
ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

С.Ю. Гармонов, М.И. Евгеньев, И.Е. Зыкова¹

Казанский государственный технологический университет

¹ Центр медико-биологических и экологических проблем
Российской академии естественных наук

Рассмотрена роль аналитических технологий для диагностики, оценки риска возникновения различных заболеваний и выявления индивидуальной химической чувствительности. Обсуждена роль аналитических методов в определении генетически детерминированной активности ферментных систем, контролирующих процессы биотрансформации ксенобиотиков и эндогенных соединений в организме.

The role of the analytical methods for determination of drug-metabolizing enzymes activity and their genotype and phenotype polymorphism as a risk of toxicity, cancer and chemical sensitivity is considered. Application of various methods for analysis and characterization of human genetically predetermined enzymes activity that encodes biotransformation of drugs, occupational and environmental chemicals and endogenic substances is discussed.

Процессы уничтожения химического оружия (ХО) сопряжены с потенциальной опасностью воздействия различных по своей природе высокотоксичных соединений на организм человека. Реализация этой опасности может осуществляться как при остром кратковременном поражении токсикантами в нештатных и аварийных ситуациях, так и воздействием на организм малых содержаний физиологически активных соединений в объектах окружающей среды при функционировании объектов по хранению и ликвидации отравляющих веществ, а также продуктов их трансформации в течении длительного времени. Стратегия медицинской защиты личного состава при острых кратковременных поражениях достаточно хорошо проработана и регламентирована [1–3]. Гораздо более сложной задачей является организация медицинского обеспечения персонала объектов по уничтожению ХО и населения вблизи этих объектов с учетом оценки потенциального риска поражения организма при возможном воздействии на него высокотоксичных соединений в сверхмалых дозах.

Синдром химической чувствительности (ХЧ) в последние годы все чаще употребляется при описании механизмов различных экогенетических заболеваний. В соответствии с теорией ХЧ они могут быть последствием экспозиции (любого контакта человека с токсикантом) химических веществ из окружающей среды [4, 5]. Предполагают, что индивидуальные различия ХЧ могут лежать в основе экогенетических причин возникновения повышенной токсикации, канцерогенеза и ряда хронических заболеваний, включая болезни дыхательных путей, некоторые неврологические и психические расстройства, а также синдрома хронической усталости работников химических производств [6, 7].

ХЧ появляется и развивается в две стадии. На первой стадии (индуцирование) происходит потеря толерантности после острой или хронической экспозиции загрязнителями окружающей среды. В индуцирование (или иницирование) экспозиции может включаться широкий круг химических веществ, включая пестициды, растворители, контаминанты воздуха различных

помещений, лекарств и т. д. На последующей стадии наблюдается вызов симптомов заболевания при экспозиции чрезвычайно низкими концентрациями химических веществ. Врачи формируют диагноз, основанный на симптомах, сообщаемых им пациентами. Даже если спусковые механизмы заболевания зафиксированы, начальный случай экспозиции, который, возможно, привел к потере толерантности, может остаться незамеченным или не всегда может быть связан с болезнью пациента.

Особенно резко ХЧ наблюдается у ветеранов войн в Заливе, которая провоцируется прежде любимыми пищевыми продуктами или напитками [4]. Наиболее простое применение термина «химическая чувствительность» связано с описанием симптомов заболеваний компонентами запахов. Болезненная реакция на запахи характерна для 60% рабочих, подвергающихся экспозиции растворителями [8]. Аналогичная реакция характерна и для сельскохозяйственных рабочих после острого отравления фосфорорганическими пестицидами, для работников производств ХО [9].

Подобно токсичности, ХЧ приводит к неблагоприятным реакциям на воздействие химических контаминантов окружающей среды. ХЧ более близка к аллергии вследствие двухступенчатости процесса (индукция, запуск) и последующей «гиперчувствительности». Как и в случае с предрасположенностью, для пациентов с ХЧ наблюдается стимулирование реакции организма лекарствами, продуктами сгорания, запахами, растворителями и даже пищевыми продуктами. В итоге ХЧ проявляется как разновидность скрытой («крипто») токсичности [4].

Синдром ХЧ во многом обусловлен генетически детерминированной биохимической индивидуальностью каждого человека, наследственный полиморфизм которого сформирован на протяжении эволюции постоянно протекающими мутационным, генетико-автоматическим процессами, а также влиянием отбора. При этом не менее 25% генов, детерминирующих антигенную, ферментативную, рецепторную системы и другие элементы молекулярно-биохимического статуса человека, представлены в виде полиморфных систем – 2 аллеля и больше, чис-

ло индивидуальных вариаций генотипов может достигать громадной величины 2^{10000} [10]. Однако наиболее изучены экогенетические процессы на уровне метаболизма токсикантов – генетические полиморфизмы. Именно на этом уровне более всего определяют экогенетические закономерности в индивидуальной ХЧ и, в конечном итоге, токсическую дозу вещества.

Гены, кодирующие ферменты и ответственные за метаболизм химических соединений, могут влиять на токсикацию и канцерогенез при совокупном действии химических, физических и биологических факторов. Есть все более возрастающее понимание механизма, благодаря которому различия в активности генов (генотип), в степени сопротивляемости организма или чувствительности его к токсичным или канцерогенным веществам могут приводить к заболеваниям одних индивидуумов, в то время как другие люди в тех же условиях не испытывают подобных эффектов. Химические загрязнители, различные физические воздействия, а также эффекты воздействия других генов (биологическое воздействие) способны влиять на генотип (фенотип, рис. 1), приводя к токсическому и/или канцерогенному отклику.

Наследственные различия, выражающиеся в определенной реакции на токсиканты, можно подразделить следующим образом:

- генетические факторы, обуславливающие повышенную ХЧ к токсикантам;
- обуславливающие толерантность;
- определяющие парадоксальные реакции.

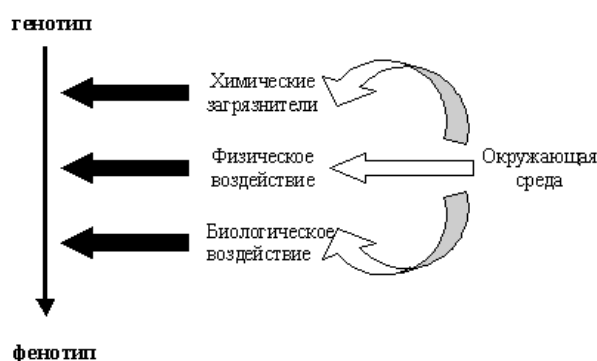


Рис. 1. Влияние эффектов окружающей среды на генотип организма

Полиморфизм является генетическим субстратом, на котором формируются восприимчивость или устойчивость к заболеваниям; эффективность медицинской защиты; существование достаточно большого числа мутаций генома человека в отдельных локусах, которые обуславливают патологическую реакцию на специфический фактор среды. Лишь некоторая часть мутаций в отдельном локусе приводит к развитию болезни или болезненной реакции, значительная часть мутаций безразлична для организма. Экогенетическое действие факторов реализуется в проявлении функции так называемых «молчащих» генов в определенных условиях среды (рис. 2).

