыхательных путей секретируется жидкость, сурфактант, макрофаги, содержащие ксенобиотики. Секрет, а также адсорбированные на поверхности эпителия частицы аэрозоля, выводятся затем из дыхательных путей благодаря мукоцилиарному восходящему току. Более 90% частиц выводится таким образом из дыхательных путей в гортань в течение часа после ингаляции. Из гортани вещества поступают в желудочно-кишечный тракт.

Наименее изученными являются барьерные функции, детоксикация и депонирование ядов в коже, особенно при хронических кожных отравлениях парами, газами и аэрозолями. Выделение токсинов из организма через кожные покровы в основном обеспечивают сальные и потовые железы. В

частности, через кожу из организма с потом выводятся неэлектролиты (этиловый спирт, ацетон, фенолы, хлорированные углеводороды и др.). Общее количество удаляемого таким образом токсичного вещества за редким исключением (сероуглерод) невелико и не играет существенной роли в его «тотальном клиренсе».

Необходимо иметь в виду, что выделение некоторых токсических веществ также возможно с женским молоком (свинец, ртуть, алкоголь, ПАУ), секретом слюнных желез. Как правило, в основе появления токсиканта в секрете желез лежит механизм простой диффузии. Эти способы экскреции практически не сказываются на продолжительности нахождения веществ в организме, но могут лежать в основе появления отдельных признаков интоксикации.

Элиминация ксенобиотиков в молоко зависит от степени их персистентности в организме. Быстро элиминируемые, хорошо растворимые в воде ксенобиотики таким путем практически не выделяются. Жирорастворимые соединения с большим периодом полувыведения определяются в молоке порой в значительных количествах. Так, в эксперименте установлено, что элиминация хлорсодержащих инсектицидов в коровье молоко может составлять до 25% от введенного количества.

Некоторые вещества выделяются из организма несколькими путями, однако один из путей является преобладающим. Например, большая часть этилового спирта метаболизируется, а 10% выделяется в неизменном виде при выдыхании. С мочой, калом, молоком и т.д. выводится небольшое его количество.

В процессе выведения отдельные вещества могут оказывать токсическое действие, которое может проявляться в виде вторичных поражений, например, колиты при мышьяковых и ртутных отравлениях, стоматиты при отравлениях свинцом и ртутью и т.д.

Транспортные системы, выводящие ксенобиотики из крови, как отмечено ранее, обнаружены во многих органах млекопитающих, в том числе и человека, препятствуют в предотвращении проникновения ксенобиотиков через гистогематические и другие барьеры, выводят токсиканты и их метаболит печенью в желчь и почками в мочу, участвуют в экскреции содержимого кишечника [Г. Д. Кукес и др., 2007]. В органах, защищенных гистогематическими барьерами, имеются особые транспортные системы для переноса ксенобиотика из тканевой жидкости в кровь. Так, например, в желудочках головного мозга есть так называемое хориоидное сплетение, клетки которого перемещают чужеродные соединения из ликвора в кровь, протекающую по сосудам сплетения.

Таким образом, имеются как бы два типа систем выведения ксенобиотиков:

те, что поддерживают чистоту внутренней среды одного органа (например, системы выведения в клетках хориоидного сплетения), и те, что очищают внутреннюю среду всего организма (например, системы в клетках печени и канальцев почек). Однако общий принцип работы систем выведения одинаков: «транспортные» клетки образуют слой (пласт), одна сторона которого граничит с внутренней средой, а другая — с внешней; липидная мембрана клеток этого слоя не пропускает водорастворимые ксенобиотики, но в этой мембране имеется специальный белок-переносчик, который опознает подлежащее удалению вещество, образует с ним транспортный комплекс и проводит через липидный слой из внутренней среды в одну из клеток пласта. Затем другой переносчик выводит нежелательного агента из клетки во внешнюю среду.

# 5. ИММУННАЯ СИСТЕМА И ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ КСЕНОБИОТИКОВ

Из систем обезвреживания, имеющих отношение к защите от токсических эффектов ксенобиотиков, наряду с ферментами биотрансформации следует выделить иммунную систему, которая эволюционно развилась относительно поздно. Ее рассматривают в качестве главной системы, обеспечивающей целостность организма при разнообразных внешних воздействиях – системы контроля и поддержания гомеостаза организма, защиты от разнообразных возбудителей инфекционных заболеваний, опухолевых клеток, ксенобиотиков и других чужеродных агентов [Генетический паспорт..., 2009; С. Н. Голиков и др.,1986; Иммунология, 2013; А. А. Ярилин, 1999; A.L. DeFranco et al., 2007].

Разнообразные токсические вещества и продукты их биотрансформации оказывают разнонаправленное действие на различные звенья иммунной системы, поэтому сведения о иммунотропных свойствах ксенобиотиков и защитной роли звеньев иммунитета в реализации токсических эффектов ксенобиотиков активно анализируются и обобщаются [П. Ф. Забродский, В. Г. Мандыч, 2007; Н. В. Зайцева и др., 2016; А. С. Пушкин, 2003; Руководство по клинической иммунологии, 2009; Р. М. Хаитов, Л. П. Алексеев, 2000].

В рамках иммунотоксикологии участие иммунной системы в токсическом процессе традиционно рассматривается с позиции неблагоприятного влияния ксенобиотиков на ее защитные механизмы [П. Ф. Забродский, В. Г. Мандыч, 2007].

Прямое (и/или непрямое) действие ксенобиотиков, их метаболитов может вызывать супрессию иммунных реакций, проявление гиперчувствительности (немедленного или замедленного типов), нарушение продукции цитокинов, развитие аутоиммунных реакций. Возможно образование антител к антигену, образованному в виде комплекса: низкомолекулярные вещество (гаптен) — белок-носитель, с развитием химической сенсибилизации — аллергизации.

Гаптены отличаются очень высоким уровнем специфичности. Аллергенность химических веществ зависит от размера молекулы гаптена, способного образовывать с белком-носителем комплексный антиген, интенсивности взаимодействия последнего с активным центром антитела или рецептором эффекторных клеток [О. Г. Алексеева, Л. А. Дуева, 1978].

Степень сенсибилизации зависит от пути поступления химического аллергена в организм, дозы, его кумулятивных свойств, состояния нервной и эндокринной систем.

В зависимости от особенностей комбинированного поражения различных звеньев иммунитета могут быть выделены разные типы нарушения иммунного статуса. В основном ксенобиотики вызывают нарушения неспецифической резистентности организма, контактную и респираторную аллергические реакции, аутосенсибилизацию, иммунодефицит.

Причиной вторичных (постинтоксикационных) иммунодефицитных состояний может быть повреждение структуры ДНК лимфоцитов и/или процессов репарации ДНК.

Показана необходимость исследования иммунитета при оценке влияния токсических и других факторов на организм одновременно с изучением состояния дезинтоксикационных реакций, так как отдельные химические вещества, подвергающиеся метаболическим превращениям, могут действовать как аллергены, а также вызывать модификацию собственных белков организма, провоцируя реакции повышенной иммунологической чувствительности к измененным белкам, которые могут восприниматься лимфоидной системой как «чужеродные» структуры.

В отличие от широко известного факта формирования иммунотоксического эффекта, роль иммунной системы в процессах адаптации организма к воздействию химического фактора мало изучена, так как до сих трудно разграничить адаптационные, компенсаторно-приспособительные механизмы от начальных проявлений токсического поражения многочисленных звеньев иммунного ответа на химический токсикант. Так, обезвреживание эффектов ксенобиотиков может осуществляться иммунными механизмами контроля индивидуальности и целостности организма (распознавание и уничтожение чужеродного агента) при образовании их комплексов с собственными белками организма (антигенов).

В упреждающих защитных механизмах ключевую роль отводят участию фактора FOXP3 (одного из факторов транскрипции, регулирующих работу генов, кодирующих определенные белки) в превращении Т-клеток в Treg-клетки, которые предотвращают развитие аутоиммунных заболеваний у человека [З. Фегервари, Ш. Сакагучи, 2006], в том числе обусловленных действием иммунотоксикантов.

Показательно, что при отсутствии фактора FOXP3 отмечаются выраженный дисбаланс иммунной системы, множественные воспаления различных органов и ранняя смерть в младенчестве.

Благодаря успехам молекулярной биологии и иммунохимии в выработке моноклональных антител, открытии генов и структур поверхности клеток главного комплекса гистосовместимости, компонентов иммунной системы, начиная с конца прошлого века, произошел очередной прорыв в изучении

молекулярных механизмов иммунной защиты при воздействии внешних и внутренних патогенных факторов на организм человека.

И. Е. Ковалевым и соавт. была сформулирована концепция функционального единства механизмов иммунологического и химического гомеостаза, связанных с функциями печени и других барьерных органов: в процессе защиты организма от чужеродных химических соединений возникают сопряженные реакции двух типов: индукция синтеза микросомальных монооксигеназ печени и индукция синтеза специфических антител, связывающих ксенобиотики [И. Е. Ковалев, О. Ю. Полевая, 1985; А. Б. Полетаев и др., 2002].

Монооксигеназную систему, детоксицирующую ксенобиотики, рассматривают как систему надзора чужеродных низкомолекулярных веществ — «химический иммунитет». А. И. Арчаков (1975) называл цитохром Р-450 «мембранным иммуноглобулином».

Единство МОГС и иммунной системы подтверждается сходными реакциями на ингибирующие и стимулирующие вещества [Медицинская токсикология, 2012]. Иммунная система объединяет регуляцию процессами метаболизма и детоксикации химических веществ.

В настоящее время исследуются природные абзимы – каталитические антитела, продукция которых в организме не была индуцирована какими-либо внешними воздействиями. Они обладают свойствами ферментов, катализирующих определенные химические реакции: протеолитическая (протабзимы), ДНК-гидролизующая активность (ДНК-абзимы), гидролиз РНК.

Абзимы выявляются при ряде аутоиммунных заболеваний (бронхиальная астма, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, аутоиммунный тиреоидит, гепатит, лейкемия и др.), их возникновение связывают с аутоиммунизацией организма [В. Н. Бунева и др., 2013; И. Е. Ковалев, А. Б. Полетаев и др., 2002; Медицинская микробиология, вирусология и иммунология, 2010; S. Paul et al., 1989].

Природные ДНК-абзимы, обнаруживаемые при аутоиммунной, вирусной и опухолевой патологии, встречаются и у здоровых лиц. В здоровом организме эти антитела-ферменты к собственным компонентам, включая ДНК и РНК, находятся в очень небольшом количестве; их содержание у женщин больше, чем у мужчин и возрастает при беременности.

Синтез абзимов, обладающих протеинкиназной активностью, является общей тенденцией ответа иммунной системы высших организмов при тяжелых поражениях, в том числе может быть обусловлен действием химических токсикантов, что требует дальнейшего изучения.

Кроме абзимов к естественным антителам (находящимся в организме без

введения антигена) относятся изогемагглютинины сыворотки системы АВ0, определяющие группы крови человека, анти-резус, аутологические антитела (к собственным антигенам), стимулирующие дифференцировку клеток, антитела против микробов и другие иммуноглобулины (чаще IgM) с низкой специфичностью. [Антитела [Электронный ресурс].

Также выявлены интратела — группа рекомбинантных антител, способных связывать и инактивировать определенные внутриклеточные белки или блокировать взаимодействие последних с другими белками [М. А. Пальцев, С. В. Сучков, 2008]. Мишенями интрател являются онкогенные молекулы ErB-2, p21 ras, p53.

Интратела вызывают апоптоз опухолевых клеток, блокируют внутриклеточную репликацию вирусов, сборку вибрионов. Значение этих антител в патогенезе иммунопатологии химического канцерогенеза и вторичного иммунодефицита при действии химических веществ несомненно.

По современным представлениям, иммунная защита является универсальной против всех чужеродных организму соединений; включает неспецифический (врожденный) и специфический (адаптивный, то есть приобретенный –- клеточный и гуморальный) типы иммунитета человека от экзогенных и эндогенных чужеродных агентов.

До недавнего времени неспецифический и специфический иммунитет рассматривались как две независимые системы. Однако теперь установлено, что неспецифическая и специфическая иммунные системы находятся в постоянном взаимодействии и регулировании одна другую.

Кроме этих систем, выделена группа клеток, имеющих общие функции с клетками, как врожденного, так адаптивного иммунитета, названных специализированными клетками.

При воздействии ксенобиотиков, как показала практика и наших исследований, зачастую выявляется нарушение специфического и неспецифического иммунитета. На отдельных производствах сенсибилизация к производственным аллергенам была отмечена практически у всех работников и характеризовалась гиперчувствительностью замедленного, немедленного или смешанного типов. Также наблюдалось формирование аутоиммунных процессов, иммунодефицита, которые наиболее часто отмечались у лиц, длительно работавших на химически опасных предприятиях [Санитарно-эпидемиологическое обеспечение, 2012].

Учитывая ведущую роль иммунной системы в поддержании гомеостаза и развитии разнообразной патологии при нарушении иммунологической резистентности, зависящей, как от индивидуальной предрасположенности, так и от нарушения взаимосвязанных с ней механизмов детоксикации,

необходимо более подробно остановиться на новых достижениях в области иммунологии, относящихся к данным аспектам.

Иммунный ответ на патоген (в том числе химический аллерген) по современным представлениям включает следующие этапы:

— контакт с антигеном (гаптеном) и индукция воспалительной реакции. В воспалении участвуют клетки, поглощающие антигены (антигенпрезентирующие клетки: дендритные клетки, макрофаги, эндотелиальные и другие клетки). Происходит выделение провоспалительных цитокинов и хемокинов;

— распознавание антигена, которое происходит в периферических лимфоидных органах;

— формирование антигена при связывании ксенобиотика (гаптена) с иммуногенным носителем (альбумином, липопротеинами);

— начало специфического иммунного ответа (пролиферация и дифференцировка эффекторных и регуляторных лимфоцитов);

— деструкция антигена и повреждённых патогеном тканей. При этом для выполнения эффекторных функций одни лимфоциты (хелперы) активируют другие лимфоциты (эффекторные) и/или воспалительные лейкоциты (нейтрофилы, моноциты, базофилы, эозинофилы), тучные клетки, а также гуморальные литические системы типа комплемента;

— выведение продуктов распада с участием систем выделения.

При изучении иммунного ответа на антигенный стимул с помощью моноклональных антител выявлены особые молекулы (антигенраспознающие рецепторы), расположенные на поверхности цитоплазматической мембраны клеток иммунной системы, которые служат маркерами функций разнообразных типов иммунокомпетентных клеток [Иммунология, 2013; Медицинская микробиология, 2010].

В 80-х годах прошлого века была принята международная номенклатура этих мембранных маркеров лейкоцитов человека. В настоящее время насчитывается более 230 классифицированных мембранных антигенов системы гемопоэза (CD-классификация).

Введение унифицированных наименований антигенов путем сравнения специфичности выявляющих их МКА позволяет избежать разночтений и несоответствий в исследованиях с дифференцировочными антигенами и выявляющими их МКА.

Мембранные CD-маркеры и основные функции клеток, принимающих участие в специфическом и неспецифическом иммунном ответе, представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Основные CD-маркеры клеток, участвующих в иммунном ответе [Медицинская микробиология…, 2010]

| CD-маркер | Тип клеток | Функция |
|---|---|---|
| CD1 | Т-лимфоцит | молекула МНС 1 класса, связанная с микроглобулином. Участие в представлении антигена |
| CD2 | | адгезия Т-лимфоцитов к эндотелию цитотоксических Т-лимфоцитов, к клеткам мишеням, тимоцитов к тимическим эпителиальным клеткам |
| CD3 | | маркер большинства зрелых Т-лимфоцитов − молекулы TCR. Участие в проведении сигнала от рецептора путем активации цитоплазматической тироксиназы |
| CD4 | | маркер Т-хелперов. Ко-рецептор для Т-клеточного рецептора |
| CD5 | Т- и В-лимфоцит | маркер В1-лимфоцитов |
| CD8 | Т-лимфоцит | маркер цитотоксических Т-лимфоцитов. Ко-рецептор для Т-клеточного рецептора |
| CD11d | лейкоциты | αD-субъединица интегрина α, связанная с CD18 |
| CD14 | моноциты | Рецептор для В-клеточного иммунорецептора |
| CD16 | естественный киллер | Fc–рецептор. Участие в фагоцитозе, антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦТ) |
| CD18 | лейкоциты | интегрин β, вовлекаемый в процесс взаимодействия между клетками и клеток с матрицей |
| CD19 | В-лимфоциты | ко-рецептор для В-клеточного иммунорецептора |
| CD20 | | регуляция активации В-клеток, формируя кальциевые каналы |
| CD21 | зрелые В-лимфоциты | ко-рецептор для В-клеточного рецептора. Рецептор для C3d-комплемента и вируса Эпштейна-Барр |
| CD22 | В-лимфоциты | маркер зрелых В-лимфоцитов. Адгезия В-клеток к эритроцитам, Т-клеткам, моноцитам и макрофагам |
| CD25 | Т-лимфоциты | рецептор для ИЛ-2. Маркер активированного лимфоцита |
| CD28 | Т-лимфоциты | рецептор Т-хелпера для взаимодействия с костимулирующим фактором (CD80/ CD86) антигенпрезентирующей клетки (АПК) |
| CD30 | активные Т- и В-лимфоциты | усиление ответа Т- и В- клеток после связывания с лигандом |

| Продолжение табл.5.1 | | |
|---|---|---|
| CD-маркер | Тип клеток | Функция |
| CD40 | В-лимфоциты | В-клеточная активация, пролиферация и дифференцировка после связывания CD40-лиганда |
| CD56 | естественный киллер | активация цитотоксичности и синтеза цитокинов |
| CD64 | моноциты, макрофаги | высокоаффинный рецептор для IgG ($IgG_3$> $IgG_1$> $IgG_4$>>>$IgG_2$) |
| CD94 | естественный киллер | ингибиция/активация цитотоксичности естественных киллеров |
| CD95 | разные клетки | молекула Fas, маркер апоптоза клеток |

Многочисленные функциональные свойства различных субпопуляций лимфоцитов и других ИКК сводятся к базисному процессу – активации. Именно на основе этого феномена происходят практически все иммунные реакции [Иммунология, 2013; А. А. Ярилин, 1999, B. Agrawal et al., 1998].

Процесс активации сопровождается появлением, а чаще увеличением количества на внешней мембране ИКК определенного набора эссенциальных, т.е. обязательных для данного функционального состояния клетки молекул. Это так называемые маркеры активации или активационные антигены.