В зависимости от особенностей действия, субстратов ферментативных реакций и роли в метаболических процессах гены подразделяют на гены метаболизма (гены внешней среды), гены триггеры (гены трансдукции или переноса сигнала) и гены клеточных рецепторов [11]. Для исследования генетического полиморфизма имеет значение детектирование биохимических изменений как эндогенных физиологических процессов, так и

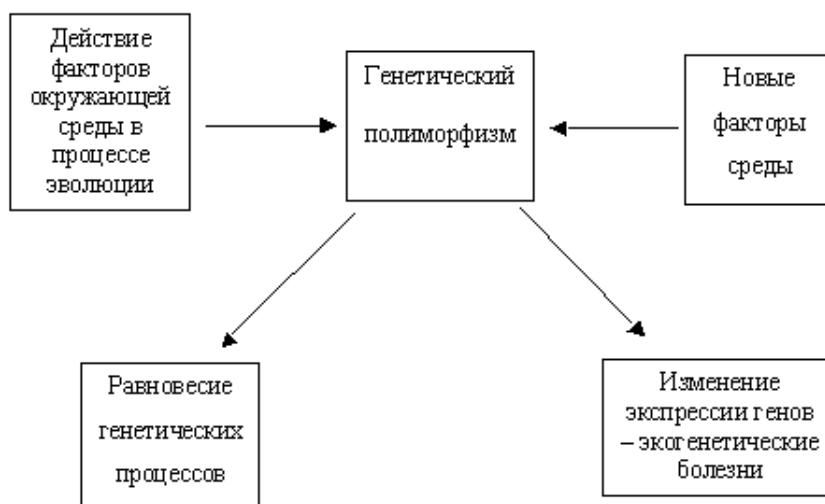


Рис. 2. Популяционно-генетическое объяснение возникновения экогенетических болезней

метаболизма экзогенных соединений [12].

У человека существует генетический контроль метаболизма поступающих в организм химических соединений (рис. 3). Так, метаболизм ксенобиотиков в организме происходит в результате реакций функционализации (реакции Фазы I) и сопряжения (реакции Фазы II) [11]. На Фазе I ферментативных превращений, многие из которых осуществляет цитохром P450, в эндогенный или экзогенный субстрат вводится функциональная (обычно гидроксильная) группа. На Фазе I метаболических превращений могут также образовываться эпоксидные и оксидные группы. Они также представляют собой реакционноспособные промежуточные соединения, способные к ковалентным взаимодействиям с нуклеиновыми кислотами и белками. На Фазе II метаболических превращений, в которых участвуют трансферазы (глутатионтрансфераза, N-ацетилтрансфераза и др.), эти окисленные промежуточные соединения выступают в качестве субстратов, в которые за счет ферментативного катализа вводятся различные функцио-

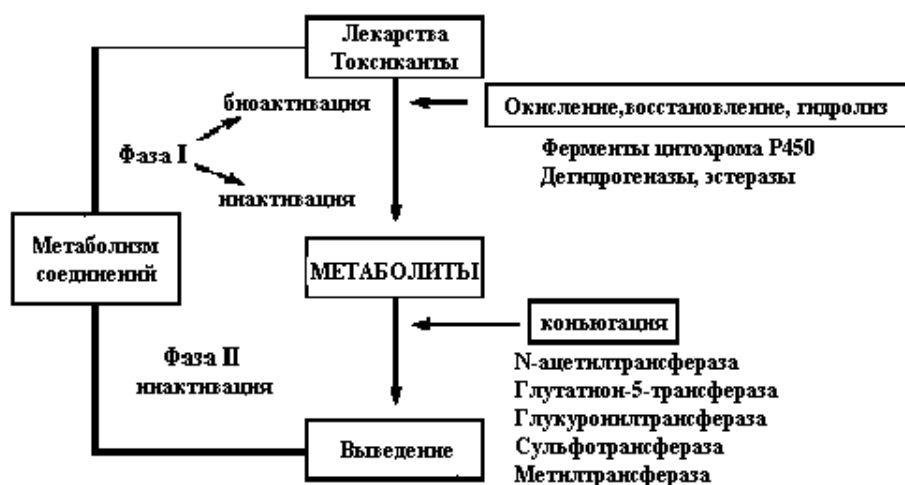


Рис. 3. Генетический контроль метаболизма различных ксенобиотиков в организме

нальные группы (сульфат, глутатион, остаток глюкуроновой кислоты, цистеин или ацетильная группа). Таким образом происходит реакция сопряжения (конъюгация) метаболизируемых веществ. В результате ряда ферментативных реакций образуются гидрофильные продукты, которые могут легко выводиться из организма. Многие реакции Фаз I и Фаз II метаболических превращений достаточно хорошо изучены, но пока нет клинических примеров того, что дефицит экогенетических ферментов может компенсироваться другими ферментами [11].

Некоторые специфические мутации являются основой высокой ХЧ их носителей к определенным факторам внешней среды. Потенциально токсические факторы окружающей среды повреждают не все население, а только его часть, генетически предрасположенную к таким мутациям. По этим причинам метаболические превращения в организме могут приводить к большему риску токсикации и канцерогенеза при экспозиции токсикантов для индивидуумов с высокой активностью ферментов Фазы I и низкой активностью ферментов Фазы II по сравнению с людьми с пониженной активностью ферментов Фазы I и высокой активностью ферментов Фазы II (рис. 4) [11].

Экогенетические реакции могут быть обусловлены редкими мутантными аллелями, которые вызывают патологический ответ или идио-

синкразию. В случае моногенного характера необычных реакций на внешнесредовые факторы возможен надежный прогноз на повторение или встречаемость подобных состояний у родственников на основе менделевских закономерностей наследования. Более того, в настоящее время на генетических картах хромосом человека обозначены локусы тех генов, мутации которых лежат в основе подобных реакций [10]. В случае участия полигенных систем в реакции на конкретный экологический фактор экогенетические закономерности строятся на близнецовых сопоставлениях, внутрисемейном корреляционном анализе исследуемых фенотипов и сравнении характера реакций в различных этнических группах населения. Большая доля из них определяется именно факторами окружающей среды: природно-климатическими условиями, производственными и бытовыми вредностями, пищевыми продуктами. Именно поэтому стоит неотложная задача детектирования полиморфных геномных систем (молчащих генов) и возможных факторов, провоцирующих их патологическое проявление [13]. Эти наблюдения свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что конечный патологический эффект зависит не только от специфики мутагенного воздействия, но и генотипических особенностей метаболизма организма. Именно в попытке понять механизмы различной индивидуальной ХЧ к отдельным

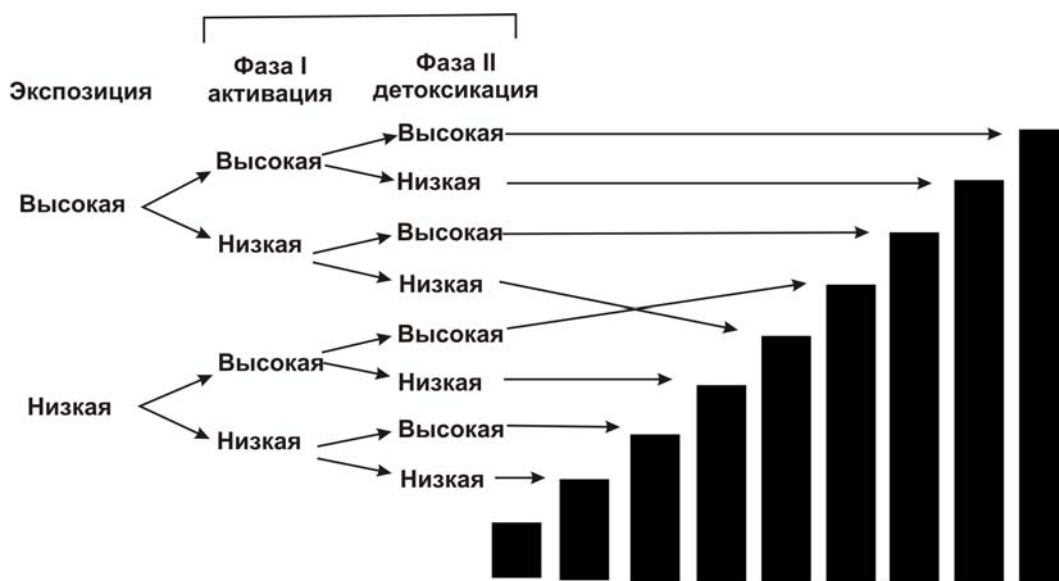


Рис. 4. Возможные комбинации влияния экспозиции токсичных соединений и генетического полиморфизма на Фазах I и II метаболических превращений на токсичность или канцерогенез

мутагенам и состоят экогенетические аспекты мутагенеза [13].

Роль факторов внешней среды в мутагенезе тройкая: некоторые из них могут сами служить мутагенами, вызывая дискретные генетические изменения; другие способны влиять на стабильность физиологических и биохимических процессов, вызывая дисбаланс и тем самым повышая эндогенный мутагенный фон; наконец, условия среды обитания определяют функциональное состояние клеток, подавляя одни и активируя другие гены, меняя их восприимчивость к действию мутагенов разной природы. Необходимо иметь в виду и существование ферментов репарации ДНК, восстанавливающих первичные повреждения ДНК. Лишь в случае каких-либо нарушений в работе систем репарации ДНК первичное нарушение структуры ДНК реализуется в истинную мутацию.

Экогенетический ракурс рассмотрения мутационного процесса представляется важным в связи с перспективой выявления лиц с повышенной чувствительностью к определенным мутагенам среды, что позволяет определить биологические характеристики профессиональной пригодности у лиц, соприкасающихся по роду своей деятельности с неблагоприятными производственными факторами. Кроме того, многостадийность мутагенеза позволяет осуществлять профилактическое медикаментозное воздействие на разных этапах мутационного процесса антимутагенами, ослабляя или полностью блокируя конечный эффект мутагенов.

Наряду с возможностью организации профилактики на популяционном уровне, все более многообещающим становится подход, который учитывает в профилактических рекомендациях уникальность генотипа каждого индивида. В этом случае профилактическая медицина не будет направлена на популяцию в целом, а ее ориентирами становятся отдельные гены, маркеры склонности к аномальным реакциям на специфические факторы окружающей среды, маркерные профили, генетические ансамбли [10].

Практическая реализация аналитической диагностики генов предрасположенности позволяет «заглянуть в будущее» человека и,

главное, обеспечить своевременную защиту организма от тех или иных нежелательных эффектов, которые могут возникнуть под действием неблагоприятных эндогенных и экзогенных факторов (лекарства, продукты питания, экологические факторы, вредные привычки, инфекции). Эта возможность достигается по причине того, что гены предрасположенности кодируют продукты своей деятельности (ферменты, белки и рецепторы), а последние способны взаимодействовать с компонентами окружающей среды при осуществлении биохимических процессов организма [11]. В патологических экогенетических реакциях в широком плане твердо установлена роль следующих полиморфных локусов, участвующих в биотрансформации ксенобиотиков: цитохром P450, N-ацетилтрансфераза, холинэстераза сыворотки, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, лактаза, ингибиторы протеиназ, пароксоназа сыворотки [10].

Аналитические технологии используются для определения генных нарушений и продуктов их деятельности на следующих уровнях:

- определение конкретной мутации (генной, хромосомной, геномной) посредством цитогенетических и молекулярно-генетических анализов;
- регистрация продуктов гена с помощью методов биоаналитической химии;
- определение специфических компонентов биохимических процессов (эндогенных и лекарственных соединений, а также их метаболитов), возникающих в результате генетической детерминации реакций биотрансформации.

Эти определения проводятся как на уровне различных биологических жидкостей организма (кровь, моча, слюна, секреты различных желез и пр.), так и клеток.

Для реализации этих целей используют различные аналитические методы (хроматография, электрофорез, иммуноферментный анализ, электроаналитические и спектральные методы) и приемы пробоподготовки, способствующие повышению чувствительности и избирательности определений компонентов сложной биологической матрицы.

В генетическом аспекте биохимические показатели (первичные белковые продукты гена, метаболиты внутри клеток и во внеклеточных биологических жидкостях организма человека) более адекватно отражают нарушения, приводящие к патологическим состояниям в организме. Это связано с тем, что аналитические методы, направленные на детектирование генетически детерминированных биохимических показателей, регистрируют биохимический фенотип [11, 14, 15]. Уровни, на которых определяется фенотип, различны – от продуктов гена до конечных метаболитов, с этим и связана многообразность используемых при этом аналитических технологий. При этом их значение в диагностике наследственных заболеваний, оценке риска токсичности и канцерогенеза неуклонно возрастает. Объяснением этого является в большинстве случаев дополнение молекулярно-генетических методов (МГМ) аналитическими биохимическими методами, поскольку молекулярно-генетически описывают генотип, биохимически же определяется фенотип. Болезнь и токсические эффекты в конечном счете являются следствием фенотипа организма. Следует отметить, что реализация действия гена представляет сложный процесс, поэтому не обнаружение мутации МГМ не всегда является полной гарантией нормального биохимического фенотипа [11, 15].