Активационные рецепторы при этом по своей функциональной принадлежности могут относиться к самым различным группам: например, рецепторы цитокинов (CD25), молекулы адгезии (ICAM-1 и ICAM-3), продукты главного комплекса гистосовместимости (HLA 1 и II класса), ферменты (CD26, CD38) и т.д. [А. А. Ярилин, 1999; R. D. Campbell et al., 1993; P. Parham, 2005; S. Rajagopolan, E. Long, 2005].

Вместе с тем одним из важных способов контроля функционирования компонентов иммунной системы является ингибирование (супрессия) иммунных реакций. Ингибирование иммунного ответа наступает под действием множества факторов: супрессия обусловлена элиминацией антигена, исчезновением антигенной стимуляции, а также развитием апоптоза простимуллированных лимфоцитов и другими причинами.

## 5.1 Неспецифический (врожденный) иммунитет

Неспецифические реакции организма на чужеродный агент формируют неспецифический иммунитет, который также имеет термины: «врожденный иммунитет», «доиммунные механизмы резистентности», «доиммунная защита» или «неспецифическая резистентность организма» [G. В. Балашов, 2009; П. Ф. Забродский, В. Г. Мандыч, 2007; Иммунология, 2013].

Учитывая, что при неспецифическом ответе на чужеродные агенты участвуют «естественные» антитела, а также то, что системы фагоцитоза (моноцитарно-макрофагальные система), комплемента и другие факторы, хотя и участвуют в формировании специфического иммунного ответа, но не дифференцируют антиген, мы придерживаемся первого термина (неспецифический иммунитет). Неспецифические факторы защиты действуют стереотипно, определяя общую сопротивляемость организма. Врожденная иммунная система образует первую линию защиты на пути патогенных агентов, проникающих в организм человека.

Компоненты врожденного иммунного ответа не изменяются в процессе жизни организма, контролируются генами зародышевой линии и передаются по наследству. Различают два типа неспецифического иммунитета: клеточный и гуморальный.

К факторам клеточного неспецифического иммунитета относят фагоциты, клетки-киллеры, а также толл-рецепторы, рецепторы цитокинов; к гуморальным факторам — лизоцим, интерфероны, систему комплемента, интерлейкины и другие белки крови [И. П. Ашмарин, и др., 1999].

Фагоциты классифицируются на микрофаги и макрофаги. В состав микрофагов (гранулоцитов) входят нейтрофилы, эозинофилы, базофилы.

Макрофаги (мононуклеарные фагоциты) находятся в составе тканей (например, купферовские клетки печени). К макрофагам относят и клетки-предшественники – монобласты, и моноциты.

Роль моноцитарно-фагоцитарной системы в детоксикации ксенобиотиков заключается в их распознавании, поглощении и метаболизме.

В процессе фагоцитоза в фагоцитирующих лейкоцитах усиливаются поглощение кислорода и образование активных радикалов [А. Н. Маянский, Д. Н. Маянский, 1989]. Избыточное выделение АФК может привести к окислительному стрессу, инициируя так называемый «респираторный взрыв».

Из иммунотропных эффектов ксенобиотиков, как правило, наблюдается угнетение моноцитарно-фагоцитарной функции [Иммунология, 2013].

Клетки-киллеры делятся на несколько типов: естественные киллерные (ЕК-клетки или NK-клетки), просто киллерные (К-клетки) и лимфокинактивированные киллерные (ЛАК-клетки). Общей их особенностью является способность разрушать клетки-мишени, покрытые крайне малыми количествами IgG-антител.

Естественные (нормальные) киллеры (NK-клетки Natural Killer) лишены характерных для Т- и В-клеток поверхностных CD-маркёров, а также антигенраспознающих рецепторов: TCR (T Cell Receptor) или BCR (B Cell Receptor), поэтому их еще называют нулевыми лимфоцитами [NK-клетки

[Электронный ресурс]; G. B. Кожанова и др. [Электронный ресурс].

NK-клетки — эффекторные клетки врожденной иммунной системы, осуществляющие прямую цитотоксическую функцию без предварительной активации.

NK-клетки экспрессируют многие поверхностные распознающие рецепторы и имеют следующий фенотип: CD3CD16+CD56+CD94+, но не экспрессируют TCR. Зрелые циркулирующие NK-клетки имеют фенотип CD3CD16+CD56+. Активированные NK могут нести на своей поверхности CD25, HLA-DR, интегрины, CD69, трансферриновый рецептор CD71, NK-рецепторы. Не обязательно присутствие всех маркеров.

Для большинства NK-клеток характерен фенотип CD56+16+CD2+CD3. Среди NK-клеток встречаются подклассы CD16+CD56$^-$ и CD16$^-$CD56+[NK-клетки [Электронный ресурс], то есть соответственно субпопуляции NK-клеток: с высоким и с низким уровнем экспрессии CD56. Первая субпопуляция в большей степени специализирована на осуществлении цитотоксической функции, а вторая – на продукции цитокинов.

NK-клетки также экспрессируют альфа-цепь CD8, но в меньшей степени, чем цитотоксические Т-лимфоциты. CD16 — мембранный низкоаффинный IgG-рецептор III типа. Эта молекула участвует в антителозависимой клеточной цитотоксичности, осуществляемой NK.

CD56 адгезионная молекула широко представлена в нервной ткани. Другое название этой молекулы NCAM (neural cell adhesion molecule). Кроме естественных киллеров CD56 экспрессируется на многих типах клеток, в том числе на Т-лимфоцитах.

Субпопуляция NK-клеток с фенотипом CD56+16+, имеющих поверхностный Fc-рецептор к IgG, как и клетки системы врожденного иммунитета (макрофаги, нейтрофилы и эозинофилы), участвует в осуществлении антителозависимой клеточной цитотоксичности.

NK-клетки могут регулировать дифференциацию наивных Т-клеток в направлении Th1 или Th2 путем избирательной продукции IFN-$\gamma$ или IL-5.

Активация NK-клеток регулируется соотношением рецепторов, поставляющих подавляющие и активирующие сигналы. NK-клетки экспрессируют также стимулирующие и ингибирующие рецепторы (киллерный иммуноглобулинподобный рецептор – KIR и CD94), которые детектируют изменения в содержании молекул MHC класса I, которые возникают в периоды количественно измененного синтеза белка, например, при опухолевой трансформации [В. Т. Ивашкин, 2008].

Ингибирующие рецепторы распознают молекулы MHC I класса (HLA-I) трансформации [В. Т. Ивашкин, 2008; E. Carbone at al., 1996], что вызывает

подавление цитотоксической активности и угнетает выработку цитокинов NK-клетками.

Отсутствие или низкий уровень экспрессии собственных HLA на клетках-мишенях способствует активации NK-клеток.

Активирующие рецепторы принадлежат к семействам иммуноглобулиноподобных или лектинподобиых молекул, которые запускают каскад сигнальных молекул, сходных с Т-клеточными, через молекулу DAP12.

Лектинподобные рецепторы содержат молекулу лектина CD94, соединенную молекулой NKG2A (содержит ITIM) или NKG2C (передает активационный сигнал).

Не менее важна регуляторная функция NK-клеток как продуцентов IFN-γ и других медиаторов межклеточных взаимодействий. IFN-α и IFN-β, IL-15 и IL-12 являются сильными активаторами NK-клеток, включая клеточно-опосредованную неспецифическую цитотоксичность и продукцию ими цитокинов [G. B. Кожанова и др. [Электронный ресурс].

Активированные NK-клетки синтезируют также TNF-α (индуцирующий апоптоз клеток-мишеней), IL-24 (аутокринно индуцирующий синтез TNF-α и IFN-γ), IL-32 (член семейства ИЛ-1, провоспалительный цитокин и индуктор синтеза TNF-α), а также IL-13 и IL-26 (член семейства IL-10), которые являются противовоспалительными цитокинами, подавляют Th1-ответ и стимулируют синтез Ig E.

NK-клетки могут регулировать дифференциацию наивных Т-клеток в направлении Th1 или Th2 путем избирательной продукции IFN-γ или IL-5 [В. Т. Ивашкин, 2008].

Таким образом, продуцируя ряд иммунологически важных цитокинов, NK-клетки играют важную роль в иммунной регуляции, влияя как на врожденный, так и на адаптивный (специфический) иммунный ответ.

Неспецифический иммунитет также обеспечивается скоплением лимфоидных клеток на участках, граничащих с внешней средой и запускающих ранний иммунный ответ, синтез иммуноглобулина А (слизистые дыхательных путей, желудочно-кишечный тракт и др.) [П. Ф. Забродский, В. Г. Мандыч, 2007].

Из предшественников антигенпредставляющих клеток, чьей функцией является захват антигенов и представление их лимфоцитам, следует выделить дендритные клетки (ДК), которые подразделяются на три группы [М. Д. Шерлин Смит и др.[Электронный ресурс]. Первая группа — клетки Лангерганса, находящиеся в тканях, которые затем, поглотив антиген, мигрируют в Т-клеточные зоны лимфоидных органов, они функционируют в виде интегрирующих клеток. Вторая группа — миелоидные

(интерстициальные и кожные дендритные) клетки, которые после контакта с антигеном мигрируют в герминативные центры лимфоидных фолликулов. Клетки первых двух групп развиваются из предшественников костномозгового происхождения. Третья группа — плазмоцитоидные дендритные клетки располагаются в Т-клеточных зонах лимфоидных тканей. Развиваются из лимфоидного ростка. В лимфоидных тканях незрелые ДК созревают и превращаются в полноценные антигенпредставляющие клетки.

Дендритные клетки первой группы активизируют цитотоксические лимфоциты CD8, первой и второй — дифференцировку лимфоцитов CD4 в Т-хелперы 1 типа. Клетки третьей группы стимулируют дифференцировку CD4 в Т-хелперы 2 типа.

Природа антигена влияет на набор цитокинов, секретируемых ДК, и эти цитокины определяют, в свою очередь, тип Т-клеток, в направлении которых пойдет дифференциация наивных предшественников.

IL-12 и IL-18, секретируемые дендритными клетками, стимулируют индукцию Th 1-клеток, тогда как IL-10 дендритных клеток стимулирует генерирование Tr1/ Th 3.

Незрелые ДК под влиянием антигенных стимулов могут дифференцироваться в одну из двух взаимоингибирующих субпопуляций, ДК1- и ДК2-клетки, которые обеспечивают ответы в направлении Th 1 и Th 2 соответственно.

В реализации специфичности ранней иммунной защиты организма от патогенов решающую роль играют Toll-подобные рецепторы (TLR) [А. А. Кубанов, Т. В. Абрамова, 2015]. Эндогенными лигандами TLR являются молекулярные структуры, высвобождающиеся при повреждении аутологичных клеток: белки теплового шока, фибронектин, дефензины, фибриноген и др.

TLR инициируют активацию внутриклеточных сигнальных путей, в результате чего происходит экспрессия генов цитокинов (ФНОα, ИЛ-1, 6, 12, ИФНα/β и др.), костимуляторных молекул и других генов. TLR (1, 5, 6, 9) участвуют в индукции биосинтеза трёх основных классов интерферонов.

Активация Toll-подобных рецепторов приводит к выбросу хемокинов и других медиаторов воспаления.

Неспецифические гуморальные иммунные реакции обусловлены наличием естественных антител, системы комплемента, лизоцима, пропердина, интерферонов и других сывороточных белков.

Лизоцим (мурамидаза) — фермент класса гидролаз, один из важнейших факторов иммунной защиты. Он атакует пептидогликаны (в частности, муреин, входящие в состав клеточных стенок бактерий). Гидролизует (1,4 β)-гликозидную связь между N-ацетилмурамовой кислотой и N-

ацетилглюкозамином.

Источником лизоцима являются нейтрофилы и моноциты. Показатель активности лизоцима высоко чувствителен при действии ксенобиотиков [П. Ф. Забродский, В. Г. Мандыч, 2007].

Важнейшим фактором неспецифической защиты являются интерфероны — низкомолекулярные белки (протеины и гликопротеины) [Интерфероны [Электронный ресурс]; Т. П. Оспельникова, 2012; Т. П. Оспельникова и др., 2014]. Различают следующие виды интерферонов у человека: лейкоцитарный (ИФН-α), фибробластный (ИФН-β) и иммунный (ИФН-γ). ИФН-α вырабатывается макрофагами и В-лимфоцитами, ИФН-β−фибробластами и эпителиальными клетками, ИФН-γ — Т-лимфоцитами.

Интерфероны обладают противовирусным, противоопухолевым, противобактериальным и иммуномодулирующим эффектами. Подавляют внутриклеточное размножение различных паразитов, усиливают антиинфекционный иммунитет. С дефицитом интерферонов связано развитие аллергических и аутоиммунных заболеваний; рецидивирующих оппортунистических и других инфекций.

Тромбоцитарный катионный белок (ТКБ), первоначально известный под названием бета-лизин, обнаружен как бактерицидный фактор сыворотки крови человека и животных, отличающийся от альфа лизина или комплемента термостабильностью и активностью в отношении ряда грамположительных спорообразующих бактерий [И. П. Ашмарин и др., 2012; К. Г. Сулейманов, О. В. Бухарин, 1998].

Установлено, что ТКБ оказывает мембранотропное действие, влияя на перекисное окисление липидов. Биологический эффект ТКБ в патологическом очаге заключается в прямом (например, бактерицидном) действии и через модуляцию функций фагоцитов и других клеток иммунной системы, что позволяет рассматривать его как регуляторный, гомеостазирующий фактор.

Количество сывороточного ТКБ возрастает при инфекции, воспалительных, токсических (ФОС, хлоруглеводороды, диоксины) и травматических повреждениях тканей, так же как и в очаге поражения. Многократное увеличение ТКБ отмечается при аллергических реакциях.

Белки, способствующие фагоцитозу бактериальных клеток, называются опсонинами. Основными опсонинами являются белки острой фазы воспаления (С-реактивный белок, фибронектин и др.), в состав опсонинов включают компоненты системы комплемента, антитела [М. Д. Шерлин Смит и др. [Электронный ресурс]; А. А. Ярилин, 1999].

В систему комплемента входят около 20 различных сывороточных белков, девять из которых являются основными его компонентами, существующими в

плазме крови в неактивной форме [П. Ф. Забродский, В. Г. Мандыч, 2007]. Комплемент обозначают буквой «С», девять его компонентов, обозначаемых арабскими цифрами (G1, G2, C3, C4...C9), имеют сложный субъединичный состав продуктов его активации: C1-C1q, C1r, C1s; C3a, C3Ь; C5a, G5b и т.д.

Система комплемента запускается реакцией антиген–антитело и неспецифической реакцией, способствующей необратимому повреждению мембран чужеродных клеток; участвует в стимуляции фагоцитоза, образовании биологически активных веществ, освобождении от иммунных комплексов, уничтожении некоторых грамотрицательных бактерий, осуществляет другие функции.

В процессе активации комплемента образуются продукты протеолиза его компонентов — субъединицы C3a и C3Ь, C5a и G5b и другие, которые обладают высокой биологической активностью. Например, C3a и C5a принимают участие в анафилактических реакциях, являются хемоаттрактантами, C3b — участвует в опсонизации объектов фагоцитоза.

Существует три типа инициации комплемента.

Классический путь активации система комплемента запускается посредством иммуноглобулинов (IgG, IgM). Процесс начинается с присоединения к комплексу АГ+АТ компонента G1, который распадается на субъединицы C1q, C1r и G1s. Далее в реакции участвуют последовательно активированные «ранние» компоненты комплемента в такой последовательности: C4, C2, C3. Эта реакция имеет характер усиливающегося каскада. Сложная каскадная реакция комплемента происходит с участием ионов $Ca^{2+}$ и $Mg^{2+}$.

«Ранний» компонент комплемента C3 активирует компонент C5, который обладает свойством прикрепляться к мембране клетки. На компоненте C5 путем последовательного присоединения «поздних» компонентов C6, C7, G8, G9 образуется литический или мембраноатакующий комплекс, который нарушает целостность мембраны, и клетка погибает в результате осмотического лизиса.

Альтернативный путь активации комплемента проходит без участия антител. Активация обеспечивается полисахаридами мембраны, которые характерны для определенных микроорганизмов, а также посредством С-реактивного белка, который опсонирует поверхность мембраны для системы комплемента. Каскадная цепная реакция при этом пути начинается с взаимодействия антигена (например, полисахарида) с протеинами B, D и пропердином с последующей активацией компонента C3. Далее, как и при классическом пути, образуется мембраноатакующий комплекс.

Лектиновый путь активации комплемента также проходит без участия антител. Комплемент инициируется особым маннозосвязывающим белком

сыворотки крови, который после взаимодействия с остатками маннозы на поверхности микробных клеток катализирует С4. Дальнейший каскад реакций сходен с классическим путем.

Ряд компонентов комплемента обладают эстеразной активностью. Антихолинэстеразные токсиканты (ФОВ), хлорированные углеводороды существенно снижают активность комплемента.

Проявлением начального ответа на антигенный стимул является воспаление, которое инициируется совокупностью полипептидных химических мессенжеров, продуцируемых активированными клетками неспецифической иммунной системы, а также некоторыми ксенобиотиками, патогенинфицированными и опухолевыми клетками [В. Т. Ивашкин, 2008; Иммунология, 2013]. Эти химические мессенжеры включают хемокины и цитокины, которые быстро диффундируют из тканей в циркуляторное русло. Хемокины охватывают такие молекулы, как MIP-1α, MIP-β (макрофагальные воспалительные протеины α и β), интерлейкин-8 и RANTES (regulated on activation, normal, T-cell expressed, and secreted); последний участвует в регуляции миграции Т-лимфоцитов. Провоспалительные цитокины включают гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), TNF-α, интерлейкины IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 и интерфероны IFN-α и IFN-β.

Основная функция провоспалительных хемокинов и цитокинов состоит в привлечении дополнительных клеток воспаления из других областей организма. Эффекторные функции осуществляются до тех пор, пока стимулирующая патогенная структура не подвергается разрушению и удалению, после чего противовоспалительные цитокины, такие как IL-10 и трансформирующий фактор роста β (TGF-β), индуцируют прекращение неспецифических иммунных ответов, активацию репарации ткани и ремоделирование энзимов и белков. В тех случаях, когда иммунные функции оказываются недостаточными или несостоятельными, наблюдается продолжение воспалительной реакции, принимающее хроническое течение и вызывающее повреждение тканей, рубцевание или фиброз, что нередко наблюдается при хроническом воздействии ОХВ в концентрациях, превышающих допустимые уровни.