Молекулярно-генетические методы предназначены для выявления вариаций в структуре исследуемого участка ДНК вплоть до идентификации первичной последовательности азотистых оснований. Основные этапы молекулярно-генетического анализа включают в себя пробоподготовку образцов ДНК или РНК, рестрикцию ДНК на фрагменты и их последующую идентификацию различными физико-химическими методами [16]. Пробоподготовка является одним из основных этапов МГМ, поскольку ее цель состоит в выделении всей ДНК или накоплении ее определенных фрагментов, которые в дальнейшем подвергаются анализу. Приоритетным подходом в последнем случае является использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) [17–19]. Благодаря применению ПЦР-технологии удается выявить и воспроизвести

миллионы копий исследуемого участка ДНК. Такой подход позволяет без ущерба для конечного аналитического результата исследовать небольшой фрагмент генома, поскольку амплификация (умножение) участков ДНК проводится с помощью ПЦР. В соответствии с нуклеотидной последовательностью концов анализируемого участка синтезируются два праймера – копии небольшого, соответствующего 20–30 азотистым основаниям участка ДНК, с которых под влиянием ДНК-полимеразы происходит удлинение цепи, комплементарной азотистым основаниям нити материнской ДНК. На практике эти процедуры часто проводятся при автоматическом терморегулировании режима ПЦР в амплификаторах.

Необходимым звеном МГМ также является ферментативная рестрикция ДНК на фрагменты, которая осуществляется бактериальными эндонуклеазами. При обработке рестриктазой получается закономерный для данного фермента набор фрагментов различной длины.

ПЦР-технологии успешно применены для молекулярно-генетического анализа различных генов, например, кодирующих *N*-ацетилтрансферазу [20, 21], ферментов системы цитохрома P450 [22–25], дигидропиримидиндегидрогеназы [26], ангиотензин-конвертирующего фермента [27].

Продукты ПЦР-аналитических технологий можно детектировать различными физико-химическими методами. Одним из самых простых в техническом исполнении, эффективных и распространенных в клинических аналитических лабораториях является электрофорез в полиакриламидном или агаровом геле [16, 28, 29]. При этом визуализация и идентификация фрагментов ДНК является либо конечным этапом аналитических процедур, либо необходимым элементом дальнейшего анализа. После электрофоретического разделения гель часто модифицируют высокоизбирательными аналитическими реагентами. При этом предпочтение отдается флуоресцирующим соединениям, которые связываются с ДНК и позволяют значительно понизить предел обнаружения (ПрО) и повысить избирательность детектирования аналита. В последние десятилетия все более распространен-

ным аналитическим инструментом фракционирования продуктов ПЦР-технологий является капиллярный электрофорез (КЭ) [30]. Обеспечение высокоэффективного разделения в сочетании с отсутствием прецизионной техники и расхода большого количества высокочистых растворителей позволяют использовать КЭ в практике клинико-диагностических лабораторий. Высококчувствительное определение при этом достигается применением флуоресцентных и диодно-матричных вариантов детектирования, например, с лазерно-индуцированной флуоресценцией.

Особенно привлекательно использование для окончательной регистрации продуктов ПЦР твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в плащечном формате. Предложены различные типы иммуносорбентов, первичные и вторичные антитела, ферментные системы с последующим фотометрическим и флуориметрическим детектированием [31]. На рис. 5 приведены схема аналитического определения полиморфизма генов при использовании ПЦР, рестрикции фрагментов ДНК и твердофазного иммуноферментного анализа. Возможно также и прямое измерение флуоресценции олигонуклеотидного зонда с продуктами реакции в жидкой фазе либо на специальной подложке.

Основными преимуществами ПЦР являются быстрота выполнения анализа, высокая чувствительность и избирательность. Для проведе-

ния определений МГМ достаточно небольших количеств биологического материала, например, 20–40 мг хориона, от 1 мкл до 1 мл крови, 1–10 мг культуры клеток. Важно отметить, что ПЦР может быть использована для обнаружения единичных, точечных мутаций, связанных с заменой одного азотистого основания на другое. Весьма велико значение реализации ПЦР-технологии в области осуществления «проекта человеческого генома» [32] и создания «генетического паспорта» человека [33, 34].

Принципы гибридизации ДНК положены в основу создания геносенсоров для определения генетического полиморфизма. В этом случае взаимодействие комплементарных цепей нуклеиновых кислот осуществляют на поверхности различных подложек, что и послужило основой для создания высокоспецифичных и чувствительных сенсоров, применяющихся для детектирования в токсикогенетике и молекулярной биологии [35, 36]. В большинстве своем эти миниатюрные устройства детектируют продукты амплификации. ДНК-чипы имеют несомненные преимущества перед другими молекулярно-генетическими технологиями: высокая технологичность, принцип миниатюризации и дифференциального секвенирования аналита, полная автоматизация аналитических определений, многократность использования. Как правило, ДНК-зонд модифицирован флуорофором. Этот прием позволяет в итоге повысить как избира-

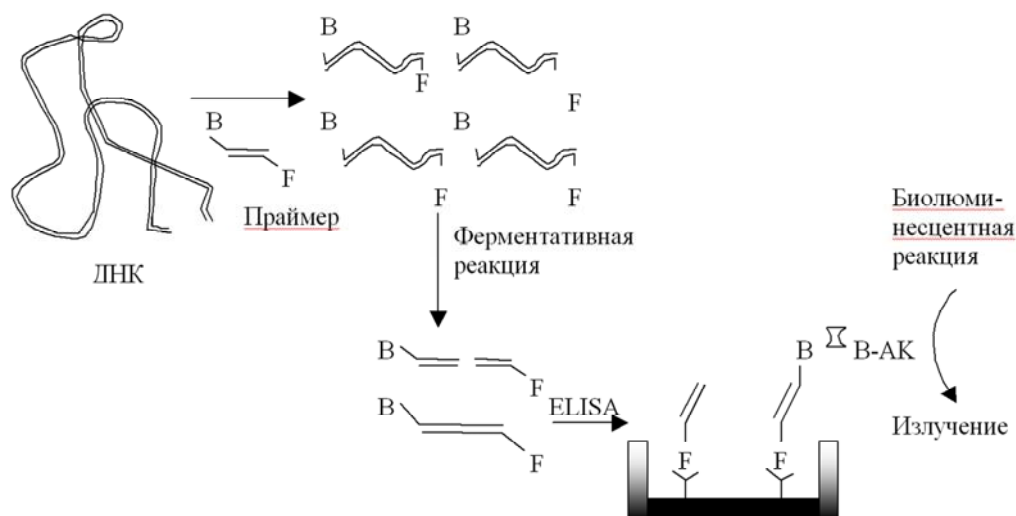


Рис. 5. Схема аналитического определения полиморфизма генов при использовании ПЦР, рестрикции фрагментов ДНК и твердофазного иммуноферментного анализа

тельность, так и чувствительность аналитического отклика геносенсорных устройств. В последнее время для этих целей используется также масс-спектроскопия, хемилюминесценция, оптоволоконные технологии, диодно-матричные детекторы.