### 5.2 «Специализированные» клетки иммунитета

Наряду с клетками неспецифического («врожденного») (эндотелиоциты, эпителиоциты, тучные клетки, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты/макрофаги, дендритные клетки, NK-клетки) и специфического иммунитета (Т- и В-лимфоциты), в иммунном ответе участвуют промежуточные

(специализированные) Т-лимфоциты (NKT-клетки, γδ Т-клетки), а также В1-клетки (CD19+ CD5+), которые отвечают на Т-независимые антигены [Иммунология, 2013; G. В. Кожанова и др. [Электронный ресурс]; Л. В. Пичугина, 2008]. Популяция специализированных лимфоцитов присутствует в крови, лимфоидных органах и в тканях организма. Они имеют общие черты как с клетками врожденного иммунитета (из-за способности к быстрому осуществлению эффекторной функции), так и с клетками адаптивной иммунной системы (главным образом с Т-лимфоцитами).

*Т-лимфоциты* — это сложная по составу группа клеток, которая происходит от полипотентной стволовой клетки костного мозга, а созревает и дифференцируется в тимусе из предшественников [Медицинские проблемы [Электронный ресурс].

На их долю приходится около 75% всей лимфоидной популяции. Т-лимфоциты имеют ряд дифференцировочных антигенов. В зависимости от строения антигенраспознающего рецептора функциональной направленности (Т-клеточного рецептора — TCR) сообщество Т-лимфоцитов может быть разделено на группы, представленные на рисунке 5.1.

.

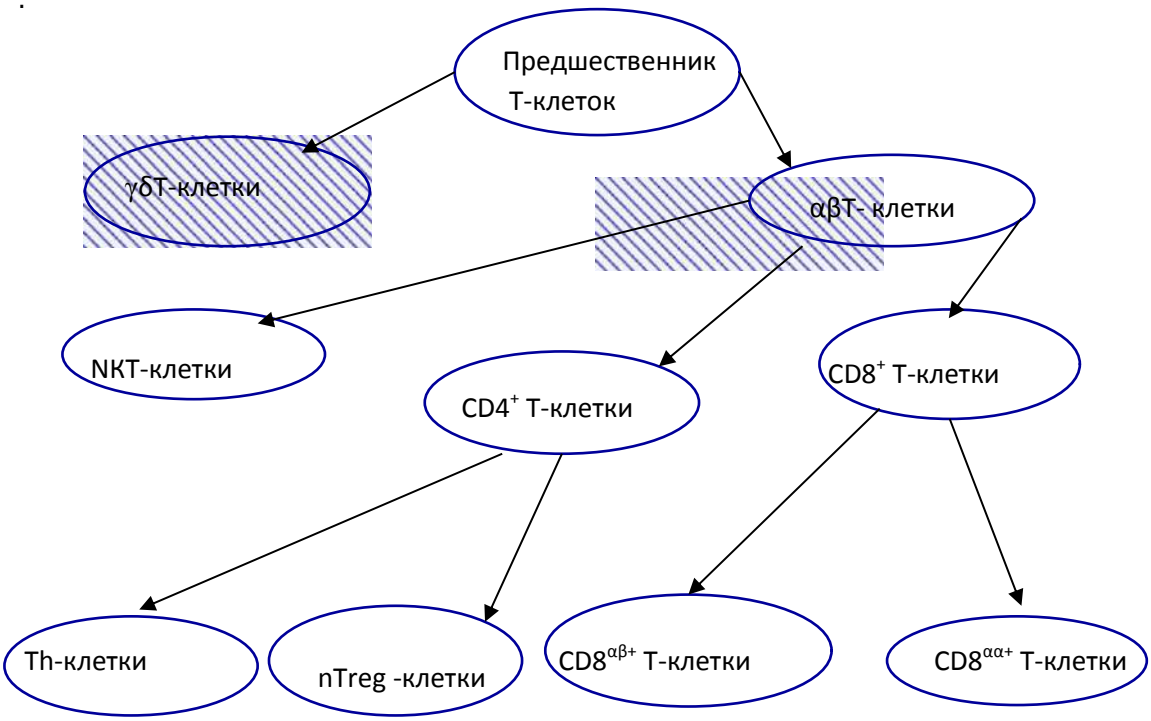


Рис. 5.1 Субпопуляции естественных Т-лимфоцитов.

TCR являются основными поверхностными белковыми комплексами Т-лимфоцитов, ответственными за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости. Состоят из цепей, принадлежащих к суперсемейству иммуноглобулинов. Различают два типа TCR: αβ и γδ.

Первый тип гетеродимер, который состоит из двух полипептидных цепей −α и β. Он характерен для традиционных для адаптивного иммунитета Т-лимфоцитов, известных как Т-хелперы и Т-киллеры.

Второй обнаруживается на поверхности особой популяции γδ Т-лимфоцитов [Л. В. Пичугина, 2008]. Каждый Т-лимфоцит экспрессирует только 1 вариант рецептора.

Специализированные Т-лимфоциты (NKT-клетки, γδ Т-клетки) могут иметь общие с традиционными Т-лимфоцитами CD-антигены, а также сходное строение антигенраспознающих рецепторов, хотя их рецепторы характеризуются гораздо меньшим разнообразием.

Помимо активационных рецепторов, специализированные лимфоциты обычно экспрессируют и различные ингибиторные рецепторы для защиты от неадекватной активации иммунного ответа.

Вместе с тем они не имеют клональной специфичности, пролиферация и дифференцировка не являются обязательным этапом их ответа на патогены, не происходит и формирования клеток памяти. То есть, специализированные лимфоциты лишены основных свойств, характеризующих клетки адаптивного иммунитета — Т- и В-лимфоцитов.

NKT-клетки представляют субпопуляцию лимфоцитов, занимающую промежуточное положение между клетками врождённого и адаптивного иммунитета [Иммунология, 2013; С. В. Кожанова и др. [Электронный ресурс]. Эти клетки имеют черты как NK-, так и Т-лимфоцитов.

NKT-клетки, одновременно несущие CD3 и CD16/CD56, рассматриваются как разновидность Т-лимфоцитов с активностью неспецифических киллеров. На их поверхности представлена мембранная молекула CD56 — изоформа адгезивной молекулы из семейства молекул адгезии клеток нервной системы (NCAM — neural cell adhesion molecule) из суперсемейства иммуноглобулинов. Они способны лизировать определенные клетки-мишени без предварительного контакта и развития реакции типа иммунного ответа.

NKT-клетки экспрессируют αβ TCR и характерный для NK-клеток рецептор NK1.1, принадлежащий к суперсемейству лектиновых гликопротеинов С-типа [Л. В. Пичугина, 2008]. NKT-клетки играют важную роль в регуляции

иммунитета. У мышей и людей с различными аутоиммунными процессами функциональная активность NKT-клеток сильно нарушена. При некоторых аутоиммунных процессах NKT-клетки могут играть супрессорную роль.

Известно, что у человека среди NKT встречаются $CD4CD8^-$, $CD4+CD8^-$, а также $CD4^-CD8+$-NKT-клетки [NK-клетки [Электронный ресурс].

NKT-клетки регулируют продукцию, а также сами являются продуцентами важнейших цитокинов, направляющих течение иммунной реакции (провоспалительные и противовоспалительные цитокины).

Превышение нормы NKT-клеток (CD3+CD56+) наблюдается при вирусных заболеваниях, опухолях, а понижение — при первичных иммунодефицитах (агаммаглобулинемия без В-лимфоцитов, сцепленная с полом, гипер-IgM-синдром), при различных органоспецифических и системных аутоиммунных процессах, таких как инсулинозависимый сахарный диабет, системная красная волчанка, рассеянный склероз.

Их содержание повышается при СПИДе, паразитарных заболеваниях, при стрессе, дефиците цинка, при облучении, лечении кортикостероидами, цитостатиками. Часто изменение численности NKT-клеток можно обнаружить непосредственно в очаге заболевания.

В отличие от большинства Т-лимфоцитов периферической крови, несущих на своей поверхности антигенраспознающие рецепторы TCR, состоящие из α- и β-цепей, небольшой фракции циркулирующих Т-клеток свойственна экспрессия γ- и δ-цепей [W. K. Born et al., 2007].

Основными биологическими функциями γδТ-лимфоцитов, обладающих свойствами врожденного и приобретенного иммунитета, являются цитолиз инфицированных, опухолевых и аутореактивных клеток, иммунорегуляция, презентация антигена, репарация поврежденных тканей [Д. Б. Нижегородова, М. М. Зафранская, 2009; W. K. Born et al.; 2007; S. Carding, P. Egan, 2002]. Цитотоксическая активность γδТ-лимфоцитов среди клеток-киллеров на уровень выше в отношении специфических мишеней.

На поверхности γδТ-клеток обнаруживают маркеры CD8, CD94, CD56. Для них характерно тимическое (небольшая популяция) и внетимическое развитие. Большая часть этих лимфоцитов имеет интраэпителиальную локализацию. В отличие от Т-лимфоцитов, содержащих TCR-рецепторы; γδТ-клетки способны распознавать антиген непосредственно или с молекулой MHC1b. γδТ-клетки могут распознавать гликопротеидные антигены, презентируемые молекулами CD1 [В. Т. Ивашкин, 2008], а также стресс-индуцируемые протеины (неклассические молекулы I класса MHC, белки

теплового шока), малые метаболические молекулы (пирофосфаты, тимидиновые метаболиты, алкиламины, гликопротеины) и другие непептидные антигены.

Среди γδТ-клеток имеются фенотипы, которые экспрессируют сочетания CD27 и CD28 поверхностных маркеров клеток памяти ($Vγ9Vδ2^{+}T$), представляющие различные стадии дифференцировки (ранней, промежуточной и терминальной); γδ Т-клетки экспрессируют хемокиновые рецепторы CXCR3, CXCR4, CXCR5, CCR9, CCR10 и др., что обеспечивает циркуляцию этих клеток в очаги воспаления.

γδТ-лимфоциты быстро реализуют иммунный ответ на чужеродный антиген, но не вырабатывают антиген-специфический эффект при повторном попадании в организм этого антигена [Нижегородова Д.Б., Зафранская М.М., 2009].

Обнаружены половые и возрастные различия в содержании γδ Т-клеток в периферической крови. Так, количество этих клеток нарастает с рождения до половозрелости, а после 30 лет постепенно снижается [Л. В. Пичугина, 2008].

Содержание γδТ-клеток увеличивается при инфекционных заболеваниях, ВИЧ-инфекции, болезни Крона, атопическом дерматите у детей, а у взрослых — при диффузном склерозе, склеродермии — снижается. У женщин их содержание выше, чем у мужчин и дольше сохраняется на высоком уровне.

Помимо активации, γδТ-клетки и NKT-клетки могут быстро уничтожать опухолевые клетки и регулировать дифференциацию Th1/Th2-клеток посредством избирательной секреции IFN-γ или IL-4.

Таким образом, неспецифические факторы иммунитета участвуют в ранних стадиях формирования иммунного ответа, презентации Т-лимфоцитам для развития специфического ответа при контакте с ксенобиотиками, а также в защите организма от формирования вторичной инфекции, наблюдаемой у лиц с низкой иммунологической резистентностью, например, обусловленной контактом с вредными и опасными химическими веществами.

### 5.3 Адаптивный (специфический) иммунитет

В защите организма от вредного воздействия ксенобиотиков особую роль играет приобретенный (специфический/адаптивнный) иммунитет, характеризующийся синтезом антител при контакте с чужеродными антигенами (в том числе антигенными детерминантами ксенобиотиков) [П. Ф. Забродский, В. Г. Мандыч, 2007].

Специфическая иммунная система — это совокупность особых лимфо-

идных клеток: Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов.

Центральными органами специфического иммунитета являются красный костный мозг, вилочковая железа, а также печень у млекопитающих, фабрициева сумка у птиц.

К периферическим органам иммунной системы относят селезенку, лимфоидные образования: миндалины, аденоиды, аппендикс, лимфатические узлы, лимфатические фолликулы.

Селезенка играет роль фильтра в неспецифическом иммунитете, служит местом продуцирования лимфоцитов и моноцитов. В ней образуются антитела, в том числе к гаптенам — низкомолекулярным ксенобиотикам.

Пониженная функция селезенки наблюдается при атрофии селезенки в пожилом возрасте, при голодании, гиповитаминозах.

Лимфоциты являются иммунокомпетентными клетками крови, осуществляющими специфические иммунологические реакции; образуются из стволовых клеток костного мозга и играют основную роль в идентификации и биотрансформации токсикантов.

В центральных органах иммунитета лимфоидные клетки-предшественники созревают, приобретают иммунокомпетентные свойства, попадают в кровоток, затем в периферические органы иммунной системы, где завершается их дифференцировка.

Все процессы дифференцировки клеток контролируются цитокинами, гормонами и другими биологически активными веществами.

Специфический иммунный ответ развивается при следующих условиях:

- наличие чужеродного агента (антигена), способного индуцировать начало процесса.

- наличие в организме ИКК, способных к взаимодействию с определенным антигеном (один антиген — одна ИКК (одно антитело).

- способность ИКК после контакта размножаться, дифференцироваться, формировать многочисленный зрелый пул популяции клеток, обуславливающих иммунный ответ.

- неспособность организма вырабатывать иммунный ответ на собственные антигенные вещества (аутотолерантность).

- наличие иммунологической памяти, обеспечивающей более выраженный количественный и качественный ответ на повторное действие антигена (вторичный ответ) или ареактивность, если организм обладает толерантностью к соответствующему антигену.

Выделяют три стадии иммуногенеза:

*первая* – наличие дифференцировка клеток лимфоидного и миелоидного ряда (до попадания в тимус или костный мозг);

*вторая* – взаимодействие ИКК (Т- и В-лимфоцитов и макрофагов) после выхода из тимуса и костного мозга;

*третья* – образование эффекторных клеток (киллеров, антителообразующих, клеток памяти и др.).

В результате дифференцировки образуются две популяции лимфоцитов, являющихся основными элементами иммунной системы, осуществляющими специфический иммунитет: Т-лимфоциты, дифференцировка которых происходит в тимусе (клетки клеточного иммунитета), и В-лимфоциты — приобретающие необходимые свойства в костном мозге (клетки, вырабатывающие антитела).

Наиболее важный результат дифференцировки — появление на поверхности лимфоцитов рецепторов для антигенов. Так, CD4 маркирует функционально зрелые клетки — Т-лимфоциты-хелперы (помощники), являющиеся центральным звеном иммунного ответа. CD8 — цитотоксические клетки. По рецептору CD20 определяют В-лимфоциты.

Физиологические проявления иммунитета связаны с регуляцией пролиферации и дифференцировки Т- и В-лимфоцитов, которые затем в ответ на антиген формируют эффекторные клетки, способные связать, нейтрализовать и вывести из организма патоген.

В иммунном ответе участвуют молекулы главного комплекса гистосовместимости. MHC I класса индуцирует преимущественно клеточный иммунный, а MHC II класса — гуморальный — ответы.

Одним из важнейших процессов в иммунном ответе является представление антигена, в котором участвуют антигенпрезентирующие клетки, молекулы II класса гистосовместимости (MHCII) и Т-хелперы с экспонированными на поверхностной мембране антигенспецифическими рецепторами, в частности, с TCR и корецептором CD4, а также с внутриклеточными молекулами, усиливающими проведение сигнала от TCR внутрь Т-хелпера. Данная совокупность взаимосвязанных молекул выполняет множество функций, связанных с распознаванием «своего» и «чужого», представлением антигена, активацией продукции медиаторов, генерацией и проведением сигнала в клетку («иммунологический синапс) [С. А. Кетлинский, 2000].

Специфический иммунный ответ условно подразделяется на клеточный и гуморальный.

Под клеточным иммунным ответом подразумевают способность иммунных клеток (Т-лимфоцитов) распознавать специфический антиген. Он включает цитотоксический эффект (цитотоксические лимфоциты) и гиперчувствительность замедленного типа (лимфоциты гиперчувствительности замедленного типа).

К pan-Т-клеточным маркерам, характерным для большинства зрелых Т-лимфоцитов, относят CD2, CD3, CD5, CD6 и CD7.

Известны и другие кластеры дифференцировки Т-лимфоцитов, присутствующие либо на отдельных субпопуляциях клеток, либо характерны для отдельных этапов их дифференцировки. CD1 является маркером ранней фазы созревания клеток в тимусе и выявляется на тимоцитах.

CD4 экспрессируется большей частью зрелых Т-лимфоцитов и является рецептором к молекулам HLA II класса. CD4+ Т-клетки функционально характеризуются как хелперы. CD8 выявляется примерно на 1/3 периферических Т-клеток, являясь рецептором к молекулам HLA I класса. CD8 рецептором обладают цитотоксические Т-лимфоциты (Т-киллеры).

Т-лимфоциты функционально также разделяются на две субпопуляции: иммунорегуляторов и эффекторов [Г. Ф. Железникова, 2001; Г. А. Жулай, Е. К. Олейник, 2012; L. Chess, H. Jiang, 2004; Z. Chen et al., 2011; S. Sakaguchi et al., 2010].

Т-хелперы и Т-киллеры образуют группу эффекторных Т-лимфоцитов, непосредственно ответственных за иммунный ответ, к регуляторной субпопуляции относятся Т-супрессоры.

Задачу регуляции иммунного ответа выполняют Т-хелперы, главной функцией которых является усиление адаптивного иммунного ответа. При прямом контакте они активируют Т-киллеры, В-лимфоциты, моноциты, NK-клетки, а гуморально –- выделение цитокинов.

В 80-х годах XX века было принято выделять 2 субпопуляции Т-хелперов (в зависимости от того, какой набор цитокинов они продуцируют) - Th1 и Th2. В последние годы спектр субпопуляций CD4+ Т-клеток расширился (Т-хелперы: Th17, T9, Tfh; Т-регуляторы Treg: Tr1, Th3 и др.) [Г. А. Жулай, Е. К. Олейник, 2012; L. Chess, H. Jiang, 2004].

Наиболее изучены две субпопуляции регуляторных Т-хелперов: Т-хелперы 1 типа — Th1 (усиливающие клеточный тип иммунного ответа) или Т-хелперы 2 типа — Th2 (опосредующие развитие гуморального иммунного ответа).

Предшественниками Th1- и Th2-лимфоцитов являются Th0. Это — мигрирующие из тимуса клетки, еще не встретившие антиген и не вступившие в иммунный ответ («наивные» недифференцированные Т-лимфоциты-хелперы). Эти $CD4^+$Т-лимфоциты на ранних стадиях развития иммунного ответа продуцируют только интерлейкин 2 (митоген для всех лимфоцитов). Th0-клети продуцируют цитокины, характерные как для Th1, так и для Th2. На дифференцировку Th0-клеток влияют тип антигена, цитокиновое окружение, костимуляция, воздействие различных гуморальных компонентов.

Th0-лимфоциты дифференцируются в Th1 (Т-хелперы 1), Th2 (Т-хелперы 2)

или в Т-супрессоры. В зависимости от вида антигена Th1 и Th2 участвуют в переключении сигнала на клеточное или гуморальное звено иммунитета, в усилении пролиферации или CD8-, или CD20-лимфоцитов. Формирование Th1 происходит в присутствии IL-12, синтезируемого макрофагами, дендроцитами и эозинофилами после контакта с антигеном. В результате дифференцировки Th1-лимфоциты синтезируют провоспалительные цитокины INF-γ, IL-2, TNF, обладающие ингибирующим влиянием на Th2-ответ. Напротив, развитие Th2 ассоциировано с активацией базофилов и тучных клеток с последующей продукцией IL-4, IL-5, IL-13, активацией В-лимфоцитов, гиперсекрецией иммуноглобулина Е (IgE) и формированием аллергического воспаления [Д. С. Гонсорунова и др., 2011].

Th1 — дифференцированная субпопуляция CD4+ Т-лимфоцитов, специализирующаяся на продукции IFN-γ, IL-2, TNF-α и TNF-γ. [С. А. Кетлинский, 2000], а также IL-12, лимфотоксина [О. В. Смирнова, Л. Р. Выхристенко, 2011].

Указанные цитокины активируют макрофаги, ЕК-клетки, созревание цитотоксических Т-лимфоцитов-киллеров, обеспечивая преимущественное развитие клеточного иммунного ответа, в том числе, при внутриклеточной инфекции.

Субпопуляция Th1 осуществляет регуляцию многих реакций клеточного иммунитета, включая ГЗТ и активацию ЦТЛ, стимулируют продукцию В-лимфоцитами опсонизирующих антител класса IgG, запускающих каскад активации комплемента, также участвует в синтезе IgM и IgG.

Развитие избыточного воспаления с последующим повреждением тканей напрямую связано с активностью Th1-субпопуляции. Th 2 участвуют в синтезе IgG, IgA, IgD, Ig E. Продуцируют IL-4, 5, 9, 10 и 13, которые отвечают за развитие гуморального ответа. Кроме того, IL-10 обладает ингибирующим эффектом по отношению к Th1.

Стимуляцию дифференцировки Th2 класса могут вызывать $CD4^{+}NK1.1^{+}$-Т-лимфоциты, которые активизируются небелковыми антигенами, представленными CD1, и секретируют IL-4.

На этапах индукции активности Th1 и Th2-лимфоцитов, стимулирующих продукцию цитокинов, источниками TNF-γ и IL-4 могут быть естественные киллеры и тучные клетки (ТК). Взаимоотношения между моноцитами/макрофагами и Th1 реализуются через IL-12 и IFN-γ. Увеличение доли CD8-клеток вызывает синтез IL-2 и IFN-α.

Th1 и Th2 различаются не только по способности продуцировать различные цитокины, но и по наличию на своей поверхности различных активационных маркеров. Так, после активации на мембране Th2 экспрессируется CD30

(молекула, относящаяся к семейству рецепторов для опухольнекротизирующего фактора), а на поверхности активированных Th1 появляется LAG-3 (молекула, относящаяся к суперсемейству иммуноглобулинов).

От функционального баланса Т-хелперов Th1 и Th2 зависит направленность иммунного ответа в норме и особенности клинических проявлений при развитии иммунопатологии.

Специфический иммунный ответ начинается тогда, когда антигенпрезентирующие клетки (макрофаги, дендритные клетки, В-лимфоциты и др.) «представляют» Т-хелперам (CD4) обработанный антиген (выставляют его на своей мембране в комплексе с MHCI или MHCII). Распознавание такого комплекса Т-лимфоцитом — MHC-рестрикция Т-лимфоцитов.

Основные субпопуляции CD4+ Т-лимфоцитов — хелперов представлены на рисунке 5.2.

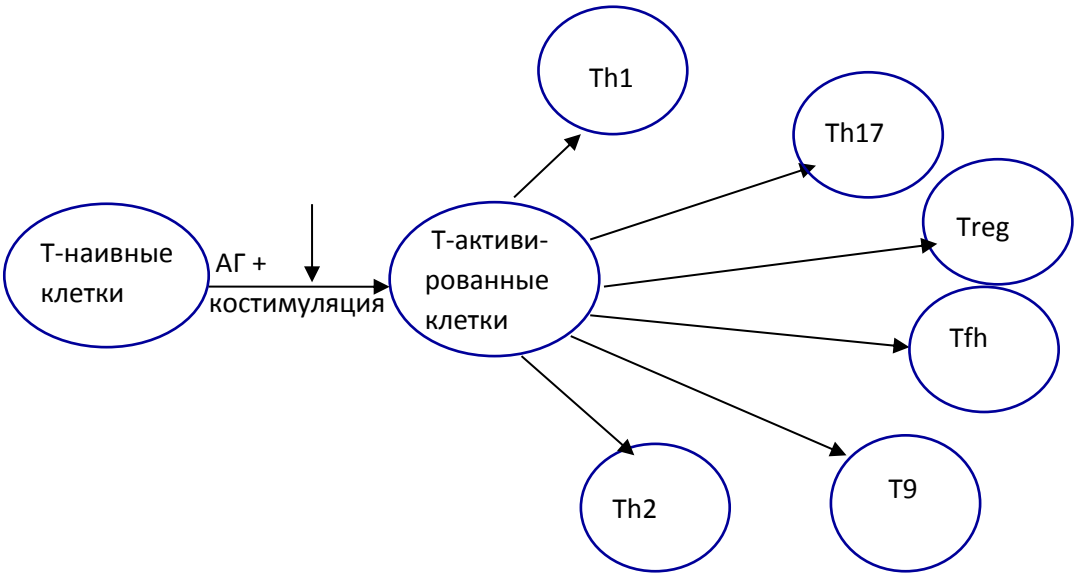


Рис. 5.2 Формирование субпопуляции Т-лимфоцитов-хелперов.

Наивные CD4+ Т-клетки после активации антигеном могут дифференцироваться в различные линии Т-клеток, включающих в себя Т-хелперы 1 (Th1 – ТМ), Т-хелперы 2 (Th 2), фолликулярные Т-хелперы (Tfh), Т-хелперы 9 (Т9), Т-хелперы 17 (Th17 – ТМ17), Т-хелперы 22 (Th 22), Treg (включая Th3).

Treg-клетки представлены несколькими субпопуляциями Т-клеток, состоящими из естественных CD4CD25 FOXP3+ (nTreg) и индуцированных регуляторных клеток (iTreg) [П. Н. Кравченко, Е. К. Олейник, 2013].

Активируются процессы пролиферации и дифференцировки Т-хелперов. При этом и антигенпрезентирующие клетки, и лимфоциты-хелперы образуют медиаторы, способствующие преимущественной пролиферации и дифференцировке цитотоксических лимфоцитов (CD8) или В-лимфоцитов (CD20), которые, в свою очередь, также продуцируют медиаторы иммунного ответа.

Эффекторные функции наряду с хелперами осуществляют цитотоксические лимфоциты Т-киллеры — ЦТЛ.

Т-лимфоциты этой субпопуляции несут на своей поверхности отличительный признак в виде молекулы CD8, которая располагается на поверхности Т-лимфоцитов-киллеров/супрессоров. Такое двойное название означает, что эта субпопуляция Т-лимфоцитов может дифференцироваться либо в ЦТЛ, либо в Т-супрессор и выполнять различные функции в зависимости от потребностей организма. Они лизируют клетки-мишени, несущие чужеродные или видоизменённые собственные антигены — аутоантигены: например, клетки опухоли, трансплантата, инфицированные вирусом клетки, несущие поверхностные вирусные антигены.

Функции ЦТЛ реализуются через индукцию образования в клетках-мишенях пор (под действием особых белков — перфоринов) и секрецию в поры специализированных сериновых протеаз — гранзимов, а также зачастую IFN [Р. Я. Мешкова, 1999], что вызывает нарушение осмотического баланса с внеклеточной средой и приводит к запрограммированной гибели клетки. К мембрансвязанным эффекторным молекулам на CD8 Т-клетках относят Fas-ligand, адгезия которого с Fas рецептором индуцирует *апоптоз* клетки-мишени. CD8 Т-клетки продуцируют интерферон, вызывающий экспрессию молекул МНС класса 1 и активацию макрофагов.

CD8 Т-клетки играют ведущую роль в механизмах иммуносупрессии.

ЦТЛ распознают антигены, представляемые на клеточную поверхность с помощью молекул МНС класса I. Т-хелперы, как и ЦТЛ, распознают не сам антиген, а в комплексе его с антигенами МНС. Происходит двойное распознавание — и антигена, и молекул МНС, экспрессированных на клеточной мембране в связи с антигеном. На мембране антиген-презентирующей клетки Т-хелперы взаимодействуют с МНС II класса, а на мембране соматической клетки цитотоксические лимфоциты распознают антиген в совокупности с МНС 1 класса. Также некоторые мембранные белки (CD40/CD40L и CD28/ B7) участвуют в проведении костимуляторных сигналов, необходимых для полноценной активации взаимодействующих клеток.

В начале XXI века открыты новые сведения о субпопуляциях Т-супрессоров — регуляторных Т-клетках [C. E. Tadokoro et al., 2006].

Регуляторные Т-клетки контролируют интенсивность иммунного ответа, подавляя активность других субпопуляций Т-лимфоцитов. Их характеризуют на основе происхождения, функционирования, экспрессии клеточно-поверхностных маркеров и FOXP3.

Известны такие варианты регуляторных Т-клеток как естественные (природные – natural), спонтанно развивающиеся в тимусе клетки CD4+CD25hiFOXP3+ (а-цепь рецептора IL-2) (nTreg), и как адаптивные, формирующиеся на периферии (индуцированные) iTreg клетки периферической крови (induced regulatory T cells), также с рецепторами к α-цепи IL-2: регуляторные Т-клетки типа 1 (T r1-клетки) и Т-хелперные клетки типа 3 (Tr2 или Th3). Все эти клетки происходят из CD4 Т-лимфоцитов [S. Sakaguchi et al.].

К группе iTreg клеток помимо Tr1-клеток и Th3-клеток, экспрессирующих корецептор CD4+, относят еще и CD8+ регуляторные Т-клетки, такие как CD8+CD28-клетки, CD8+CD122+, CD8+CD25+FOXP3+ [R. F. Wang, 2008; S. F. Ziegler, 2006].

Индуцибельные регуляторные iTreg клетки образуются вне тимуса в ходе иммунного ответа; они индуцируются под влиянием стимуляции активирующими агентами (в частности антигеном).

Дифференцировка iTreg является антигензависимой и осуществляется при определенных условиях: в присутствии цитокинов, обладающих иммуномодулирующими свойствами, и чувствительных к этим цитокинам APC [S. Beissert et al., 2006]. Клетки Tr1 в основном секретируют IL-10, а также в небольших количествах TGFβ и IL-5.

Регуляторные Т-клетки играют ключевую роль в иммунной системе. Благодаря уникальной способности контролировать иммунный ответ, они предупреждают аутоиммунные заболевания, аллергию, реакцию отторжения трансплантата, поддерживают пищевую и трансплацентарную толерантность [S. Sakaguchi, et al., 2010; E. M. Shevach, 2009]; также могут подавлять активацию, пролиферацию и эффекторные функции широкого круга иммунокомпетентных клеток, включая CD4+ и CD8+Т-клетки, натуральные киллерные и натуральные киллерные Т-клетки, В-клетки и антигенпрезентирующие клетки in vitro и in vivo.

Впервые Treg-клетки были охарактеризованы как CD4+CD25+Т-клетки при исследовании аутоиммунных заболеваний у мышей; позднее супрессорные свойства CD4+CD25hi Т-клеток были найдены у человека; описан ген, локализованный в хромосоме Х — FOXP3 (forkhead box P3).

Treg образуются в тимусе при воздействии Т-клеточного рецептора с соответствующим лигандом. Развитие Treg происходит в тимусе на стадии

двойных позитивных клеток или на стадии CD4+-лимфоцитов.

Согласно данным ряда исследований, естественные T-reg экспрессируют на поверхности множество молекул, таких как CD5, CD4+CD25+, FOXP3+, CTLA-4, CD4+CD45RBlow, CD8+, CD45, CD45RA, CD45R0 и др. [L. Chess, H. Jiang, 2004; R. F. Wang, 2008].

Считается, что в субпопуляции естественных T-reg супрессорную функцию выполняют клетки с высокой экспрессией CD25+ (CD4+CD25+$^{hi}$-клетки), присутствующие в организме человека к моменту рождения и составляющие около 2-3% от всего количества CD4+-клеток [C. E. Tadokoro et al., 2006]. Зрелые Treg, вырабатывающие супрессорные цитокины IL-10 и TGF-β, мигрируют на периферию.

В периферической крови среди CD4+ Т-клеток природные регуляторные Т-лимфоциты составляют 5-10%. Основная функция этих клеток – супрессия аутоагрессивных клонов Т-лимфоцитов (подавление аутоиммунной реакции), ингибирование способности Th1- и Th2-лимфоцитов вызывать аутоиммунные заболевания.

Дефекты в CD4+CD25+FOXP3+ Treg клетках могут способствовать развитию аутоаллергии, но эти процессы отменяются адаптивным переносом Treg клеток. Важная роль CD4+CD25+FOXP3+ Т-клеточной регуляции особенно ярко отмечается при болезнях человека, вызываемых мутациями в гене FOXP3, и проявляется в развитии тяжелого воспаления, нарушения аутоиммунитета у пациентов с синдромом Х-сцепленной иммунодисрегуляцией, полиэндокринопатией, энтеропатией (IPEX синдром). У таких пациентов вырабатывается широкий круг аутоантител, развивается инсулинозависимый диабет, тиреоидит, гемолитическая анемия и IBD.

Однако FOXP3+ Treg клетки подавляют противоопухолевый иммунитет, тем самым способствуя опухолевой прогрессии [S. Sakaguchi et al., 2010]. Кроме того, эти клетки также участвуют в развитии хронических инфекционных заболеваний [S. F. Ziegler, 2006].

Установлено, что развитие аутоиммунной патологии у экспериментальных мышей коррелирует с отсутствием субпопуляции Treg клеток, а специфическая стимуляция цитокинами IL-2 и IL-15 активирует CD4+CD25+$^{hi}$, осуществляющий супрессорный эффект на Т-эффекторные клетки, что способствует выздоровлению от аутоиммунного заболевания [J. Shimizu, E. Moriizumy, 2003].

При взаимодействии с IL-2 в клетках индуцируется экспрессия гена фактора транскрипции FOXP3 (скурфина), и клетки становятся устойчивыми к апоптозу. На мембране клеток появляются молекулы, обеспечивающие их супрессорные свойства и миграцию в зоны воспаления, а также адгезивные

молекулы и хемокиновые рецепторы.

Основной субпопуляцией CD4+CD25+FOXP3+регуляторных Т-клеток считаются естественные или натуральные регуляторные Т-клетки (nTreg). Эти клетки формируются в процессе нормальной дифференцировки в тимусе, а не под действием антигенной стимуляции.

В результате дифференцировки образуется небольшое количество nTreg клеток, обладающих относительно высоким сродством к аутоантигенам по сравнению с обычными CD4+ Т-клетками [Г. А. Жулай, Олейник Е К., 2012 S. Beissert et al., 2006]. Хотя незрелые FOXP3+ тимоциты найдены у человека, пока немного известно об условиях развития регуляторных Т-клеток в тимусе.

Естественные Treg ($CD4+CD^{25}$+FOXP3+ Т-лимфоциты) контролируют общее количество лимфоцитов в организме.

Таким образом, обе субпопуляции Treg (естественные nTreg и индуцированные на периферии iTreg) экспрессируют FOXP3 и подавляют иммунный ответ.

Однако естественные CD4+CD25+FOXP3+ Treg клетки отличаются устойчивостью в отношении поддержания регуляторной функции и экспрессии FOXP3 на периферии [S. Sakaguchi et al., 2010]. Недавно были установлены признаки, разграничивающие истинные $FOXP3^{+}$ nTreg клетки и FOXP3+iTreg клетки [П. Н. Кравченко, Е. К. Олейник, 2013].

Транскрипционный фактор Helios является маркером тимуспроизводных nTreg клеток. Для CD25+Foxp3+ iTreg клеток, индуцированных ДК *in vivo,* отмечается высокий уровень экспрессии транскрипционного кофактора Hopx (или Hop –homeodomain only protein) [D. Hawiger et al., 2010].

Показано, что *Hopx*-дефицитные iTreg клетки, индуцированные ДК, теряли способность к супрессии, в то время как для функционирования nTreg клеток Hopx не требовался.

В ходе развития иммунного ответа при помощи Th1- и Th2-лимфоцитов также на периферии формируются адаптивные (индуцированные) регуляторные Tr1 и Tr2-клетки, ограничивающие избыточность ответа, соответственно снижая генерацию Th1- и Th2-хелперов. Функционально ареактивны, индуцируются при контакте с антигеном на периферии и оказывают ингибирующее действие путем продукции иммуносупрессорных цитокинов IL-10 и TGF соответственно.

Tr1-клетки (CD4) контролируют развитие аутоиммунных процессов, регулируют активацию наивных клеток и Т-клеток памяти, функции ДК и развитие иммунного ответа на различные патогены, аллоантигены, принимают участие в процессе опухолевого роста. Супрессорные свойства Tr1-клеток связаны в основном со способностью к секреции IL-10, поскольку их функции могут быть

нарушены использованием анти-Ш-10 моноклональными антителами (мАТ).

Th3 (Tr2) относятся к индуцибельным регуляторным Т-клеткам, но в отличие от Tr1-клеток, Th3-клетки (CD4) в большом количестве секретируют TGF-β и немного IL-10. Они подавляют развитие аутоиммунных заболеваний и других избыточных иммунных процессов, участвуют в формировании толерантности. Th3-клетки ингибируют пролиферацию и секрецию цитокинов клетками Th1, а также активацию как Th1, так и Th2. Функции Th3-клеток связаны с секрецией TGF-β и могут быть нарушены анти-TGF-β, мАТ.