Наиболее распространенным путем метаболических превращений в организме человека различных по структуре веществ являются окислительные процессы. Они катализируются самой многочисленной группой ферментов системы цитохрома Р-450 (СУР450) – микросомальных оксидаз (МО), называемой также микросомальной системой метаболизма или монооксигеназной системой. В последние годы выделены изоферменты СУР450 – СУР450 3А4, СУР450 2Д6, 2Е1 и другие, ответственные за биотрансформацию различных лекарственных веществ (ЛВ) и экотоксикантов [11].

Существует ряд прямых и косвенных методов определения активности МО, первые из них предполагают исследование биопсийных проб ткани печени, а вторые – определение параметров кинетики выведения из организма ряда ЛВ, а также оценку активности ферментов СУР450 с помощью эндогенных маркеров биотрансформации [37].

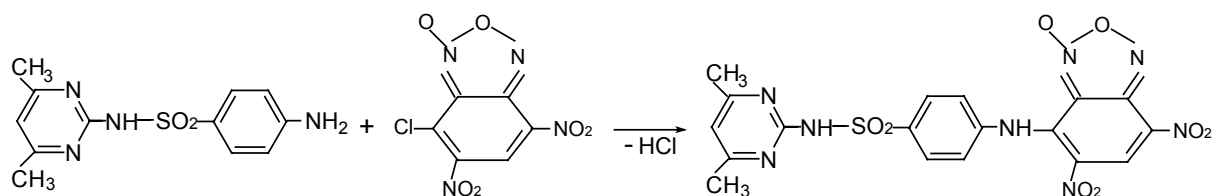
Косвенная оценка активности МО предусматривает использование традиционных аналитических технологий тест-определения вводимых в организм пациента ЛВ, изучение параметров кинетики выведения которых в биологических жидкостях позволяет оценивать активность ферментных систем детоксикации. При этом потенциально массовый характер клинических исследований, направленных на выяснение фенотипических особенностей биотрансформации ксенобиотиков конкретными пациентами, делает актуальной задачу разработки простых в экспериментальном отношении, высокопроизводительных, экономичных и безопасных для обследуемых аналитических методов, основанных на тест-определениях фармакогенетических маркеров.

Для фенотипирования окислительного метаболизма широко используются соединения, подвергающиеся гидроксигированию, окислению по сере и азоту, деалкилированию. Приведенные в табл. 1 данные по ферментативному контролю изоферментами СУР450 биотрансформации различных субстратов свидетельствуют о большом разнообразии групп ЛВ, для которых характерен полиморфизм окислительных процессов.

Таблица 1. Изоферменты цитохрома Р450 и их некоторые субстраты, используемые для фенотипирования окислительного полиморфизма

| Изофермент | Лекарственные вещества (субстраты) |
|------------|---|
| СУР 1А2 | Фенацетин, теофиллин, клозапин, парацетамол, никотин, кофеин, имипрамин, кломипрамин, варфарин, пропранолол |
| СУР 2А6 | Котинин, кумарин, никотин |
| СУР 2С8 | Толбутамид |
| СУР 2С9 | Фенитоин, варфарин, диклофенак, ибупрофен, мефенаминовая кислота, пироксикам, толбутамид, лорноксикам |
| СУР 2С19 | Амитриптилин, диазепам, хлороксазон, омепразол, мефитоин, кломипрамин, импрамин, пропроналол, гексабарбитон |
| СУР 2Е1 | Парацетамол, этанол, хлороксазон, кофеин |
| СУР 2Д6 | Амитриптилин, дезипрамин, импрамин, нортриптилин, кломипрамин, мексилитин, пропафенон, галоперидол, клозапин, перфеназин, буфаролол, метапролол, пропранолол, тимолол, кодеин, дебризохин, фенформин, индорамин, спартеин |
| СУР 3А4 | Этинилэстрадиол, эритромицин, хинидин, хинин, терфенадин, циклоспорин, фелодипин, нифедипин, верапамил, рифампицин, триазолам |

Выявление активности *N*-ацетилтрансферазы осуществляют с использованием тест-маркеров процесса ацетилирования, в качестве которых можно использовать ЛВ, содержащие аминные функциональные группы, а также продукты метаболизма этих веществ и эндогенные соединения организма человека – серотонин, гистамин, холин [38, 39]. Представляет интерес оценка фенотипа ацетилирования при нагрузке испытуемого определенными дозами кофе или чая, при этом в основе метода лежит выявление индивидуального клиренса метаболита кофеина – мочевой кислоты. Для оценки метаболического отношения этих метаболитов кофеина в моче использован метод ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) с УФ- и масс-спектральными детекторами с ПрО аналита 0,25 мкг/мл [40].



Этот подход предотвращает процессы окислительной деградации ЛВ в биологических субстратах, исключает малоэффективную стадию экстракционного концентрирования. Эти методы использованы для подбора систем ЛВ – индукторов процессов ацетилирования и изучения адаптации организма к мышечным нагрузкам [43–46]. В последнем случае формируется фенотип «сверхбыстрого» ацетилирования, а предлагаемые способы можно использовать для биохимической оценки степени тренированности спортсменов [46].

В последние годы предметом интенсивных исследований является изучение роли системы ацетилирования в предрасположенности к канцерогенезу и мутагенезу [47]. Фенотипу медленного ацетилирования соответствует более высокий риск (соотношение 16,7/1) заболеваний рака мочевыводящих путей для работников производств красителей [48]. Это связано с тем, что низкая скорость *N*-ацетилирования приводит к меньшей скорости детоксикации ариламинов в печени, приводя к возрастанию концен-

Наиболее распространенным в клинической практике методом детектирования содержания тест-маркеров ацетилирования и их метаболитов благодаря универсальности и невысокой стоимости является спектрофотометрия. Спектрофотометрическое определение фенотипа ацетилирования основано на реакциях получения окрашенных диазопроизводных сульфадимезина, норсульфазола, продуктов конденсации гидразида изоникотиновой кислоты с карбонильными соединениями (например, *n*-диметиламинобензальдегидом) и других производных [41, 42].

В качестве селективных реагентов для дериватизации аминокислотсодержащих ЛВ в моче и слюне человека при определении активности *N*-ацетилтрансферазы предложены хлординитрозамещенные бенз-2,1,3-оксадиазола, образующие интенсивно окрашенные продукты реакций с определяемыми веществами [43–46]

трации реакционноспособных промежуточных продуктов в организме. Например, за период производства и применения генотоксичного и мутагенного 1,1-диметилгидразина, метаболизм которого находится под контролем ацетилтрансферазы, риск развития злокачественных новообразований у лиц, занятых в этой системе, возрос в шесть раз, а влияние этих заболеваний на общую смертность и трудоспособность увеличилось в 21 раз [49].