Популяции регуляторных CD4 Tr1-клеток и Th3-клеток локализованы преимущественно в слизистых оболочках пищеварительного тракта, осуществляют супрессорные функции при иммунном ответе. Нормальное функционирование данных Т-регуляторов необходимо для поддержания гомеостаза иммунной системы и предотвращения развития аутоиммунных заболеваний.

В субпопуляцию CD4+ Т-лимфоцитов входят Th17-лимфоциты, продуцирующие семейство IL-17 (IL-17A, B, C, D, E, F (IL-25)) [Z. Chen et al., 2011]. Th 17 образуются из «наивных» CD4+ Т-клеток под влиянием IL-6, IL-21, IL-23 и TGF-β через STAT3-ROR gt (related orphan receptor) путь. Эти клетки осуществляют противогрибковую и антимикробную защиту эпителиальных и слизистых барьеров, участвуют в развитии патологии воспалительных и аутоиммунных заболеваний. Вызывают нейтрофилию при аллергической бронхиальной астме.

Кроме того, одной из важнейших популяций являются Tfh (follicular helper). Эта популяция CD4+ Т-лимфоцитов расположена в лимфоидных фолликулах. Осуществляет хелперную функцию для В-лимфоцитов посредством продукции IL-21, вызывая их созревание и терминальную дифференцировку в плазматические клетки. Tfh также продуцируют IL-6 и IL-10, необходимые для дифференцировки В-лимфоцитов. Нарушение функций этой популяции приводит к развитию аутоиммунных заболеваний или иммунодефицитов.

Новой CD4+ популяцией являются Th9: продуценты IL-9 и IL-10. В присутствии IL-4 и TGF-β Th2-лимфоциты могут быть перепрограммированы в линию Th 9 клеток, переключившихся на секрецию IL-9, способного вызывать пролиферацию Т-хелперных клеток при отсутствии антигенной стимуляции, а также усиливать секрецию В-лимфоцитами IgM, IgG и Ig E.

Гуморальный иммунный ответ — это функция В-клеток, трансформирующихся в плазмоциты, продуцирующие антитела [Комплексное иммунологическое исследование [Электронный ресурс]; А. А. Ярилин, 1999]. Различают два основных типа В-лимфоцитов: В1 и В2, которые участвуют соответственно в Т-независимом и Т-зависимом антителообразовании. В-лимфоциты имеют клональное строение. Клетки каждого клона содержат рецепторы,

специфичные одному или нескольким родственным антигенам.

При гуморальном иммунном ответе происходит размножение активированных В-лимфоцитов и дифференцировка этих антиген-сенсибилизированных В-лимфоцитов в плазматические клетки, продуцирующие специфические (антиген-зависимые) антитела, направленные против растворимых и клеточных антигенов. При этом плазматические клетки теряют экспрессию специфических рецепторов для антигена.

В селезенке содержание В-лимфоцитов достигает 65%, что обеспечивает быстрое накопление антителпродуцирующих плазматических клеток на фоне антигенной стимуляции.

В1-лимфоциты (CD19+CD5+) участвуют в Т-независимом антителообразовании. В отличие от обычных В-лимфоцитов (В2), при синтезе антител В1-лимфоциты не нуждаются в помощи Т-клеток, продуцируют антитела только класса Ig M. Не образуют В-клеток памяти.

Молекулы CD5 (В1-клетки) являются маркером Т-клеток, взаимодействующим с мембранной молекулой В-лимфоцитов – CD72 [Медицинская микробиология..., 2010].

Основная масса В-лимфоцитов (В2-клетки) лишена этого антигена. Он присутствует на поверхности минорной фракции В-лимфоцитов — В1-клеток, на долю которых в крови приходится 25-35% от общего числа В-клеток.

Молекулы CD19 являются ранним маркером В-клеток, экспрессируются до появления IgM при циррозе печени. Чем выше уровень CD19+/CD5+, тем больше продукция антител к таким гормонам, как эстрадиол, прогестерон, хорионический гонадотропин, а также к медиаторам — серотонину и эндорфинам [Обзор по иммунологии репродукции [Электронный ресурс].

На тимуснезависимые антигены макрофагами вырабатывается интерлейкин 1, участвующий в регуляции антителогенеза В-лимфоцитами лишь на антигенный стимул.

Разновидности Т-независимых антигенов включают АГ I типа (В-клеточные митогены: ЛПС, полисахариды, АГ II типа (молекулы с повторяющимися эпитопами, способными к многоточечному связыванию с поверхностью В-клетки).

При Т-зависимом гуморальном ответе В2-лимфоциты получают сигнал, как от антигена, так и от Th2-лимфоцитов. Большинство антигенов, включая гаптены химической природы, вызывают Т-зависимое антителообразование. В2-лимфоциты — клетки гуморального иммунитета (эффекторы), ответственные за синтез иммунных антител (иммуноглобулинов) в ответ на любой антиген. Образуются в костном мозге. Дифференцируются в сумке Фабрициуса (у птиц) или ее аналоге у млекопитающих (селезенка, лимфатические

узлы, костный мозг). Ведут «оседлый образ жизни», в основном, в периферических лимфоидных органах. В периферической крови содержится лишь 15-20%.

Синтез иммуноглобулинов, основного звена гуморального звена специфического ответа, происходит в CD20+-лимфоцитах при участии макрофагов и популяций Т-лимфоцитов. Иммуноглобулины (антитела) обладают своеобразной реакцией конъюгации — связыванием с антигеном токсина и образованием нетоксичного комплекса.

Этапы антителообразования включают:

— премирование наивных В-клеток (связывание АГ с BCR);

— поглощение АГ, процессинг, экспрессия пептида с MHCII класса на поверхности В-лимфоцита;

— распознавание пептида с MHCII Th0;

— продукция Th0, IL-2, IL-4, IL-5;

— связывание CD40L (Th0) и CD40 (В-лимфоциты);

— Взаимодействие Th2-лимфоцитов с рецепторами В-лимфоцитов и передача антигенной детерминанты от Th2 к В-клетке, продукция Th2-клетками ростовых факторов, IL-4, IL-5, IL-6;

— пролиферация, дифференцировка В-лимфоцитов в плазматические клетки, синтез антител (IgM, а затем переключение на IgG, IgA, IgE), повышение аффинности синтезируемых антител;

— формирование клеток памяти.

Основные процессы синтеза иммуноглобулинов происходят в В-лимфоцитах при участии макрофагов и популяций Т-лимфоцитов.

Различают первичный и вторичный иммунные ответы.

Первичный иммунный ответ формируется при первом поступлении антигена (гаптена) в организм. При повторных контактах с антигеном развивается вторичный иммунный ответ.

По сравнению с первичным вторичный иммунный ответ отличается более короткой латентной фазой, интенсивным антителообразованием и более высоким максимальным уровнем антител, который сохраняется в крови несколько месяцев. Достигнутый высокий уровень иммунитета обеспечивает организму лучшую защиту. Во многом это обусловлено образованием долгоживущих клеток памяти (малые лимфоциты), которые вовлекаются в пролиферацию и синтез антител при повторном контакте с антигеном.

Дальнейшее введение антигена после вторичных реакций также повышает титр антител. Продолжительность этого процесса зависит и от самого антигена, то есть от того, какое количество таких гипериммунизаций необходимо провести, чтобы достичь максимального титра антител. После

достижения максимальной концентрации дальнейшее введение антигена может привести к снижению титра антител, что связано либо с механизмом регуляции по типу обратной связи, либо с выработкой клеток-супрессоров.

Как правило, иммунный ответ складывается из трех этапов:

— латентная фаза,
— пик антителопродукции,
— фаза снижения.

В латентной фазе циркулируют в крови лишь свободные антигены, а антитела отсутствуют, поскольку все образующиеся в эмфазу антитела связываются с антигенами в иммунные комплексы, которые элиминируются (выводятся) организмом. Эта фаза длится около недели.

Далее следует log-фаза. Она характеризуется синтезом специфических антител и нарастанием их количества в сыворотке крови. По достижении максимального уровня (пик-фаза) синтез антител может прекратиться, а вследствие катаболизма Ig их общая концентрация начинает снижаться.

В крови присутствуют клетки, первоначально синтезирующие только IgM-антитела, рецепторы которых расположены на поверхности всех зрелых В-лимфоцитов, не контактировавших с антигенами. В-клетки, созревание которых уже завершилось в костном мозге, наряду с IgM, несут рецептор Ig D.

В процессе иммунного ответа происходит смена на IgG, Ig A. IgE-клеточный рецептор кроме иммуноглобулина содержит дополнительные молекулы, не связанные с распознаванием, но необходимые для передачи сигнала. Среди них CD19, CD21, которые формируют корецепторный комплекс вместе с CD81. Кроме молекул рецепторного и корецепторного комплекса на поверхности В-клеток экспрессируются молекулы гистосовместимости II класса HLADR, т.к. В-лимфоциты являются антигенпрезентирующими клетками.

Тимуснезависимме антигены стимулируют синтез только Ig M [Ю. М. Степанов, 2008]. При этом не формируются клетки-памяти. Тимусзависимые антигены сначала индуцируют выработку преимущественно высокомолекулярных антител (IgM), а затем низкомолекулярных IgA и IgG; причем при первичном иммунном ответе выработка IgM значительно опережает по времени синтез IgG; фаза выработки IgG оказывается более продолжительной. При вторичном иммунном ответе синтез IgM и IgG начинается почти одновременно, причем IgG синтезируются более активно. Эти различия обусловлены разной степенью дифференцировки В-лимфоцитов к началу реакции.

Под действием Т-лимфоцитов происходит переключение синтеза с IgM на IgG и Ig A. Параллельно в ходе первичного иммунного ответа появляются

классоспецифические клетки памяти для IgM, IgG, IgA, IgE, но не для Ig D.

При повторном контакте с антигеном активируются эти клетки памяти, усиливается их пролиферация с последующим биосинтезом определенного класса иммуноглобулинов. При воспалительных заболеваниях отмечено снижение относительного количества В-клеток при остром панкреатите, хроническом тонзиллите и пародонтите, гнойном осложнении травм, а при острых и хронических формах гепатитов В и С возможно повышение этого показателя [Л. В. Пичугина, 2008].

Специфичность гуморальной реакции генетически детерминирована и состоит в том, что в ответ на появление в организме антигена начинает синтезироваться только тот клон иммуноглобулинов, который комплементарен антигену, те есть обеспечивает селективное связывание соответствующего ксенобиотика — антигена.

Наряду с плазматическими клетками при контакте с антигеном возникают В-клетки памяти, которые после контакта с антигеном не выделяют иммуноглобулины, а сохраняют информацию о структуре антигена. При последующем контакте с антигеном они под влиянием Т-хелперов и Т-клеток памяти, могут незамедлительно продуцировать большие количества антител.

В зависимости от характера действия антитела делят на лизины (растворяют чужеродные элементы), агглютинины (склеивают), преципитины (образуют осадок) и антитоксины (нейтрализуют токсины).

Антитела характеризуются специфичностью, валентностью, авидностью и афинностью. Специфичность — это способность распознавать только один антиген из множества (однако, как показала и наша практика, для ряда веществ, например, синтетических углеводородов, ФОВ и ФОС, возможно развитие перекрестной сенсибилизации на общий для этих соединений гаптен); валентность — способность к одновременному взаимодействию с определённым количеством одинаковых антигенов; аффинность – степень сродства антигенсвязывающего сайта антитела с антигенной детерминантой возбудителя; авидность — сила связи между антителом и распознанными антигенами.

Антитела входят в состав иммуноглобулинов, подразделяющихся на 5 основных классов: M, G, A, D, E. Иммуноглобулины класса M (IgM) образуются на ранних этапах иммунного процесса при первичном контакте с антигеном, связываются Fc-рецепторами макрофагов, зрелых В-клеток и вместе с системой комплемента лизируют чужеродные агенты.

IgM (или т.н. макроглобулин) — пентамер, образованный из пяти молекул, гомологичных IgG (состоящих из двух тяжёлых и двух лёгких цепей), объединённых джоинг-цепью [Биологические свойства антител [Электронный

ресурс]. Теоретически IgM способен связать сразу 10 антигенных детерминант или 5 патогенов. На долю IgM приходится около 10% общего количества иммуноглобулинов сыворотки крови. Эти антитела циркулируют в крови непродолжительное время и довольно быстро разрушаются. Могут компенсировать имеющийся дефект местного гуморального иммунитета, эффективнее других антител активируют систему комплемента по классическому пути благодаря максимальному пространственному соответствию между молекулой С1-компонента комплемента и композицией Fc-фрагментов мономеров макроглобулина. IgM не проходят через плаценту, но синтезируются плодом. Поэтому по концентрации этого класса иммуноглобулинов в пуповинной крови можно оценивать внутриутробную инфицированность новорождённого.

Затем плазматические клетки начинают продуцировать иммуноглобулины класса G, способные сохраняться длительное время после контакта с гаптеном и образовываться сразу после повторной встречи с антигеном, а также связываться с Fc-рецепторами макрофагов, гранулоцитов, NK-клеток. IgG — мономер, состоящий из двух тяжёлых и двух лёгких цепей. Такие антитела являются бивалентными, поскольку содержат два Fab-фрагмента. Класс IgG имеет 4 субкласса ($IgG_1$, $IgG_2$, $IgG_3$, $IgG_4$), которые отличаются эффекторными функциями и специфичностью.

К иммуноглобулинам класса G относятся антитела против большинства антигенов различной природы. IgG составляют 70-75% общего количества иммуноглобулинов сыворотки крови, проходят через плацентарный барьер, эффективно активируют систему комплемента.

IgA может встречаться в форме мономеров, димеров и тримеров. Иммуноглобулины класса А имеют сывороточную ($IgA_1$ и $IgA_2$) и секреторную формы, существенно отличающиеся между собой. Секреторный иммуноглобулин А (s-IgA) состоит их 2-х молекул сывороточного IgA, объединённых в одну структуру джоинг-цепью, содержит секреторный (транспортный) компонент, который обеспечивает защиту от протеолитических ферментов. Эти иммуноглобулины обеспечивают местный иммунитет слизистых оболочек. Присутствуют в слюне, секретах трахеобронхиального дерева, урогенитального, пищеварительного трактов, молозиве, грудном молоке. Не проникают через плаценту и не способны активировать систему комплемента по классическому пути. S-IgA нейтрализует вирусы, бактериальные токсины, активирует систему комплемента. В атопических реакциях этот иммуноглобулин действует в качестве блокирующего антитела, предотвращая реализацию реакции дегрануляции тучных клеток в ответ на поступление аллергенов.

Иммуноглобулин класса Е — мономер, содержащийся в незначительном количестве в сыворотке крови. Принимает участие в реализации реакций иммунной защиты против гельминтов и простейших, являясь важной составляющей мукозального иммунитета, а также взаимодействует с различными аллергенами. IgE связывается с антигенами Fab-фрагментами, фиксируется Fc-участками на мембранах тучных клеток, базофилов, эозинофилов, в результате чего высвобождаются БАВ, усиливающие течение иммунных процессов. Это способствует развитию защитной воспалительной реакции с выраженным экссудативным компонентом. При избыточном образовании IgE способствует возникновению аллергических реакций гиперергического характера. Не проникает через плаценту и не активирует комплемент.

Иммуноглобулин D активизирует рецепторы зрелых В-клеток. IgD не проникает через плаценту и не активирует комплемент.

Уровень иммуноглобулинов в плазме крови характеризует функциональное состояние гуморального звена адаптивного иммунитета.

Оптимальный иммунный ответ реализуется только при взаимодействии Т- и В-клеток: В-лимфоциты распознают детерминанты гаптена, а Т-клетки — носителя. Вторичная иммунная реакция на гаптен возможна только в случае, если после контакта с антигеном образуются клетки памяти, специфичные как к гаптену, так и к носителю (к носителю специфичны Т-хелперные клетки).

Помимо В-лимфоцитов, принимающих непосредственное участие в реакции антителообразования, имеются также В-супрессоры (пре-В), В3-лимфоциты (К-клетки или В-киллеры, которые убивают клетки-антигены, покрытые антителами), В-лимфоциты памяти; предполагается существование В-хелперов.

В-супрессоры расположены главным образом в костном мозге и селезенке, при активации они пролиферируют и продуцируют антитела. Эффект супрессии проявляется только к однородным по тканевой совместимости клеткам и направлен против хелперов, киллеров и активированных макрофагов. В-супрессоры замедляют клеточные реакции, тормозят синтез ДНК, выработку антител, ответ лимфоцитов на воздействие митогенов. Определенная роль принадлежит В-супрессорам в создании устойчивости к трансплантатам у новорожденных.

Иммунологическая память (ИП) находится в клетках памяти (КП) и в антигенпредставляющих клетках, несущих комплекс антигена с антигенами гистосовместимости класса (АГГ) II.

Значение АГГ как универсальных рецепторов и носителей антигенной информации не ограничивается территорией вспомогательных клеток.

Вероятно, комплексы АГГ с антигеном могут слущиваться с поверхности вспомогательных клеток и циркулировать в организме.

Различают В-клетки памяти (В-КП) и Т-клетки памяти (Т-КП).

В-лимфоциты иммунной памяти — долгоживущие малые лимфоциты. При поступлении в кровь В-КП рециркулируют и накапливаются в костном мозге. Они образуются в зародышевых центрах лимфатических узлов, селезенки и лимфоидных образованиях некоторых органов, например кишечника. Наивные В-клетки при встрече с антигеном, расположенном на фолликулярных дендритных клетках, превращаются в антителообразающие клетки или в В-КП. В-КП активируются при повторном распознавании того же антигена. Для В-КП характерным является наличие IgG или IgA и высокая экспрессия ингибитора апоптоза Bcl-2.

Клетки памяти, обеспечивающие иммунный ответ на знакомые антигены, являются Т-лимфоцитами (СД4). Т-клетки памяти — долгоживущие рециркулирующие малые лимфоциты, формируемые при первичном иммунном ответе. Они «запоминают» особенности детерминант антигенов и при повторном распознавании того же антигена развивают быстрый и усиленный ответ.

Т-клетки памяти отличаются от наивных и эффекторных Т-лимфоцитов высоким уровнем экспрессии мембранных маркёров активации, меньшей потребностью в провоспалительных медиаторах и корецепторных сигналах для развития вторичного иммунного ответа.