Весьма интересна с клинической точки зрения и защиты организма от экотоксикантов выявленная взаимосвязь между способностью быстрых ацетиляторов медленно окислять лекарственные препараты и наоборот – медленных ацетиляторов быстро окислять лекарства [50]. Аналитические методы, позволяющие выявлять такие закономерности, имеют большую практическую ценность.

Генетически обусловленные формы медьсодержащего белка церуплазмина (ЦП) играют значительную роль в обмене железа, кроветворении, а также в инактивации биогенных ами-

нов и бактериальных токсинов. ЦП обладает оксидазной и антиокислительной активностью, в связи с чем он рассматривается как один из факторов нейроэндокринной регуляции и естественной защиты организма при стрессовых ситуациях, воспалительных, аллергических реакциях [28]. ЦП ферментативно окисляет полиспирты, полифенолы, полиамины, причем оптимум активности фермента приходится на pH 5,6–6,0. Эта ферментативная реакция ингибируется азидами, фторидами, тиоцианатами. Такой аналитический подход положен в основу простого определения ЦП при окислении *n*-фенилендиамина, где производное окисленного диамина с диметилпарааминофенилендиаминном детектируется спектрофотометрически при 530 нм. Для определения ЦП в сыворотке крови также предложены автоматизированные иммунохимические анализаторы, иммунотурбидиметры, метод твердофазного иммуноанализа [28].

Холинэстеразы по типу катализируемой ими реакции являются гидролазами карбоновых кислот. Ацетилхолинэстераза (АХЭ) эритроцитов и нервной ткани более специфична по отношению к ацетилхолину, а холинэстераза (ХЭ) плазмы крови – к бутирилхолину. АХЭ и ХЭ также гидролизуют и другие эфиры карбоновых кислот. Большее практическое значение имеют методы оценки сывороточной ХЭ, поскольку показана диагностическая зависимость ее активности от заболеваний печени, инфаркта миокарда и других заболеваний [28]. С точки зрения обеспечения медицинской защиты организма важно фенотипирование активности ХЭ, так как многие фосфорорганические токсиканты ингибируют активность фермента [51]. Угнетение активности ХЭ выявляется значительно раньше других симптомов интоксикации и служит основой для своевременной диагностики и лечения отравлений, а также определения индивидуальной ХЧ персонала при работе с экотоксикантами.

Прямые методы определения активности ХЭ и АХЭ основаны на использовании ферментативных реакций гидролиза стандартов ацетил- и бутирилтиохолина при инкубации с образцами сыворотки или эритроцитов с последующим

детектированием продуктов аналитической реакции. Для этого используются манометрические, титриметрические, потенциометрические и фотометрические методы [28]. Достаточную избирательность и чувствительность широко используемого спектрофотометрического детектирования продуктов ферментативной реакции обеспечивает дериватизация ацетилхолина при помощи гидроксамовой реакции, продукты гидролиза тиохолинов регистрируют по восстановлению дисульфиднитробензоата до окрашенных в желтый цвет тиолов, окрашенных производных тиохолина с дитионитробензойной кислотой (реактив Элмана). Широкое применение получили тест-методы определения активности ХЭ в сыворотке крови с использованием полосок носителей, пропитанных ацетилхолином и индикаторами, изменяющими окраску по мере выделения уксусной кислоты в ходе ферментативного гидролиза субстрата [28]. Вышеперечисленные методики отличаются простотой аналитических технологий и доступностью для практики.

Аналитические исследования процессов свободнорадикального перекисного окисления липидов (ПОЛ) обусловлены огромным влиянием генетических дефектов этих процессов на резистентность организма к воздействию на него неблагоприятных экологических факторов [52, 53]. Показано, что именно генетическая детерминированность антиоксидантной защиты от воздействия свободных радикалов во многом определяет процессы старения организма [52]. Ферментативными ингибиторами реакций свободнорадикального ПОЛ являются супероксиддисмутаза (СОД) эритроцитов и других тканей, глутатиопероксидаза (ГП), глутатионредуктаза (ГР), каталаза, а также рассмотренный выше фермент фракции гликопротеинов церуплазмин. Антиоксидантная вторичная защита обеспечивается глутатион-S-трансферазами (GST), проявляющими пероксидазную активность и контролирующими реакции биотрансформации с участием восстановленного глутатиона (GSH). Показана роль оксидантного статуса организма человека в чувствительности генома к повреждающим факторам окружающей среды [54].

Наиболее удобны и доступны для определения активности глутатионзависимых фермен-

тов кинетические методы, позволяющие надежно косвенно оценивать содержание фермента в инкубационной среде по его влиянию на индикаторную реакцию [53]. Было установлено, что курящие люди, имеющие генетически детерминированный дефицит этих ферментов, имеют 2-кратный риск заболеть раком легких по сравнению с курильщиками без этого дефицита. Еще выше (почти в 20 раз) риск развития рака молочной железы у курящих женщин с дефицитом GST и медленной формой *N*-ацетилтрансферазы [52].

Особое место занимают методы определения СОД, поскольку этот антиоксидант участвует в прерывании цепи свободнорадикальных процессов в начальной стадии восстановления молекулярного кислорода, вызывая дисмутацию образовавшегося супероксид анион-радикала (СОАР) [52]. Для определения активности СОД создают аналитические системы, обеспечивающие постоянную генерацию СОАР. Прямые методы основаны на использовании физических подходов к генерации СОАР: фотолиза и радиолита. Уменьшение концентрации СОАР при этом контролируется методом ВЭЖХ с электрохимическими системами детектирования. В непрямых методах генерация СОАР осуществляется в ходе его образования в результате окислительно-восстановительных процессов. В данном случае об активности фермента судят не по снижению концентрации СОАР, а по изменению уровня содержания продуктов окислительно-восстановительной реакции, которые взаимодействуют с СОАР. В качестве аналитических редокс-систем генерации СОАР широко применяют: ксантин/ксантинооксидазу, адреналин/адренохром, НАДН/феназинметасульфат/нитросиний тетразолий, кверцетин [52, 53]. Использование этого подхода предполагает спектрофотометрическое детектирование окрашенного продукта в результате реакции или комплекса последовательных редокс-процессов.

Активность каталазы эритроцитов достаточно просто оценить по кинетике разложения перекиси водорода в инкубационной среде по поглощению в УФ области спектра [52]. Разработаны амперометрические биосенсоры для детектирования перекиси водорода в биологиче-

ских субстратах, которые содержат селективные к H_2O_2 мембраны и компенсирующие электроды для устранения мешающего влияния природных доноров электронов биологических матриц. Показано, что определение активности каталазы входит в комплексную диагностику синдрома хронической усталости работников химических производств [55].

Фермент параоксоназа (Ca^{2+} -зависимая эстераза), также характеризующийся полиморфизмом, найден в человеческой плазме. Очевидно, этот фермент должен существовать в организме человека для иных целей, чем детоксикация фосфорорганических веществ (например, параоксона – биологически активного метаболита фосфорорганического пестицида паратион), синтез которых начат только в 20-м столетии. Наблюдаются этнические различия фенотипа. Поразительные разновидности в заболеваниях среди солдат, синдром ветеранов войн частично объясняют полиморфизмом параоксоназы [56].