Выявлена зависящая от возраста динамика наивных лейкоцитов (CD45RA) и Т-клеток памяти (суррогатные клетки памяти: GD45R0): с возрастом количество CD45RA+CD3+CD4*-клеток снижалось, а количество CD45R0+CD3+CD4*, повышалось быстрее, чем соответствующих субпопуляций CD3+CD8+-лимфоцитов [А. П. Топтыгина и др., 2014]. Количество суррогатных клеток памяти резко возрастает в пожилом возрасте, что может спровоцировать аутоиммунные заболевания.

## 5.4 Участие цитокинов в иммунном ответе

Цитокины — это полипептидные межклеточные медиаторы, продуцируемые иммунокомпетентными клетками (около 200 полипептидов). Участвуют в межклеточных коммуникациях при иммунном ответе (пролиферация, дифференцировка лимфоцитов), в гемопоэзе, развитии воспаления и апоптоза, лишены специфичности в отношении антигенов [Н. В. Зайцева и др., 2016; Т. П. Оспельникова и др., 2014; Цитокины, 2008]. Обеспечивают согласованность взаимодействия иммунной и нейроэндокринной систем, как в

норме, так и при патологии, развившейся вследствие вредного воздействия разнообразных факторов. Являются эффекторами некоторых реакций иммунитета.

К цитокинам относятся интерлейкины, интерфероны, колониестимулирующие факторы (КСФ), хемокины, трансформирующие ростовые факторы; тимозины, фактор некроза опухоли и другие медиаторы.

Цитокины синтезируются в ответ на стимуляцию; не депонируются, долго не циркулируют по кровеносной системе, живут короткое время и оказывают местное воздействие на ближайшие клетки-мишени. В связи с коротким полупериодом жизни их регуляция осуществляется точно и быстро на транскрипционном уровне. Их называют «цитотрансмиттерами», «цитомедиаторами» (по аналогии с нейротрансмиттерами, нейромедиаторами и нейромодуляторами нервной системы). Один и тот же цитокин может продуцироваться различными по гистогенетическому происхождению типами клеток организма в разных органах.

Цитокины обладают плейотропностью биологического действия: могут влиять на пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность клеток-мишеней. Цитокины действуют на клетки различными путями: аутокринно — на клетку, синтезирующую и секретирующую данный цитокин; паракринно — на клетки, расположенные вблизи клетки-продуцента, например, в очаге воспаления или в лимфоидном органе; эндокринно — дистантно на клетки любых органов и тканей после попадания цитокина в циркуляцию, то есть гормоноподобно.

Классификация цитокинов проводится по их биохимическим и биологическим свойствам, а также по типам рецепторов, посредством которых цитокины осуществляют свои биологические функции. Классификация цитокинов по строению (табл. 5.2) учитывает не только аминокислотную последовательность, но прежде всего третичную структуру белка, более точно отражающую эволюционное происхождение молекул [N. Nicola, 1994].

Таблица 5.2 – Классификация цитокинов по структуре

| Группа | Особенности строения | Цитокины |
|---|---|---|
| 1 | α -спиральные тяжи, короткая цепь | IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IFN-γ, M-CSF, GM- |
| | α-спиральные тяжи, длинная цепь | IL-6, IL-10, IL-11, Oncostatin M |
| 2 | β -складчатые структуры, длинная цепь | TNF, TGF-β, IL-1 |
| 3 | α /β -короткая цепь | хемокины |
| 4 | смешанные мозаичные структуры | IL-12 |

Цитокины выполняют гемопоэтические, ростовые, дифференцировочные, провоспалительные, противовоспалительные, регуляторные, активирующие функции. Один и тот же процесс может регулироваться более чем одним цитокином, и один цитокин может участвовать в регуляции разных функций (IL-2, IL-4, IFN-γ), может наблюдаться синергизм их регуляторного действия. Основными клетками-продуцентами цитокинов являются Т-хелперы и макрофаги.

В настоящее время выделено более 20 интерлейкинов. Каждый интерлейкин имеет свои клетки-продуценты и выполняет определенные функции, обеспечивающие иммунный ответ организма. К цитокинам, действующим на Т-лимфоциты, относятся интерлейкины, интерфероны, ростовые факторы, ФНО.

IL-1 продуцируется макрофагами, моноцитами, нейтрофилами, Т- и В-клетками. Он способствует пролиферации Т- и В-клеток, участвует в воспалительных реакциях.

IL-2 продуцируют теофиллин-чувствительные Ts (ТПЧ) лимфоциты. Этот интерлейкин стимуулирует пролиферацию цитотоксических лимфоцитов, повышает активность NK-клеток (CD16). IL-4 вырабатывают Th2-лимфоциты, а также моноциты, макрофаги и другие клетки. Одна из его функций заключается в стимуляции пролиферации В-лимфоцитов.

IL-4 тормозит экспрессию тканевого фактора, вызывая гипокоагуляцию и усиление секреции активатора плазминогена и подавляет действие IL-1β, IL-6 и TNF-α на эндотелиальные клетки и макрофаги, являющиеся основными триггерами гиперкоагуляции [Гены иммунитета [Электронный ресурс].

IL-4 усиливает выработку IgE, что может провоцировать развитие аллергических реакций и воспаления дыхательных путей. В то же время он повышает цитокинетическую активность макрофагов, способствует миграции в очаг воспаления нейтрофилов, усиливает выработку колониестимулирующих факторов. Вместе с другими факторами иммунного ответа он участвует во множестве иммунных реакций.

Одним из важнейших регуляторных цитокинов, поддерживающих баланс между Т-хелперами 1-го и 2-го типов, является IL-12, который продуцируется макрофагами. IL-12 увеличивает количество Th1, помогая защите против микроорганизмов, которые контролируются клеточным иммунным ответом.

Другой важный регуляторный компонент — это гамма-интерферон, который подавляет функционирование Th2. Со своей стороны, Th2 могут продуцировать IL-10, который является супрессивным интерлейкином, подавляющим функцию Th1.

IL-18 является провоспалительным цитокином, который активирует Th2-

зависимый иммунитет путем индукции синтеза интерферона IFN-γ [С. А. Кетлинский, 2000]. Наиболее выраженная продукция IFN-γ наблюдается при использовании IL-18 в сочетании с IL-12.

Было отмечено, что одновременное использование этих интерлейкинов вызывает антиаллергическое действие. Однако введение одного IL-18 приводит к стимуляции продукции IL-4 и IL-13 тучными клетками и базофилами, которые, как выяснилось, имеют рецепторы для IL-18. Введение IL-18 мышам, дефицитным по IFN-γ, приводит к усилению продукции базофилами IL-4 и гистамина.

В настоящее время принято считать, что цитокины, которые продуцируются Th1 и Th2, используются как аутокринные факторы и как факторы, способные вызывать реципрокную супрессию (взаимное подавление функции).

Например, IL-12 обладает способностью не только влиять на созревание Th1, но и стимулировать их пролиферацию как паракринный фактор. Точно так же действует и IL-4 на Th2: он сначала индуцирует дифференцировку Th2, а затем уже как аутокринный фактор способствует их пролиферации; IFN-γ и IL-10 способны рецикпрокно подавлять функционирование Th1 и Th2.

Фактор некроза опухоли — это целое семейство цитокинов, которые вырабатываются макрофагами, Т- и В-лимфоцитами, моноцитами, нейтрофилами. ФНО осуществляют свои функции через соответствующее семейство клеточных рецепторов. Биологические свойства ФНО (TNF) чрезвычайно разнообразны и зависят от преобладания того или иного цитокина из его семейства.

Основные функции ФНО включают [Гены иммунитета [Электронный ресурс; Иммунология, 2013]:

— цитотоксическое действие, как на опухолевые клетки, так и на клетки, пораженные вирусами;

— стимулирование образование других активных веществ — лейкотриенов, простагландинов, тромбоксана;

— иммуномодулирующее и противовоспалительное действие (при активации макрофагов и нейтрофилов);

— увеличение проницаемости мембран;

— усиление инсулинорезистентности (эффект, приводящий к развитию гипергликемии, возможно вследствие торможения активности тирозинкиназы рецептора инсулина, а также стимуляции липолиза и увеличения концентрации свободных жирных кислот);

— повреждение эндотелия сосудов и повышение проницаемости капилляров;

— активацию системы гемостаза.

TNF усиливает секрецию простагландинов, оказывает хемотаксическое действие на различные клетки, вызывает повреждение эндотелия со снижением антикоагулянтной активности и увеличением тромбогенного потенциала; усиливает синтез белков острой фазы и подавляет активность цитохрома Р450 в печени, индуцирует апоптоз [М. Д. Шерлин Смит и др. [Электронный ресурс].

ФНО-α влияет на процессы кроветворения, подавляя эритро-, миело- и лимфопоэз. Однако на фоне подавленного кроветворения проявляется его стимулирующее действие. TNF вызывает цитолиз, индукцию апоптоза и клеточной смерти, усиливает экспрессию на клеточной поверхности АГГ II класса и опухолеассоциированных антигенов, способствуя тем самым развитию более интенсивного иммунного ответа на опухоль.

Печень способна продуцировать большое количество TNF-α. Его избыточная секреция ведет к нарушению функции митохондрий, отеку гепатоцитов из-за накопления в них натрия, индукции апоптоза, угнетению гепатоцеллюлярного образования желчи и холестазу.

Входящие в семейство Fas-лиганд TRAIL индуцируют апоптоз, а лимфотоксины α и β играют важную роль в развитии лимфоидных органов.

Цитокины, отвечающие за хемотаксис, выделены в группу хемокинов, включающих 4 семейства (более 40 белков) [М. Д. Шерлин Смит и др. [Электронный ресурс]. Они вырабатываются в ответ на воспаление под действием воспалительных цитокинов IL-1 и TNF-α. Обеспечивают связь между специфическим и неспецифическим иммунитетом.

Продукция интерлейкинов и других цитокинов происходит следующим образом. Образованные в очаге контакта с антигеном из «нулевых» клеток противовоспалительные Th3-лимфоциты направляются в близлежащие лимфатические узлы, где формируются новые, уже «обученные» клоны иммунных клеток, которые через кровоток и лимфатическую систему распространяются по всему организму [Кетлинский С.А., 2000]. В результате Th3-клетки начинают немедленно выделять трансформирующий ростовой фактор TGF-β. Этот цитокин, связываясь с рецепторами Th1 и Th2-клеток, блокирует синтез IL-1 и одновременно индуцирует синтез его рецепторных антагонистов, которые ингибируют (подавляют) синтез воспалительных цитокинов. Th2-лимфоциты под его воздействием начинают усиленно продуцировать противовоспалительные интерлейкины — IL-4 и IL-10. В свою очередь IL-4 воздействуют на Th3-клетки, вынуждая их синтезировать новые порции TGF. IL-4 вместе с IL-5, 6, 13 индуцирует в В-лимфоцитах синтез антител — IgG, IgM и IgA.

Цитокины участвуют в патогенезе различных заболеваний, связанных с

иммунопатологией, особенно с развитием воспалительных реакций, аутоиммунных состояний, иммунодефицита, онкопатологии [Цитокины, 2008; Т. П. Оспельникова и др., 2014; J. Young et al., 2002].

В частности, провоспалительные цитокины способствуют развитию атеросклероза, прогрессированию сердечно-сосудистых заболеваний, а противовоспалительные цитокины проявляют антиатерогенные свойства.

Учитывая спектр биологического действия, проводится терапия цитокинами (IL-1, 2, 3, 4, 10, 11, 12, интерферонами и др.) различных заболеваний (анемия, тромбоцитопения, опухоли, инфекционные болезни, СПИД и др.), цитокиновая генотерапия или, наоборот, блокирование цитокинов специфическими ингибиторами, моноклональными антителами.

С целью раннего выявления и коррекции химически обусловленных заболеваний, исходя из многогранной регуляторной функции цитокинов при иммунном ответе, следует шире внедрять изучение цитокинового профиля у людей, имеющих контакт с ОХВ [Г. М. Бодиенкова и др., 2010; Н. Г. Войтенко и др., 2015].

## 5.5 Воздействие ксенобиотиков на иммунную систему

Реализация иммунотоксического (иммунотропного) эффекта ксенобиотиков и их метаболитов разнообразна [П. Ф. Забродский, В. Г. Мандыч, 2007]. Прямое действие химических веществ на иммунную систему сочетается с опосредованным их влиянием через нервную и эндокринную системы на факторы неспецифической резистентности организма, морфофункциональные структуры специфического иммунитета.

Велика роль процессов метаболизма ксенобиотиков и нарушения механизмов их взаимодействия с Р-450-зависимыми монооксигеназами иммунокомпетентных клеток в возникновении иммунопатологических состояний

Система Р-450-зависимых монооксигеназ тесно связана с функцией системы иммунитета. В лимфоидной ткани животных и человека определены следующие монооксигеназные ферменты: бензпиренгидроксилаза (БГ), этоксирезоруфин-О-деэтилаза, аминопирин-н-деметилаза; идентифицировано ряд форм цитохрома Р-450 (Р-450РВ-1, Р-450РВ-4, Р-450МС-1α, Р-450МС-1β).

Выделяют две формы индукции монооксигеназ: фенобарбиталовую и метилхолантреновую (МХ). Наибольшая их активность обнаружена в клетках моноцитарно-макрофагальной системы. Другие клетки (тимоциты, спленоциты, лимфоциты периферической крови) способны к повышению активности Р-450-зависимых монооксигеназ после митогенной стимуляции.

Активность БГ в Т-лимфоцитах селезенки мышей в 5 раз превышает активность в В-лимфоцитах и в 2 раза выше в Т-супрессорах по сравнению с Т-хелперами.

Иммуномодулирующий эффект цитохрома Р-450 реализуется через изменения метаболизма эндогенных иммунорегуляторов или путем запуска процессов индукции/ингибирования (в том числе ксенобиотиками), что изменяет функцию иммунокомпетентных клеток. Гормоны тимуса (иммуностимуляторы) активируют Р-450-зависимые монооксигеназы печени.

Повышение активности Т-киллеров, Т-супрессоров и естественных киллеров происходит в результате индукции цитохром-Р-450-зависимых монооксигеназ в этих иммуноцитах.

Установлена связь (коэффициент корреляции 0,81-0,85) антиинфекционной резистентности организма с ингибированием монооксигеназ печени. Активность данных ферментов подавляется в результате функции макрофагов, продуцирующих интерферон и интерлейкин 1.

Механизмы иммуномодуляции определяются тропностью ксенобиотика или его метаболитов к той или иной популяции иммуноцитов.

Некоторые индукторы цитохрома Р-450 (барбитураты и другие соединения) являются иммунодепрессантами. Имеются препараты, обладающие как иммуностимулирующими, так и иммунодепрессивными свойствами, которые индуцируют синтез цитохрома Р-450.

Легочные альвеолярные макрофаги, содержащие Р-450-зависимые монооксигеназы, играют решающую роль в детоксикации вдыхаемых ксенобиотиков, однако могут участвовать в образовании метаболитов, обладающих выраженным иммунодепрессивным или канцерогенным действием, в изменении функций моноцитарно-макрофагальной системы легких.

Повышение иммунотоксичности может быть обусловлено образованием более токсичных метаболитов, чем поступившее в организм соединение. Например, после применения индукторов монооксидаз (этиленгликоль) наблюдается усиление супрессии гуморальных и клеточных иммунных реакций под влиянием их высокотоксичных метаболитов (гликолевого альдегида, гликолевой, глиоксиловой и щавелевой кислот).

Применение ингибиторов цитохрома Р-450 вызывает обратный эффект вследствие снижения образования продуктов биотрансформации. Так, использование ингибитора цитохрома Р-450 препарата SKF-525A до острого отравления белых крыс 1,2-дихлорэтаном и трихлорэтиленом в дозе 1,0 $DL_{50}$ вызывает замедление образования метаболитов с более высокой токсичностью (феномен «летального синтеза»), и соответственно редукцию иммуно-токсических свойств этих соединений.

При действии химических веществ в иммунотропных эффектах принимают участие различные медиаторы (ацетилхолин, катехоламины, нейропептиды и т.п.), гормоны гипофиза, надпочечников, щитовидной железы и других эндокринных органов.

Ксенобиотики и продукты их биотрансформации (в печени, легких, коже, лимфоцитах) оказывают прямое воздействие на иммуноциты и их предшественники, вплоть до полипотентной стволовой кроветворной клетки. Ряд из них обладает аллергенным действием (в качестве антигена — гаптена): взаимодействуют с белками крови и других тканей с образованием комплекса, который действует на иммуноциты и другие клетки, участвующие в иммунной реакции.

ОХВ могут вызывать супрессию иммунных реакций или проявление реакций гиперчувствительности (немедленного или замедленного типов), аутоаллергию. Возможно действие ксенобиотика в качестве толерогена (при этом токсикант отменяет или снижает реализацию гуморальных или клеточных иммунных реакций).

Нарушение клеточного иммунитета может быть связано с действием токсиканта на поглощение, переработку, представление его с молекулами главного комплекса гистосовместимости класса II Th1-лимфоцитам, продуцирующими INF-γ и другие цитокины, на предшественники Т-клеток-киллеров, регуляторных Т-лимфоцитов, функцию Т-киллеров, осуществляющих цитотоксическую реакцию.

Причиной вторичных (в том числе постинтоксикационных) иммунодефицитных состояний может быть повреждение структуры ДНК лимфоцитов и/или процессов репарации ДНК под влиянием ксенобиотиков и их метаболитов.

Нарушения функционирования иммуноцитов могут быть обусловлены неполноценностью процессов реаранжировки генов иммуноглобулинов, так как в этих процессах участвуют те же ферменты, что и в репарации ДНК. Дефекты иммунной системы при вторичных иммунодефицитах могут возникать в различных звеньях: Т- и В-лимфоцитарном, макрофагальном, гранулоцитарном, комплементном.

Общий механизм возникновения вторичных иммунодефицитов заключается в нарушении естественно существующих идиотип-антиидиотип-взаимодействий между рецепторами клеток и циркулирующими иммуноглобулинами под влиянием различных стрессовых и патогенных агентов и воздействий.

Большинство ОХВ действуют как на Т- и (или) В-системы иммунитета, так и на МНС и другие факторы, определяющие НРО.

Установлено, что в начальный период интоксикации хлорид марганца, некоторые пестициды, метилмеркаптан и нитро-аминосоединения активируют фагоцитоз.