Фермент глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа имеет наибольшее количество вариаций в организме человека. Приблизительно 10% населения мира имеют тот или иной из более чем 340 различных вариантов этого белка. G6PD – фермент в гексозомонофосфатном шунте, один из основных источников НАДФН и восстановления уровня глутатиона (GSH) в эритроцитах. Непосредственное определение активности G6PD основано на спектрофотометрическом определении продуктов восстановления НАДФ в гемоллизате [38]. При косвенном спектрофотометрическом определении количество НАДФН, зависящее от активности фермента, детектируется в виде производных с бриллиантовым крезолсиним, метиленовым синим и другими красителями. Другие методы предусматривают превращение метгемоглобина в гемоглобин под действием НАДФН-зависимой редуктазы метгемоглобина, количество НАДФН детерминруется активностью G6PD. Также применяют изучение стабильности GSH в присутствии ацетилфенилгидразина или детектирование телец Гейнца при инкубации эритроцитов с ацетилфенилгидразином [38]. Различие в активности G6PD определяет бимодальное распределение гемолитической анемии, на которое могут вли-

ять ариламиновые сульфопрепараты. Этнические различия полиморфизма очень существенны. При совместном влиянии двух фармакогенетических лоций это приводит к очень существенным различиям в риске канцерогенеза и токсикации человека при действии химических загрязнителей. Так, на людей с дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и медленным фенотипом ацетилирования весьма драматично воздействуют ароматические амины. В табл. 2 показано влияние фенотипа ацетилирования и дефицита G6PD на относительное содержание аддукта анилина с гемоглобином крови работников химических производств, подвергавшихся экспозиции анилином. Как видно, при разных вариациях генетического полиморфизма наибольшее содержание аддукта-токсиканта наблюдается при медленном типе ацетилирования и дефиците G6PD. При дефиците G6PD (вероятно, из-за уменьшения GSH сопряжения глутатион-S-трансферазой на фазе II процесса детоксикации) и низкой скорости N-ацетилирования (из-за уменьшения детоксикации реакционноспособных промежуточных N-гидроксипроизводных анилина) образуется большее количество реакционноспособных промежуточных продуктов метаболизма анилина, ковалентно связанных с гемоглобином. Таким образом, риск развития неблагоприятного эффекта для здоровья разных людей (содержание «биомаркеров» в их организме) может измениться на два порядка при равной экспозиции химических веществ (пестициды, загрязнители атмосферы или воздуха рабочих помещений и др.) благодаря межиндивидуальным генетическим различиям.

Практические следствия теории ХЧ – это переоценка минимальных уровней риска токсикации. По оценке Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), например, каждый избыточный микрограмм бензола в воздушной среде сверх 6 мкг/м³ эквивалентен риску возникновению шести случаев заболевания лейкемии на миллион жителей. Эта величина в десятки раз меньше значений ПДК разных стран, в том числе РФ. Для оценки последствий воздействия канцерогенных веществ введена «Единица Избыточного Риска» (Unit Risk Excess), позволяющая оценивать риск поражения организма при определенном уровне воздействия на него токсичных соединений [57]. В связи с этим необходимо выявление и количественное описание зависимостей «экспозиция ⇒ доза ⇒ эффект» воздействия высокотоксичных веществ на живые организмы. Разработаны высокочувствительные и избирательные аналитические методы для мониторинга отравляющих веществ в биологических жидкостях и объектах окружающей среды [58–60]. Однако, необходим дальнейший поиск систем биомаркеров для химической дозиметрии этих суперэкоксикантов в биологических жидкостях организма человека. Они необходимы для выявления эффекта действия токсикантов на растительный и животный мир, прогноза заболеваний человека, для создания и верификации микроэкологических моделей.

Индивидуальная генетическая предрасположенность остается главной и пока мало изу-

Таблица 2. Влияние фенотипа ацетилирования и дефицита глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (G6PD) на относительное содержание аддукта анилина с гемоглобином в крови работников химических производств, подвергавшихся экспозиции анилином

| Фенотип ацетилирования | | Дефицит глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы G6PD | | Относительное содержание аддукта анилина с гемоглобином крови |
|------------------------|-----------|---|------|---|
| Быстрый | Медленный | Нет | Есть | |
| + | | + | | 2 |
| + | | | + | 30 |
| | + | + | | 20 |
| | + | | + | 100 |

ченной причиной ХЧ организма на токсичное соединение. Пути реализации экогенетических закономерностей многообразны. Принимая во внимание накопленные сведения о генах, участвующих в метаболизме ксенобиотиков, с одной стороны, и применение арсенала аналитических методов в их тестировании, можно предположить, что недалеко то время, когда мониторинг индивидуальной ХЧ на воздействие экотоксикантов будет проводиться современными аналитическими методами диагностики. Особенно актуальна стандартизация этих процедур для профессионального отбора при работе с суперэкоксикантами, выявление среди обследуемых групп повышенного риска, создание централизованного регистра их генетических полиформизмов и оптимальной среды жизнедеятельности каждого человека за счет выявления и предупреждения патологического проявления возможных неблагоприятных факторов (профессиональные условия труда, пищевые продукты, лекарственные препараты). В создании научной основы для разработки рекомендаций экологической защиты, определении путей трансформации теории болезней в теорию сохранения здоровья и состоит конкретная цель профилактической медицины.

Литература

1. *Каракчиев Н.И.* Военная токсикология и защита от ядерного и химического оружия. Ташкент: Медицина, 1988.
2. Защита от оружия массового поражения. Справочник. Под ред. В.В. Мясникова. М.: Военное издательство, 1989, 398 с.
3. Сильнодействующие ядовитые вещества и защита от них. МО СССР. М.: Военное издательство, 1989, 176 с.
4. *Miller C.S.* Toxicology. 1996. V. 111, p. 69–86.
5. *Gots R.E., Hamosh T.D., Flamm W.G., Carr C.J.* Regul. Toxicol. and Pharmacol. 1993. V. 18, p. 61–78.
6. *Ashford N.A., Miller C.S.* Chemical Sensitivity. A Report to the New Jersey State Department of Health. 1989.
7. *Ashford N.A., Miller C.S.* Chemical Exposures: Low Levels and High Stakes. Van Nostrand Reinhold. New York. 1991.
8. *Ryan C.M., Morrow I.A., Hodgson M.J.* Amer. J. Psych. 1988. V. 145, p. 1442–1445.
9. *Tabershaw I.R., Cooper C.I.* Occup. Med. 1966. V. 8, p. 5–20.
10. *Бочков Н.П.* Клиническая генетика. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001, 448 с.
11. *Nebert D.W., Roe A.L.* Sci. Total Environ. 2001. V. 274, p. 93.
12. *Gonzalez F.J., Idle J.R.* Clin. Pharmacokinet. 1994. V. 26, p. 59.
13. *Порошенко Г.Г., Горькова С.Н.* Природа. 1989. № 3, с. 3–12.
14. *Pfost D.R., Boyce-Jacino M.T., Grant D.M.* Trends Biotechnol. 2000. V. 18, p. 334.
15. *Christensen C.B.V.* Talanta. 2002. V. 56, p. 289.
16. *Alcamo I.E.* DNA Technology. Lond.: Harcourt Academic Press, 2001.
17. *White T.J.* Trends Biotechnol. 1996. V. 14, p. 478.
18. *Appenzeller T.* Science. 1990. V. 247, p. 1030.
19. *Момыналиев К.Т., Говорун В.М.* Клин. лаб. диагност. 2000. № 4, с. 25.
20. *Deitz A.C.A., Doll M.A., Hein D.W.* Anal. Biochem. 1997. V. 253, № 2, p. 219.
21. *Doll M.A., Hein D.W.* Anal. Biochem. 2001. V. 288, № 1, p. 106.
22. *Labuda D., Krajcinovic M., Richer C., Skoll A., Sinnett H., Yotova V., Sinnett D.* Anal. Biochem. 1999. V. 275, № 1, p. 84.
23. *Endrizzi K., Fischer J., Klein K., Schwab M., Nüssler A., Neuhaus P., Eichelbaum M., Zanger U.M.* Anal. Biochem. 2002. V. 300, № 2, p. 121.
24. *Itoh K., Inoue K., Yanagiwara S., Kyoya H., Suzuki T.* Biol. and Pharm. Bull. 1999. V. 22, № 1, p. 77.
25. *Hiratsuka M., Agatsuma Y., Omori F., Narahara K., Inoue T., Kishikawa Y., Mizugaki M.* Biol. and Pharm. Bull. 2000. V. 23, № 10, p. 1131.
26. *Johnson M.R., Wang K., Smith J.B., Heslin M.J., Diasio R.B.* Anal. Biochem. 2000. V. 278, № 2, p. 175.
27. *Мусеев В.С., Демуров Л.В., Кобалава Ж.Д.* Терапевт. арх. 1997. № 9, с. 18.
28. *Камышиников В.С.* Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. В 2 т. Мн.: Беларусь, 2000.
29. *Ulfelder K.J., Schwartz H.E., Hall J.M., Sunzeri F.J.* Anal. Biochem. 1992. V. 200, p. 260.
30. *Ozaki Y., Katayama Y., Ihara T., Maeda M.* Anal. Sci. 1999. V. 15, p. 389.
31. *Hahn M., Dorsam V., Friedhoff Fritz A., Pingoud A.* Anal. Biochem. 1995. V. 229, p. 236.
32. *Lander E.S., Linton L.M., Birren B., et al.* Nature. 2001. V. 409, p. 860.
33. EUROGAPP Project 1999–2000. Genetic Tests – Insurance and Employment: Technical, social and ethical issues. Background Document. 2000.

34. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены предрасположенности. СПб.: Интермедика, 2000.
35. Doktycz M., Beattie K. Genosensors and model hybridization studies //Automated technologies for genome characterization. Eds Beugelsdijk T.J. John Wiley and Sons Inc, 1997, p. 205.
36. Laval J.-M., Mazeran P.-E., Thomas D. Analyst. 2000. V. 125, p. 29.
37. Краковский М.Э., Аширметов А.Х. Лаб. дело. 1990. № 10, с. 21.
38. Соради И. Основы и педиатрические аспекты фармакогенетики. Будапешт: АН Венгрии, 1984.
39. Veenstra-VanderWeele J., Anderson G.M., Cook E.H. Eur. J. Pharmacol. 2000. V. 410, p. 165.
40. Baud-Camus F., Marquet P., Soursac M., Davrinche C., Farinotti R. J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 2001. V. 760, p. 55.
41. Буловская Л.Н., Борисенко Г.Н., Дробаченко О.А., Курбатова Г.П., Иванова В.В. Лаб. дело. 1990. № 10, с. 28.
42. Джорджеску П., Пэунеску Е. Биохимические методы диагноза и исследования. Бухарест: Медицинское издательство, 1963.
43. Evgen'ev M.I., Garmonov S.Yu., Evgen'eva I.I., Goryunova S.M., Pogrel'tzev V.I., Levinson F.S. Talanta. 1998. V. 47, № 10, p. 891.
44. Евгенийев М.И., Гармонов С.Ю., Шакирова Л.Ш., Левинсон Ф.С. Ж. анал. химии. 2000. Т. 55, № 8, с. 888.
45. Евгенийев М.И., Гармонов С.Ю., Шакирова Л.Ш., Погорельцев В.И. Хим.-фармац. ж. 2000. Т. 34, № 11, с. 5.
46. Абзалов Р.А., Нигматуллина Р.Р., Хайруллина Т.Н., Гармонов С.Ю., Шакирова Л.Ш., Евгенийев М.И. Бюл. эксперим. биол. и мед. 2000. Т. 130, № 12, с. 620.
47. Hein D.W. Toxicol. Lett. 2000. V. 112–113, p. 349–356.
48. Weber W.W. Pharmacogenetics. New York-Oxford: Oxford University Press, 1997.
49. Мисийчук Ю.И., Терещенко Г.Ф., Лебедев Г.П. и др. Экол. химия. 1998. № 7 (1), с. 42–47.
50. Холодов Л.Е., Яковлев В.П. Клиническая фармакокинетика. М.: Медицина, 1985.
51. Франке З., Франц П., Варнке В. Химия отравляющих веществ. Т. 2. М.: Химия, 1973.
52. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. СПб., 2000.
53. Медицинские лабораторные технологии. Под ред. А.И. Каркащенко. Т. 2. СПб.: Интермедика, 1999.
54. Khripach L.V., Revazova J.A., Revich B.A. Pharmacol. and Toxicol. 1999. V. 85, p. 10.
55. Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., Кретова И.Г. и др. Клин. лаб. диагност. 1999. № 2, с. 9.
56. Brophy V.H., Jarvik G.P., Richter R.J., Rozek L.S., Schellenberg G.D., Furlong C.E. Pharmacogenetics. 2000. V. 10, p. 453–460.
57. World Health Organisation. Updating and revision of the air quality guidelines for Europe. WHO Meeting Report 11–13 January 1993.
58. Hooijschuur E.W.J., Hulst A.G., de Jong A.L., et al. Trends Anal. Chem. 2002. V. 21, p. 116–130.
59. Goransson-Nyberg A., Fredriksson S.A., Karlsson B., et al. Arch. Toxicol. 1998. V. 72, p. 459–467.
60. Black R.M., Harrison J.M., Read R.W. Arch. Toxicol. 1999. V. 73, p. 123–126.