Полигалогенизированные ароматические углеводороды, метилизоцианат, инсектицид токсафен, хлорофос, сероводород, аммиак, различные инсектициды, анилин, гербицид 2,4-Д и карбофос, свинец, двуокись кремния, трихлорэтан, оксид бутилолова, роданистый аммоний и тиомочевина, растворитель 2,5-гексадион и другие вещества угнетают макрофаги.

Активность нейтрофилов при хронической интоксикации снижают многие пестициды, ароматические, хлорированные и фторсодержащие углеводороды, бензин, свинец, ртуть, бериллий, сероуглерод, формальдегид.

Уменьшение бактерицидной активности сыворотки крови, лизоцимной, комплементарной, а также других неспецифических факторов резистентности организма отмечено при хроническом действии сернистого ангидрида, фенола, акролеина, оксида углерода, неорганических, соединений фенола, стирола, комбинированном действии различных химических соединений.

Тяжелые металлы (ртуть, свинец, кадмий) в экспериментах на мышах, крысах и кроликах существенно увеличивают восприимчивость организма к различным инфекционным агентам.

Показано, что повышение уровня заболеваемости различными инфекциями при контакте с большинством ОХВ связано со снижением неспецифической резистентности организма.

Т- и В-иммунодефицитное состояние вызывают ксенобиотики, нарушающие гуморальные и клеточные иммунные реакции при острой и хронической интоксикациях. К ним относятся хлорорганические пестициды и карбаматы, фосфорорганические соединения, диоксид азота, озон, полигалогенизированные ароматические углеводороды, в частности, диоксин, полихлорированные дифенилы. Так, диоксин нарушает дифференцировку В-лимфоцитов.

Снижение функции и содержания Т- и В-лимфоцитов в крови вызывает бензол, для которого характерно поражение преимущественно Т-супрессоров. Полициклические ароматические углеводороды снижают гуморальный и клеточный иммунные ответы, воздействуя на нуклеиновый обмен ИКК, вызывают супрессию продукции макрофагами интерлейкина-1 и Т-хелперами интерлейкина-2. Диоксин, метилизоцианат, озон, полихлорированные дифенилы, хлорорганические и другие пестициды вызывают супрессию формирования ГЗТ.

Снижение ГЗТ и антителообразования вызывает растворитель 2,5-гексадион. К ксенобиотикам, подавляющим преимущественно В-систему

иммунитета, относятся трихлорэтан, свинец, диметилнитрозамин, тиоизоцианат селена и др.

Супрессию антителообразования наряду с уменьшением фагоцитарной активности вызывают при хронической интоксикации различные пестициды, хлорированные, ароматические, фторированные углеводороды, ртуть, свинец, бериллий, сернистый ангидрид, сероуглерод и другие соединения.

Наряду с супрессией в ряде случаев при действии ОХВ может отмечаться противоположный эффект: повышенная чувствительность к отдельным веществам, вызывающим развитие аллергии (хром, никель, кадмий, НДМГ и др.).

Формальдегид, являющийся основным загрязнителем атмосферы промышленных городов, вызывает при хроническом действии антигенную стимуляцию иммунной системы, образование антител к данному соединению (Ig M, G, E), увеличение содержания Т-клеток памяти.

Повышение содержания клеток с фенотипом CD8 и CD4 зарегистрировано у лиц, связанных с переработкой алюминия, причем количество Т-клеток CD8 (Т-супрессоры) увеличивается в большей степени.

В таблице 5.3 представлены данные о действии распространенных загрязнителей атмосферного воздуха на здоровье населения.

Таблица 5.3 – Влияние токсичных химических веществ, загрязняющих атмосферу, на иммунный гомеостаз и возникновение различных заболеваний [Куценко С.А., 2004]

| Вещества, загрязняющие атмосферу | НРО | ГИ | КИ | Особенности реакций, нетипичные изменения | Иммунологические феномены, заболевания |
|---|---|---|---|---|---|
| Формаль-дегид | - | - | - | Увеличение Ig M,G,E,T – клеток памяти | аллергия, бронхиальная астма, инфекционные заболевания, заболевания верхних дыхательных путей, экзема, нейродермиты, контактная крапивница, отек Квинке |
| Оксиды азота | - | -<br>- | +<br>- | Увеличение Ig A, G. Стимуляция клеточ-ного иммунитета, кратковременная активация альвео-лярных макрофагов | аутоиммунные реакции, заболевания дыхательных путей, легких, острые респираторные инфекции |
| Фенол | - | * | * | Активация анти-телообразования при иммунизации | аутоиммунные реакции, инфекционные заболева-ния, заболевания дыха-тельных путей и легких |

Продолжение табл. 5.3

| Вещества, загрязняющие атмосферу | НРО | ГИ | КИ | Особенности реакций, нетипичные изменения | Иммунологические феномены, заболевания |
|---|---|---|---|---|---|
| Аммиак | - | * | * | Кратковременная стимуляция синтеза антител | аутоиммунные реакции, инфекционные заболевания, заболевания дыхательных путей и легких, контактная крапивница |
| Сероуглерод | - | - | * | | инфекционные заболевания |
| Диоксид серы | - | - | * | | инфекционные заболевания, заболевания дыхательных путей и легких, стоматиты, контактная крапивница |
| Свинец | - | - | | Увеличение синтеза Ig A, M, G, E | поражение стволовых кроветворных клеток |
| Фтористый водород | - | * | * | Стимуляция синтеза Ig A, E | инфекционные заболевания верхних дыхательных путей, пневмонии |
| Озон | * | - | - | Отсутствует влияние на иммунный ответ к тимуснезависимым антигенам или его усиление; стимуляция Т-супрессоров | инфекционные заболевания |
| Окись углерода | - | - | * | Лейкоцитоз или лейкопения, лимфоцитоз, моноцитоз | крапивница |
| ПАУ:<br>бенз(а)пи-рен<br>бенз(е)пи-рен<br>антрацен<br>бензантра-цен<br>дибензант-рацен<br>3-метилхо-лантрен<br>7,12 диметил-бензан-трацен | <br>0<br>*<br>*<br>*<br>-<br>-<br>- | <br>-<br><br>0-<br>-<br><br>-<br><br>- | <br>-<br>0<br>*<br>*<br>*<br>-<br><br>- | Стимуляция макрофагов, угнетение продукции интерлейкинов, индукция синтеза антител к токсиканту | аутоиммунные реакции; сенсибилизирующий, аллергический, канцерогенный, мутагенный, гепатотоксический эффекты, инфекционные и онкологические заболевания |
| Диоксин (2,3,7,8 тетрахлордбензо-п-диоксин) | - | - | - | Нарушение дифференцировки В-лимфоцитов, ослабление продукции ИЛ2, усиление бластрансформации лимфоцитов | аутоиммунные реакции, сенсибилизирующий, аллергический, канцерогенный, мутагенный, гепатотоксический эффекты, инфекционные заболевания, хлоракне, геперкератоз |

Продолжение табл. 5.3

| Вещества, загрязняющие атмосферу | НРО | ГИ | КИ | Особенности реакций, нетипичные изменения | Иммунологические феномены, заболевания |
|---|---|---|---|---|---|
| Металлы и их соли | -<br>+ | -<br>+ | - | В зависимости от элемента химического соединения поражается преимущественно Т- или В – система иммунитета; активация макрофагов и др. модулирующие эффекты | аллергозы (аллергический дерматит, лекарственная аллергия, ринит, пищевая аллергия, поллиноз); сенси-билизирующий, канцерогенный, мутагенный эффекты, аутоиммунные расстройства: бронхиальная астма, пневмокониоз, респираторные заболевания, рак полости рта, носа, гортани, желудка, саркомы, В-клеточная лимфома |
| Метилмеркаптан | * | * | * | Стимуляция фагоцитарной активности | * |
| Пестициды | - | - | - | В зависимости от химического строения и экспозиции может наблюдаться как супрессия, так и стимуляция НРО | инфекционные, онко-логические заболевания; экзема, дерматит, бронхиальная астма, конъюнктивит, холинергическая крапивница (ФОС) |

Примечание. ГИ – гуморальный иммунитет; КИ – клеточный иммунитет; + – увеличение; – – уменьшение; * – влияние практически не изучено; 0 – эффект не обнаружен.

Некоторые ОХВ разнонаправлено изменяют функцию Т- и В–систем иммунитета. Так фосфорорганические пестициды и карбаматы при хроническом воздействии на людей приводят к уменьшению содержания Т-лимфоцитов и увеличению В-клеток в циркулирующей крови. Пестицид сульфазан подавляет первичный гуморальный иммунный ответ и усиливает ГЗТ.

Диметилнитрозамин подавляет функцию Т-лимфоцитов и усиливает бласттрансформацию В-клеток, активность ЕКК, реакцию ГЗТ. Хлористый кадмий в опытах на мышах тормозит генерацию аллореактивных Т-лимфоцитов путем активации антигеннеспецифических супрессоров и стимулировал секрецию В-клетками иммуноглобулинов М и G. В целом аналогично влияет на иммунитет интоксикация хлористым свинцом. Углеводороды нефти у рабочих понижают функциональную активность Е-клеток, уменьшают содержание в крови Т-супрессоров и усиливают синтез иммуноглобулинов G и

М. В-лимфоциты по сравнению с Т-лимфоцитами и нулевыми клетками более чувствительны к действию формальдегида.

Химические токсиканты, вызывающие аллергизацию организма и активацию аутоиммунных процессов, можно разделить на следующие группы:

— ксенобиотик или его метаболиты являются полными антигенами;

— вещество или его метаболиты являются гаптенами, способными образовывать с белками крови иммуногены и аутоантигены; ксенобиотик или его метаболиты являются полными антигенами;

— вещество или его метаболиты ковалентно связываются с макромолекулами легких, кожи, желудочно-кишечного тракта и других органов и тканей;

— вещество непосредственно повреждает иммунную систему, активируя В-лимфоциты, Т-лимфоциты, увеличивая соотношение хелперов/ супрессоров;

— вещество вызывает повреждение органа с высвобождением «скрытых» антигенов, превращающихся таким образом в аутоантигены;

— ксенобиотик имеет общие антигенные детерминанты с макромолекулами тканей организма.

Сенсибилизирующий эффект может быть обусловлен наличием гаптенных свойств в виде эпоксидных, альдегидных, кетонных, ангидридных группировок. Гаптенными свойствами обладают ионы металлов (Be, Cr, Ni, Co, Мп). Подобную роль могут играть активные метаболиты, образующиеся в результате микросомального окисления с участием цитохрома Р450, также продукты неполного восстановления кислорода (супероксидный анион-радикал, пероксид водорода, анион-радикал), также приводящие к канцерогенным и мутагенным эффектам.

У чувствительных лиц даже от доз токсикантов значительно ниже допустимых уровней могут развиваться гиперреактивные аутоиммунные и аллергические реакции.

После воздействия патогена (ксенобиотика) первым в течение минут и часов развивается врожденный защитный ответ, через 1-3 дня после распознавания антигенов осуществляется специализированный иммунный ответ, а затем к 5-7 дням формируется Т-клеточный адаптивный иммунный ответ.

Однако иммунологическая реакция на патогенный сигнал не бывает исключительно неспецифической или специфической, так как для эффективной иммунной защиты необходима согласованность комбинации неспецифических и специфических (адаптивных) механизмов организма при встрече с большинством угрожающих антигенных воздействий, в том числе

ксенобиотиков [В. Т. Ивашкин, 2008].

Эти механизмы включают примордиальные защитные реакции «узнавай и разрушай» (неспецифический — иннатный — иммунитет; innate immunity), а также сложные реакции распознавания и селективного уничтожения, которые обладают исключительной специфичностью, многоуровневой регуляцией и памятью (специфический — адаптивный — иммунитет; adaptive immunity).

Воспаление представляет собой мобилизацию и эффекторную активацию компонентов неспецифической иммунной системы в ответ на сигналы «опасности». Дендритные клетки и макрофаги занимают при этом центральное место в иммунных ответах обеих систем. Т- и В-клетки служат участниками преимущественно адаптивных иммунологических реакций.

Интенсивность врожденного иммунитета наиболее высока в местах быстрой смены клеток (высокая вероятность мутаций) или в органах, постоянно подвергающихся воздействию чужеродных антигенов, в том числе ксенобиотиков (легкие, желудочно-кишечный тракт, печень и др.).

Повышение адгезии (агломерации) лейкоцитов периферической крови, наряду с гиперлипидемией, обусловливающее нарушение микроциркуляции в кровеносных сосудах, развитие гипертензии, может быть связано с воспалительными процессами, сопровождающими аутоаллергию при контакте с углеводородами и другими токсикантами [Санитарно-эпидемиологическое обеспечение, 2012].

Склонность к развитию гиперреактивных состояний, иммунодефицита и другим иммунопатологиям объясняется генетически обусловленными особенностями человека.

Имеющиеся в промышленной токсикологии сведения свидетельствуют, что с целью разработки перспективных способов иммунопрофилактики актуально изучение молекулярных и генетических нарушений защитных механизмов врожденного и адаптивного иммунитета, характерных для действия групп ксенобиотиков, обладающих соответствующими иммунопатогенными свойствами.

### 5.6 Влияние полиморфизма генов на обеспечение иммунной защиты при воздействии ксенобиотиков

К настоящему времени накоплены сведения об участии генов главного комплекса гистосовместимости (MHC от англ. — major histocompatibility complex) в регуляции иммунореактивности и об их связи с патологией [Р. М. Хаитов, Л. П. Алексеев, 2000; P. Parham, 2005; S. Rajagopolan, E. Long, 2005]. Этот комплекс определяет гистосовместимость тканей при пересадке органов.

Система генов гистосовместимости (HLA от англ. — human leukocyte antigens у человека) осуществляет генетический контроль взаимодействия иммунокомпетентных клеток организма, распознавание своих и чужих клеток (в том числе и изменённых собственных клеток), координацию ИКК, запуск и реализацию иммунного ответа.

Многообразие функций, выполняемых HLA, обеспечивает выживание человека как вида в условиях экзогенной и эндогенной агрессии и обусловлено особенностями строения главного комплекса гистосовместимости.

Основное качество HLA состоит в аллельном полиморфизме, которое является важнейшим механизмом вариабельности и естественного отбора, защиты человека от эволюционного множества патогенов, включая действие ОХВ.

Иммуногенетические исследования на молекулярно-генетическом уровне показали, что различные молекулы МНС по структуре сходны, но не идентичны, имеют различия в аминокислотном составе лепидсвязывающих сайтов, что вносит изменения в презентацию антигенных пептидов рецепторам Т-лимфоцитов. Вместе с тем с одной и той же молекулой МНС могут взаимодействовать разные пептиды, которые могут отличаться по сродству к этой молекуле. Через этот механизм реализуется Ir-генный контроль интенсивности иммунного ответа на Т-зависимые антигены.

Гены комплекса кодируют белки, локализующиеся на клеточной мембране. Наибольшее количество трансплантационных антигенов расположено в лимфоидной ткани, также они находятся в печени, легких, кишечнике, почках, сердце, желудке, аорте и в мозге. Не найдены антигены HLA в жировой ткани, на эритроцитах, нейронах.

Комплекс генов *HLA* расположен на коротком плече 6-й хромосомы, имеет протяжённость около 3500 kb. Гены *HLA* сконцентрированы в 7 областях (локусах): HLA-A, HLA-B, HLA-C и HLA-D. Комплекс содержит более 220 генов (более 2000 аллелей), которые подразделяют на три группы: I, II и III классы. Для всего комплекса характерен выраженный генетический полиморфизм.

Молекулы HLA-I класса имеются на всех ядерных клетках человека, контролируют синтез трансплантационных антигенов и играют важную роль в иммунном ответе: в реализации эффекторной функции цитотоксических Т-лимфоцитов по уничтожению инфицированных клеток, обеспечивают взаимодействие между всеми ядросодержащими клетками организма.

Молекулы HLA-I класса относятся к гликопротеинам и состоят из двух цепей. В локусе HLA-A известно 22 аллеля, в HLA-B – 42 аллеля, в HLA-C — 8 аллелей. В последние годы в пределах I класса системы HLA открыты новые

неклассические типы — E, F, G, H, J, а также MIC, но полиморфизм и их биологическая функция не установлены.

Молекулы HLA-II класса представлены на иммунокомпетентных клетках, имеющих главную функцию презентации антигенов, например, Т- и В-лимфоциты, моноциты, макрофаги, дендритные клетки. Они обеспечивают взаимодействие антигенпрезентирующей клетки с Т-хелперными лимфоцитами, способствуют формированию популяций Th1 и Th2, направляя развитие клеточного или гуморального звеньев иммунитета. Молекулы HLA-II класса являются мембранными гликопротеинами, состоят из двух цепей (α и β).

В локусе D выделено 3 сублокуса: DP, DQ, DR, которые являются классическими; выделены сублокусы DM, DO, DN и TAP, LMH (не экспрессированные на клетках). Для этих генов также характерен полиморфизм. В системе *HLA-генов* II класса обнаружены гены TAP1 и TAP2, которые возможно влияют на силу иммунного ответа.

Между генами *HLA-I* и *HLA-II* расположены молекулы HLA III класса. Гены *HLA-III* включают сублокусы для компонентов комплемента C2, C4, C4a, для Bf (пропердиновый фактор), гены ФНО, белков теплового шока и кодирующие синтез 21-ОН-гидроксилазы.

Полиморфизм комплекса *HLA* обеспечивает механизм иммунного контроля антигенного гомеостаза человеческой популяции и её выживаемость в быстро изменяющейся среде обитания.

Доказано, что один и тот же антиген вызывает иммунный ответ разного уровня у лиц с разными генотипами и в то же время организм может быть реактивным в различной степени к разным антигенам. Гены, контролирующие высокоспецифичный иммунный ответ (immune response genes — Ir), локализованы в HLA-II класса.

В различных возрастных группах набор антигенов гистосовместимости отличается, в основном, за счет редко встречающихся антигенов. В старших возрастных группах антигены, ассоциированные с аутоиммунными заболеваниями (HLA-B8), выявлялись значительно чаще. В группе долгожителей достоверно чаще встречались антигены A9, A10, B5, B8, B16. Выявлена связь HLA с чувствительностью к вирусным инфекциям, опухолям и аутоиммунным заболеваниям.

Одной из важнейших функций HLA DR-генов и кодируемых ими белковых молекул является регуляция иммунного ответа за счет участия в механизме HLA DR-опосредованного апоптоза различных типов АПК. Они также принимают непосредственное участие в апоптозе В-лимфоцитов.

Регуляция апоптоза дифференцирующихся АПК осуществляется через

HLA-DR-молекулы и это может явиться решающим механизмом для ограничения жизни АПК.

Для В-лимфоцитов, по-видимому, помимо непрямого, включающего взаимодействие лигандов Fas/Fas, может существовать и прямой механизм HLA-DR-опосредованного апоптоза, не включающий эти рецепторы. Такое прямое взаимодействие может иметь значение для злокачественно перерожденных В-лимфоцитов, утративших экспрессию лиганда Fas.

Генам главного комплекса гистосовместимости, помимо физиологической функции генетического контроля специфического иммунного ответа, принадлежит еще ряд важнейших физиологических функций.

Одной из них является генетический контроль качества иммунного ответа: ассоциированный с системой HLA контроль активности различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток, обеспечивающий на конечном уровне качество иммунного ответа человека.

В последнее время стало известно, что главному комплексу гистосовместимости принадлежит существенная роль в регуляции активности популяции клеток, стоящих «на грани» между факторами, определяющими специфический и неспецифический иммунитет. Это — так называемые естественные клетки-киллеры.

Так, определенные комбинации KIR-рецепторов и белков MHC ассоциированы с репродуктивными нарушениями, способны замедлить прогрессию определенных инфекционных заболеваний (СПИД и цитомегаловирусная инфекция), другие комбинации ускоряют или замедляют прогрессию опухолей; некоторые комбинации KIR-MHC коррелируют со снижением ингибиторных сигналов, что ведет к более быстрому и интенсивному развитию аутоиммунных заболеваний (диабет I типа, псориатический артрит) [М. М. Коляскина, 2011; P. Parham, 2005; S. Rajagopolan, E. Long, 2005].

Система TLR врожденного клеточного иммунитета включает соответствующие этим рецепторам гены, кодирующие TLR, мРНК, сигнальные белки, а также эффекторные молекулы, которые вырабатываются в результате активации TLR и опосредуют их эффекты [А. А. Кубанов, Т. В. Абрамова, 2015].

Дефекты (полиморфизм генов TLR) в системе TLR, вызывающие нарушение экспрессии TLR, распознавание патогенных лиганд, передачи сигнала, выработки эффекторных молекул, могут приводить к развитию тяжелых инфекционных, аллергических, онкологических, аутоиммунных и других заболеваний.

Гены, кодирующие каждую из цепей, достраиваются в процессе созревания Т-лимфоцитов из отдельных сегментов: V (вариабельный), D (разнообразный,

только для β-цепей), J (соединяющий), C (константный). Комбинации генных сегментов обеспечивают изменчивость рецепторов, необходимую для распознавания антигенов. У большинства Т-лимфоцитов рецепторы состоят из α- и β-цепей.

Рекомбинация ДНК происходит при объединении V-, D- и J-сегментов и катализируется тем же комплексом рекомбиназ, что и при дифференцировке В-лимфоцитов. После перестройки VJ в генах α-цепи и VDJ в генах β-цепи, а также после присоединения некодируемых N- и P-нуклеотидов с ДНК транскрибируется РНК. Гены α-цепи могут перестраиваться неоднократно при уже правильно перестроенных и экспрессированных генах β-цепи. Есть вероятность того, что одна клетка может нести более одного варианта TCR. Соматическому гипермутагенезу гены TCR не подвергаются.

Принято, что гены *TH2* (кодирующие Т-хелперы 1-го типа) и *TH3* (кодирующие Т-хелперы 2-го типа) представляют собой альтернативные состояния экспрессии генов и функции CD4+-Т-лимфоцитов.

Дифференцировка Treg — естественных регуляторных Т-лимфоцитов (ранее: GD4+GD25hi) связана с экспрессией гена *FOXP3.* Снижение этого гена приводит к утрате Treg Т-клеток, а повышенная экспрессия вследствие трансфекции гена — к приобретению им супрессорной активности и фенотипа Treg [S. Hori et al., 2003]. У человека это не является единственным условием для дифференцировки этих клеток [S. F. Ziegler, 2006].

У человека описано 4 изоформы FOXP3, одна является полномасштабной, а 3 другие формируются с делецией 2 или 7, или одновременно 2 и 7 экзонов [R. K.W. Mailer et al., 2009]. Экзон 2 кодирует домен молекулы FOXP3, ответственной за связывание транскрипционных факторов семейства RGR — α и γ, одна из функций которых индукция дифференцировки Th17-клеток. Экзон 7 кодирует последовательность, ответственную за димеризацию молекулы. Молекулы с делецией продуктов экзонов 2 и 7 локализуются в отличие от полномасштабной молекулы внутри ядра.

При активации наивных GD25-GD4+ Т-клеток экспрессия *FOXP3* определяется в основном в цитоплазме (iTreg), а при активации GD25+GD4+ Treg — внутри ядра.

Показано, что промоторный регион FOXP3 гена nTreg клеток полностью деметилирован, в отличие от iTreg клеток, для которых был характерен метилированный промоторный регион FOXP3 гена, что может быть причиной нестабильной экспрессии FOXP3 в Т-клетках [Г. А. Жулай, Е. К. Олейник, 2012]. Мутация гена *FOXP3* была обнаружена у человека — она приводила к тяжелым заболеваниями с летальным исходом: Х-сцепленному рецессивному синдрому иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии и энтеропатии (IPEX)

и Х-сцепленному синдрому аутоиммунитета и аллергической дисрегуляции (XLAAD). Среди клинических форм данной мутации преобладают сахарный диабет типа 1, тиреоидит, воспалительные заболевания кишечника, аллергический дерматит, аллергия к пищевым продуктам, нарушение гемопоэза, тяжелые инфекционные заболевания [А. А. Ярилин, А. Д. Донецкова, 2006].

Ключевыми факторами, определяющими тип иммунитета, являются гены, кодирующие IFN и IL-4 [С. А. Кетлинский, 2000]. Так, в отсутствии гена *IFN* нарушается иммунный ответ по клеточному типу, поддерживаемый ТН2, элиминация IL-4 блокирует ТН3-зависимый гуморальный ответ. Переход в ТН2 и ТН3 происходит в результате направленной дифференцировки ТМ в лимфоциты, кодируемые геном ТН2 или ТН3. Он осуществляется двумя основными цитокинами IL-12 и IL-4 соответственно.

В связи с этим особый интерес проявляется к изучению возможных механизмов регуляции экспрессии генов обоих цитокинов. Считается, что IL-4 является основным фактором в определении дифференцировки стимулированных антигеном наивных CD4+-Т-клеток в ТН3.

Экспрессия гена *IL-4* происходит в результате активации гена *STAT6,* который связывается с определенным участком (мотивом) регуляторной области гена *IL-4.* STAT6-зависимая продукция IL-4 присуща только Th3.

Функция гена *STAT6* состоит в активации транскрипционных факторов GATA-3 и c-maf, которые и вызывают развитие ТН3 [О. В. Смирнова, Л. Р. Выхристенко, 2011]. Показано, что вовлечение в процесс дифференцировки Т-клеток транскрипционного фактора GATA-3, приводит к активации STAT6 в ТН3 и депрессии STAT4 в ТН2.

Протоонкоген c-maf ответственен за тканеспецифическую экспрессию IL-4. Этот транскрипционный фактор c-maf контролирует продукцию только IL-4, но не других цитокинов, продуцирующихся ТН3, однако, если дефицитные по c-maf Т-клетки дифференцируются под воздействием экзогенно добавленного IL-4, то происходит продукция других цитокинов, характерных для ТН3. ТН2 не могут синтезировать IL-4 и даже не способны поддержать транскрипцию репортерного гена, находящегося под контролем IL-4 промотора.

Таким образом, важную роль в клеточно-специфической индукции IL-4 играет STAT6, который фосфорилирует молекулы c-maf и GATA-3, свойственные только для ТН3 [А. Н. Силков и др., 2012]. STAT6 экспрессируется в ТН2 и ТН3, но его фосфорилирование находится под контролем регуляторных молекул специфичных для ТН3.

Продукция IL-4 Th0, зрелыми антигенспецифическими ТН3 или NK-T хелперами не зависит от STAT6. Считается, что сигнальный путь IL-4 STAT6

не является основным для развития Th3-клеток. Этот путь (IL-4 /STAT6) участвует в поддержании и распространении ТН3.

ТН2 характеризуются продукцией IFN, но не IL-4, и требуют IL-12 для активации транскрипционного фактора STAT4. Важность гена *STAT4* в развитии ТН2 была продемонстрирована на нокаут мышах (отсутствие STAT4). При этом наблюдалось отсутствие продукции IFN в ответ на действие IL-12.

Факторы, направляющие дифференцировку предшественников в ТН3, отличаются от тех, которые индуцируют ТН2, а в некоторых случаях имеют противоположную направленность. Наблюдается также ситуация, когда цитокины ТН2 подавляют продукцию цитокинов, свойственных ТН3.

К генам, продукты которых предотвращают апоптоз, относятся *Bcl-2, Bcl-x, Bcl-w, Mcl-1, ALG-3* и др. Транскрипция этих генов происходит при получении клеткой «сигнала на выживание». Для В-лимфоцитов таким сигналом служит связывание BCR с антигеном, для тимоцитов — удовлетворительное связывание TCR с МНС при позитивной селекции, для периферических Т-лимфоцитов — постоянное узнавание эндогенных пептидов в комплексе с МНС.

Гены, кодирующие вариабельные области молекул иммуноглобулинов и рецепторов Т-лимфоцитов, подразделяются на три кластера: V, D и J, расположенных на трех различных хромосомах [Иммуноглобулины [Электронный ресурс], Иммунология, 2013].

Отмечены: большое число вариабельных областей генов (V) в каждом из Н, каппа- и лямбда-локусов; рекомбинации между V-, D- и J-сегментами, кодирующими фрагменты вариабельных доменов; разнообразие вариантов, возникающих на границе соединяющихся сегментов как следствие неточного соединения, делеции или включения дополнительных нуклеотидов; точечных соматических мутаций; комбинаций между легкими и тяжелыми цепями.

В эмбриональном наборе иммуноглобулины представлены 30-500 V-генами вариабельных областей, 12-15 минигенами D и 40-50 короткими J-сегментами. Гены константных областей существуют в виде одной копии для каждого подкласса.

Случайное соединение внутри каждой группы генов любого V-гена с любым D, а затем J-сегментом приводит к возникновению около 30000 тяжелых и 800 легких цепей иммуноглобулинов. Спонтанная ассоциация легких и тяжелых цепей приводит к образованию огромного количества В-лимфоцитов с различной специфичностью: 24000000.

Дополнительное разнообразие обеспечивается комбинациями V - D - J. Кроме этого, после первичного иммунного ответа гены В-лимфоцитов с

высокой частотой мутируют (мутации затрагивают V-области); возможно, это способствует образованию антител с более высокой аффинностью при вторичном ответе.

Индукция генов цитокинов определяется воздействием транскрипционных факторов на промоторный участок соответствующего гена [Т. П. Оспельникова и др., 2014].

Например, для активации гена *IL-2* и ряда других лимфокинов необходимо связывание с промотором ядерных белков нуклеарного фактора активированных Т-клеток (NFAT), активатора протеина-1 (АР-1) и др.). Эти факторы отсутствуют в покоящихся клетках и формируются в процессе клеточной активации.

Цитокины угнетают транскрипцию генов и накопление мРНК различных изоформ цитохрома Р450 в клетках; возможно и посттранскрипционное угнетение синтеза белка некоторых изоформ [K. W. Renton, 2004].

Депримирующее (угнетающее) воздействие на цитохром Р450-зависимые монооксигеназы обнаружено у IFN-α, IFN-β, IFN-γ, IL-1 и TNF, IL-6, IL-11, IL-2.

Благодаря цитокиновой модуляции процессов монооксигенирования на цитохроме Р450, реализуется адаптация механизмов биотрансформации низкомолекулярных ксенобиотиков в условиях активации иммунной системы. Это обеспечивает, с одной стороны, защиту от последствий возможной неконтролируемой активации потенциально опасной для организма ферментной системы и снижение риска нарушения оксидантного равновесия, с другой — сохранение оптимального уровня и неогенез необходимых для адекватного «ответа» организма низкомолекулярных липофильных сигнальных молекул.

Ген фактора некроза опухоли расположен на 6-й хромосоме, в позиции 6p21.1-21.3 внутри кластера генов III класса главного комплекса гистосовместимости между генами HLA-B и HLA-DR. Известны более 30 полиморфных вариантов гена (SNP-полиморфизмы, микросателлиты).

*TNF-α* аллель связан с повышенным уровнем продукта гена в циркулирующей крови, что является противоопухолевым фактором. Цитокин TNF-*α* определяет ответ иммунной системы на воспаление, также как и IL-4 он обладает противовоспалительной активностью.

В настоящее время из 8-ми описаны 4 полиморфизма гена *TNF-α,* связанных с единичными нуклеотидными заменами гуанина на аденин: 376 G/A, 308 G/A, 238 G/A и 488 G/A [Генетический полиморфизм [Электронный ресурс]. Наибольший интерес исследователей вызывает SNP-полиморфизм промоторной области гена в позициях -238,-308 с заменой гуанина на аденин, а также в позиции -863 с заменой цитозина на аденин.

Полиморфизм 238 G/A связан со снижением экспрессии гена с уменьшением выработки белка TNF-*α* и соответственно со снижением концентрации NOS и повышением продукции свободных радикалов. Показана сниженная спонтанная продукция TNF-*α* у лиц с генотипом *GG* относительно лиц с генотипом *GA* в позиции -238 промотора гена *TNF-α* [А. Н. Силков и др., 2012].

У больных ревматоидным артритом повышена частота встречаемости генотипа *TNF-238GG* и аллеля *G* в этой позиции, снижение частоты аллеля *C* в позиции *TNF-857* и частоты встречаемости сочетания генотипов *TNFRI-609GT + TNFRII-3609CC* по сравнению с группой популяционного контроля, что указывает на ассоциированность этих полиморфизмов с заболеванием.

Полиморфизм в позиции — 308 в промоторной области *TNF*-α модифицирует генную экспрессию. Он является фактором риска развития бронхиальной астмы, рака молочной железы, эндометриоза, сахарного диабета 2 типа, болезни Крона, неспецифического язвенного колита, рака щитовидной железы, невынашивания беременности, аллергии.

В различных европейских популяциях частота мутантного аллеля 308A гена *TNF-α* варьирует от 8 до 27%. Полиморфизм *TNF- α* 308 G/A показывает высокую степень восприимчивости к инфекциям. Этот полиморфизм служит четким маркером плохого прогноза у больных, перенесших сепсис, цирроз печени и менингококковую инфекцию. По генам *TNF*-α были определены комбинации генотипов, маркирующие тяжесть клинического течения ХОБЛ.

Установлен вклад полиморфизма 308 G/A гена *TNF- α* в развитие ХОБЛ у сибирских татар, в то время как в русской популяции данной ассоциации полиморфизма не было выявлено.

TNF-*α* считается ключевым цитокином, участвующим в формировании гранулемы при саркоидозе. Мутации в гене *TNF*-α передаются по наследству, как и предрасположенность к солидным опухолям, и являются своеобразными маркерами возможности их образования [Гены иммунитета... [Электронный ресурс]. Присутствие эстрогенового и прогестеронового рецепторов коррелирует с благоприятным прогнозом у больных раком молочной железы. Как выяснилось, секреция TNF-*α* опосредуется аллельным состоянием гена.

Существует корреляция между полиморфизмом гена *TNF-α* и экспрессией стероидных рецепторов у больных раком молочной железы. Этот факт определяет взаимодействие эндокринной и иммунной системы. Действительно, генетическая возможность продуцировать более высокий уровень TNF-*α* иммунными клетками и адипоцитами может регулировать уровень экспрессии прогестеронового рецептора опухолевыми клетками и, таким образом, влиять на опухолевую прогрессию.

Аллельный вариант -330G гена *IL2* связан со снижением продукции соответствующего интерлейкина, а позиция – 174 IL-6 – с повышением IL-6. Обнаружена ассоциация генотипа *G/G* в позиции Т-330G промоторной области гена *IL-2* с инфарктом миокарда [В. И. Коненков и др., 2006].

Полиморфизм гена *IL-4,* кодирующего IL-4 (цитокин воспаления), играет большую роль в регуляции Th2 клеток, индукции IgG и IgE, в иммунологических механизмах воспаления и аллергии. У носителей -590Т повышена продукция IL-4, отмечена ассоциация с высоким уровнем общего IgE в сыворотке крови у больных с атопическими заболеваниями [Н. В. Зайцева, 2016]. Ген рецептора *IL-4R* является основным регулятором синтеза Ig E.

Ассоциация аллеля 576 R связана с атопией путем изменения сигнальной функции рецептора IL-4R вследствие утраты супрессии синтеза данного цитокина. Наибольшее функциональное значение имеет полиморфизм С589Т *IL-4* [Гены иммунитета [Электронный ресурс]. Так, показана ассоциация этого полиморфизма с развитием ряда заболеваний, таких, как атопическая бронхиальная астма, муковисцидоз, инфаркт миокарда, эндометриоз, болезнь Крона. Носители подобного гена обладают повышенной склонностью к активации иммунной системы при хирургических вмешательствах, инфекциях, механическом воздействии на ткань (забор яйцеклетки, подсадка зародыша при ЭКО). Наличие мутантного варианта гена предрасполагает к невынашиванию беременности. Кроме того, чаще развиваются осложнения сепсиса и других гнойно-воспалительных заболеваний.

Выявлена ассоциация генотипа *C/T* в позиции С-590Т гена *IL-4* с инфарктом миокарда; гомозиготный вариант R/R гена рецептора к интерлейкину-4 в позиции 574 был в несколько раз ниже среди больных инфарктом миокарда в сравнении с репрезентативной контрольной группой.

Из трех точечных мутаций G -1082A, C-819T, C-592A) аллель G-1082 ассоциирован с высокой, аллель А — с низкой продукцией IL-10; аллель 592А — со снижением синтеза данного интерлейкина, ингибирующего продукцию цитокинов, активирующих Th1-клетки (IFN-γ TNF-α, IL-1, IL-2, IL-6.). Ассоциаций с генотипами и аллелями генов *IL-10* промоторной области в позиции С-592 А и *IL-12* в позиции А-1188 G при инфаркте миокарда не было обнаружено.

Имеющиеся данные о полиморфизме генов, кодирующих иммунокомпетентные клетки и другие компоненты иммунной системы, необходимо использовать для определения связи нарушений, обусловленных действием разнообразных ОХВ, с наличием генных мутаций, усиливающих токсический эффект этих веществ.